



**EKSOJEN LİPOİK ASİTİN MISIR (*Zea mays L.*)
ÇİMLENMESİ VE ÇİMLENME SONRASI
ETKİLERİNİN FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE
MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

Ümran KARAYEL

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı**

Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

2019

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EKSOJEN LİPOİK ASİTİN MISIR (*Zea mays L.*)
ÇİMLENMESİ VE ÇİMLENME SONRASI ETKİLERİNİN FİZYOLOJİK,
BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

Ümran KARAYEL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Botanik Bilim Dalı

ERZURUM
2019

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
TEZ ONAY FORMU



**EKSOJEN LİPOİK ASİTİN MISIR (*Zea mays L.*) ÇİMLENMESİ İLE
ÇİMLENME SONRASI ETKİLERİNİN FİZYOLOJİK BİYOKİMYASAL
VE MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR danışmanlığında, Ümran KARAYEL tarafından hazırlanan bu çalışma, 20/09/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Botanik Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Özlem BARIŞ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mucip GENİŞEL

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **10.10./2019** tarih ve **40.../35**..... nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Mehmet KARAKAN **Y.**
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EKSOJEN LİPOİK ASİTİN MISIR (*Zea mays L.*) ÇİMLENMESİ VE ÇİMLENME SONRASI ETKİLERİNİN FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

Ümran KARAYEL

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

Bu araştırmada bir vitamin benzeri bileşik olan Lipoik asitin mısır (*Zea mays L.*) bitkisine eksojen uygulanması ile enerji metabolizması üzerine iyileştirici etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla tohumlar belirlenen konsantrasyonlarda (10, 20, 25 ve 30 μ M lipoik asit) petrilerde 25°C'ye ayarlı olan çimlenme kabini kontrol şartlarında 4 gün süre ile büyütülüp hasat edilerek fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler parametrelerdeki değişimler incelenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla LA uygulanan gruplarda kök ve gövde uzunluklarında artış belirlenmiş fakat çimlenme yüzdeleri bakımından belirgin bir fark elde edilememiştir. Protein içeriği ve protein profili üzerine etkileri araştırdığımızda mısır bitkisinin kök, gövde ve endospermlerindeki protein miktarı kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Total karbohidrat içeriğinde kök ve gövdede kontrol grubuna göre tüm uygulama gruplarında artış kaydedilirken, endospermlerde kontrole kıyasla uygulama gruplarında azalış gösterdi. Lipoik asit SOD ve CAT ve GPX aktivitesini kontrol grubuna kıyasla azaltırken APX aktivitesini kontrol grubuna göre artırmıştır. GR aktivitesinde de kontrol grubuna göre artış belirlenmiştir. Mısır bitkisinin köklerinde total AsA, AsA, DHA ve DHA/AsA içeriklerine bakılmış ve total AsA ve indirgen AsA içeriğinin kontrol grubu bitkilerine göre bütün uygulama gruplarında artmış olduğu, DHA içeriğinin kontrol grubu bitkilerine göre 20 μ M LA uygulaması hariç diğer bütün uygulama gruplarında ise arttığı kaydedildi. Fenolik madde içeriği kontrol gruplarına kıyasla uygulama gruplarında artmıştır. İzositrat Liyaz aktivitesi kontrol grubunun endospermlerine göre LA uygulama gruplarında artış gözlemlenmiştir. Malat sentaz aktivitesi de kontrol gruplarına LA uygulama gruplarında artış gözlemlenmiştir. Aynı zamanda kontrole kıyasla amilaz aktivitesinin lipoik asit uygulaması ile dört gün boyunca önemli bir artış sağlayarak çimlenme üzerine önemli bir etki sergilediği belirlenmiştir. Sitrat sentaz aktivitesi de uygulama gruplarında kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir. Kökler ve gövdede sitrat sentaz, sitokrom oksidaz, ATP sentaz, prüvat dehidrogenaz enzimleri ile endospermlerde isositrat liyaz ve malat sentaz enzimlerini kodlayan genlerin ifade düzeyleri Real-Time PCR ile belirlenmiş ve gen ifadelerinde kontrol grubuna göre artış gözlemlenmiştir.

2019, 105 sayfa

Anahtar Kelimeler: Lipoik asit, Mısır, Çimlenme, Antioksidan, Enerji Metabolizması

ABSTRACT

Ms. Thesis

INVESTIGATION OF EXOGENOUS LIPOIC ACID MAIZE (*Zea mays L.*) GERMINATION AND POST GERMINATION EFFECTS AT PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR LEVEL

Ümran KARAYEL

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Associated Prof. Rahmi DÜMLÜPINAR

The effects of lipoic acid, a vitamin like compound, on the energy metabolism by exogenous application to corn (*Zea mays L.*) were investigated. For this purpose, corn seeds in petri plates, were grown and harvested for 4 days under the control conditions in the germination chamber set at 25 ° C in the oil at the specified concentrations (10, 20, 25 and 30 µM lipoic acid). Root and stem lengths treated with lipoic acid were more developed than the control group. but there was no significant difference between the control group and LA group for germination. When the effects on protein content and protein profile are examined, it was determined that the amount of protein in the root, stem and endosperm of corn plant was higher than the control group. Total carbohydrate content of root and stem compared to control group increased in all application groups, while the endosperm showed a decrease in application groups compared to control. Lipoic acid decreased SOD, CAT and GPX activity compared to control group and Lipoic acid increased APX and GR activity compared to control group.

Total AsA, AsA, DHA and DHA / AsA contents of corn plant roots were examined and total AsA and reducing AsA contents increased in all application groups compared to control groups. DHA content was higher in all application groups except 20 µM LA application compared to control groups. Phenolic content increased in application groups compared to control groups. Isocitrate Lyase activity, was increased in LA application groups compared to endosperms of the control groups. Malat synthase activity too, was increased in LA application groups compared the control groups. Amylase activity with lipoic acid administration showed a significant increase for four days showed a significant effect on germination to compared the control groups. Citrate synthase activity too, increased in the application groups compared to the control groups. Citrate synthase, cytochrome oxidase, ATP synthase, pruvate dehydrogenase enzymes in the roots and stems, expression levels of the coding genes were determined by Real-Time PCR and an increase in gene expression was observed compared to the control groups. isocitrate lyase and malate synthase enzymes in endosperms, expression levels of the coding genes were determined by Real-Time PCR and an increase in gene expression was observed compared to the control groups.

2019, 105 pages

Keywords: Lipoic acid, Maize, Germination, Antioxidant, Energy Metabolism

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu araştırma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvar' ında yapılmıştır.

Öncelikli olarak çalışmalarımnda her türlü desteği sağlayan bana çalışmalarımın yanı sıra iyi bir insan olmayı öğütleyen ve öğreten çok kıymetli ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINARA' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımnda her türlü desteği sağlayan ve her zaman yanımda olan maddi manevi üzerimden desteğini esirgemeyen her yönüyle örnek bir insan olan çok kıymetli ve değerli Hocam Serkan ERDAL' a teşekkür ederim.

Ayrıca değerli Hocam Prof. Dr. Ökkeş ATICI ve Prof. Dr. Özlem BARIŞ' a en içten teşekkürlerimi sunarım. Gerek deneyimlerini gerek bilgilerini paylaşmaktan kaçınmayan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Mucip GENİŞEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı birlikte yürüttüğümüz benden bilgi ve birikimini esirgemeyen çalışmalarımın her anında bana destek, yol gösterici ve öğretici olan hayatıma katkıları ve bana karşı sevgi dolu tavrı ile tüm yaşantım boyunca saygı, sevgi ve minnetle hatırlayacağım çok kıymetli ablam Öğr. Gör. Dr. Hülya TÜRK' e en içten teşekkürlerimi sunarım. Maddi manevi desteğiyle yanımda olan değerli ablam Öğr. Gör. Zeynep KILIÇ' a teşekkürlerimi sunarım. Moleküler çalışmalarımnda yardımını esirgemeyen değerli İsmail Hakkı Taş' a teşekkür ederim.

Her anımda yanımda olan varlığıyla beni güçlendiren canım arkadaşım Esmâ UÇAR 'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Değerli arkadaşım Rufina Aidynova' a ve her zaman yanımda olan değerli kuzenim Nazlı Çelik'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Sabrı, özeni ve hayatıma kattıkları ile her anımda yanımda olan ve beni her zaman destekleyen kıymetli yol arkadaşım Hakan ERGE 'ye en içten şükranlarımı sunarım.

Birlikte bir ömrü paylaştığım en güzel günleri birlikte geçirdiğim zorlukların üstesinden geldiğim çok değerli ailem; anne kelimesinin en güzel karşılığı olan annem Ümmühan KARAYEL, Değerli Babam Murat KARAYEL ve Canım kardeşim Kamil Can KARAYEL' e teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan varlıklarını desteklerini hissettiğim değerli dedelerim Kamil KARAYEL ve İsmet KIŞLA ' ya, Canım Babaannem Pembe KARAYEL ve Canım anneannem Dudu KIŞLA ' ya en içten şükranlarımı sunarım. Her zaman destekçim olan kıymetli teyzelerim Emine Kışla ve Aysun Çelik' e kıymetli enişterim Yusuf KIŞLA ve Orhan ÇELİK' e teşekkür ederim. Eğitim hayatıma vermiş olduğu destekler için kıymetli dayım Ceyhan KIŞLA' ya ve değerli dayım Akın KIŞLA' ya teşekkür ederim. Eğitim yaşantım boyunca benden desteğini esirgemeyen değerli halam Gülay KARAYEL BEKTAŞ' a teşekkür ederim. Kıymetli amcam ve yengem Sevgi-Hasan KARAYEL ' e her zaman yanımda oldukları için teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımnda kullandığım tohumları temin eden May Tohumculuğa teşekkür ederim.

Ümran KARAYEL
Eylül, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	17
2.1.1. Antioksidan Enzimler.....	17
2.1.2. Süperoksit dismutaz (SOD) (EC 1. 15. 1. 1).....	17
2.1.3. Peroksidaz (POD) (EC 1.11.1.7).....	18
2.1.4. Katalaz (CAT) (EC 1. 11. 1. 6).....	19
2.1.5. Askorbat peroksidaz (APX) (EC 1. 11. 1. 11).....	20
2.1.6. Glutasyon redüktaz (GR) (EC 1. 6. 4. 2).....	21
2.2. Antioksidan Bileşikler.....	22
2.2.1. Glutasyon.....	22
2.2.2. Askorbat (L-Askorbik Asit, C Vitamini).....	23
2.3. Sitrat Sentaz (CS) (EC 2.3.3.1).....	25
2.4. Sitokrom Oksidaz (COX; EC 1.9.3.1).....	27
2.5. İso-sitrat Liyaz (EC 4.1.3.1) ve Malat Sentaz (EC 2.3.3.9).....	28
2.6. Piruvat Dehidrogenaz (EC 1.2.4.1).....	31
2.7. ATP Sentaz (EC 7.1.2.2.).....	34
2.8. α -Amilaz (EC 3.2.1.1).....	35
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	38
3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	38
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanma Koşulları.....	38
3.3. Yöntemler.....	44
3.1.1. Bitkilerin temin, büyütme ve lipoik asit uygulama koşulları.....	44
3.3.2. Kök ve gövde uzunluklarının belirlenmesi.....	44

3.3.3. Çimlenme yüzdesinin belirlenmesi	45
3.3.4. Çözünebilir protein miktarının tayini	45
3.3.5. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi	46
3.3.5.a. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi.....	46
3.3.5.b. Guaikol Peroksidaz (GPX) aktivitesinin belirlenmesi	47
3.3.5.c. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi.....	48
3.3.5.d. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tayini	48
3.3.5.e. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin tayini	49
3.3.6. Antioksidan maddelerin içeriklerinin belirlenmesi	49
3.3.6.a. Glutasyon ve askorbik asit ekstraksiyonu	49
3.3.6.b. Glutasyon (GSH) ve GSSG içeriğinin belirlenmesi	49
3.3.6.c. Askorbik asit (ASC) içeriğinin belirlenmesi	50
3.3.7. Total karbohidrat içeriğinin belirlenmesi	51
3.3.8. Fenolik madde içeriğinin belirlenmesi	52
3.3.9. Çimlenme parametrelerinin belirlenmesi	53
3.3.9.a. α -Amilaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	53
3.3.9.b. İsozitat liyaz ve Malat sentaz enzimlerinin ekstraksiyonu.....	54
3.3.9.c. İsozitat enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	54
3.3.9.d. Malat sentaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	54
3.3.10. Mitokondri izolasyonu	55
3.3.11. Sitrat sentaz aktivitesinin belirlenmesi.....	55
3.3.12. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE).....	55
3.3.13. Amilaz izoenziminin belirlenmesi.....	56
3.3.14. RNA izolasyonu ve gen analizleri	57
3.4. İstatistiksel analiz	58
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	59
4.1. Lipoik Asidin Kök ve Gövde Uzunlukları Üzerine Etkisi	60
4.2. Lipoik Asidin Çimlenme Yüzdesi Üzerine Etkisi	61
4.3. Lipoik Asidin Çözünebilir Protein Miktarı ve Protein Profili Üzerine Etkisi.....	61
4.4. Lipoik Asidin Total Karbohidrat İçeriğinin Belirlenmesi	63
4.5. Antioksidan Sistem Üzerine Etkileri	64
4.5.1. Lipoik asidin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi.....	64

4.5.1.a. SOD aktivitesi üzerine etkisi	64
4.5.1.b. CAT aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi	65
4.5.1.c. APX aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi	66
4.5.1.d. GPX aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi	67
4.5.1.e. GR aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi	68
4.5.2. Antioksidan maddeler üzerine etkisi	69
4.5.2.a. Total AsA, AsA ve DHA içerikleri ve DHA/AsA oranı üzerine etkisi.....	69
4.5.2.b. Total GSH, GSH ve GSSG içerikleri ve GSSG/GSH oranı üzerine etkisi ...	72
4.5.2.c. Fenolik madde içeriği üzerine etkisi.....	76
4.6. Lipoik asidin çimlenme enzimleri üzerine etkisi	77
4.6.1. İzositrat liyaz aktivitesi üzerine etkisi	77
4.6.2. Malat sentaz aktivitesi üzerine etkisi.....	78
4.6.3. Amilaz aktivitesi ve izoenzimi üzerine etkisi.....	79
4.7. Sitrat sentaz aktivitesi üzerine etkisi	81
4.8. Lipoik asit uygulamalarının Gen İfadeleri Üzerine Etkileri.....	82
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	85
KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ	106

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APX	: Askorbat peroksidaz
ASA	: Askorbik asit
DHA	: Dehidroaskorbik asit
DHLA	: Dihidrolipoikasit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutasyon
LA	: Lipoik asit
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
nmol	: Nano mol
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
POD	: Peroksidaz
PVP	: Polivinilpirrolidon
ROT	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Devir/dakika
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiobarbutirik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
U	: Enzim ünitesi
x g	: Yerçekimi ivmesinin katı
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Çimlenmekte olan yağlı tohumların endosperm içindeki gliksilat döngüsü ..4	
Şekil 1.2. Alfa lipoik asidin R ve S formlarının kimyasal yapıları.....7	
Şekil 1.3. Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin kimyasal yapıları8	
Şekil 1.4. Antioksidan metabolitlerin yeniden oluşturulmasında rol oynayan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sisteminin şematik gösterimi.. ...9	
Şekil 1.5. Oktanoik asitten Lipoik asit üretimi 12	
Şekil 1.6. Lipoik asit ile tiyol / disülfür değişimi, hücrenin enerjisini ve redoks durumunu modüle etmenin temelini oluşturur. 12	
Şekil 1.7. Lipoik asit in hücre alımı ve salınımı, ve hücre dışı redoks durumunun değiştirilmesi. 14	
Şekil 1.8. α - ketoik asit dehidrogenaz kompleksi 15	
Şekil 2.1. Askorbat-glutasyon çemberinde görevli enzimler25	
Şekil 2.2. Sitrat sentaz aktivitesi şeması26	
Şekil 2.3. Gliksilat döngüsünde izositrat liyaz.....29	
Şekil 2.4. Gliksilat döngüsünde malat sentaz29	
Şekil 2.5. Gliksilat döngüsü 31	
Şekil 2.6. Pirüvat dehidrogenaz kompleksi33	
Şekil 3.1. Protein tayininde kullanılan standart grafik.....46	
Şekil 3.2. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik47	
Şekil 3.3. Glutasyon içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik 50	
Şekil 3.4. Askorbik asit içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik51	
Şekil 3.5. Total karbohidrat içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik 52	
Şekil 3.6. Fenolik madde içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik53	
Şekil 4.1. Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde uzunluğu üzerine etkisi..... 60	
Şekil 4.2. Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının kök, gövde ve endosperm dokularının protein içeriği üzerine etkisi..... 62	
Şekil 4.3. Lipoik asitin kök dokusunda protein profili üzerine etkisi.....62	
Şekil 4.4. Lipoik asitin gövde dokusunda protein profili üzerine etkisi 63	

Şekil 4.5. Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının kök, gövde ve endosperm dokularının karbohidrat içeriği üzerine etkisi.....	64
Şekil 4.6. Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi	65
Şekil 4.7. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında CAT aktivitesi üzerine etkisi	66
Şekil 4.8. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında APX aktivitesi üzerine etkisi	67
Şekil 4.9. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında GPX aktivitesi üzerine etkisi	68
Şekil 4.10. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında total AsA içeriği üzerine etkisi	69
Şekil 4.11. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında indirgen AsA içeriği üzerine etkisi	70
Şekil 4.12. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde DHA içeriği üzerine etkisi.....	71
Şekil 4.13. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde DHA/AsA içeriği üzerine etkisi.....	72
Şekil 4.14. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında total GSH içeriği üzerine etkisi	73
Şekil 4.15. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında GSH içeriği üzerine etkisi	74
Şekil 4.16. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında GSSG içeriği üzerine etkisi	75
Şekil 4.17. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövdede GSSG/GSH içeriği üzerine etkisi.....	76
Şekil 4.18. Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında fenolik madde içeriği üzerine etkisi.....	77
Şekil 4.19 Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının endosperm dokularında izositrat liyaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	78
Şekil 4.20. Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının endosperm dokularında malat sentaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	79

Şekil 4.21. Lipoik asitin amilaz izoenzimi üzerine etkisi	80
Şekil 4.22. Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının endosperm dokularında amilaz aktivitesi üzerine etkisi	81
Şekil 4.23. Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında Sitrat sentaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	82
Şekil 4.24. Mısır bitkilerinde köklerde sitrat sentaz, sitokrom oksidaz, ATP sentaz ve prüvat dehidrogenaz proteinlerinin gen ekspresyonları üzerine Lipoik asit uygulamalarının etkisinin clustergram ile ifadesi.....	83
Şekil 4.25. Mısır bitkilerinde gövdede sitrat sentaz, sitokrom oksidaz, ATP sentaz ve prüvat dehidrogenaz proteinlerinin gen ekspresyonları üzerine Lipoik asit uygulamalarının etkisinin clustergram ile ifadesi.....	83
Şekil 4.26. Mısır bitkilerinde endospermde izositrat liyaz ve malat sentaz proteinlerinin gen ekspresyonları üzerine Lipoik asit uygulamalarının etkisinin clustergram ile ifadesi	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışılan genler, ID numaraları ve primer dizilimleri aşağıda yer alan tabloda verilmiştir	58
Çizelge 4.1. Deney grupları	59



1. GİRİŞ

Gıda kaynaklarının dengesiz dağılımı ve iklimsel faktörler gibi nedenler dünya nüfusunun yeterince beslenmesine olanak sağlayacak gıdaya ulaşmasını engellemektedir. Bunun sonucu olarak da tüm insanların yeterli miktarda ve kalitede gıdaya ulaşma hakkı en temel problemlerden biri olmuştur. Gıda ve Tarım Örgütü'ne (2016) göre hızla artmakta olan dünya nüfusu, günümüzde 7,5 milyarı geçmekte ve 2050 yılında 9,7 milyar olması beklenmektedir. Tüm bunların yanı sıra son 20 yılda elverişli arazilerinin % 15 inin kaybedildiği ve 2050 yılına kadar kişi başı 0,242 hektardan 0,18 hektara kadar azalacağı tahmin edilmektedir. Bununla birlikte nüfusun doğal kaynaklar üzerindeki artan baskıları, iklim değişikliğinin olumsuz yansımaları gibi nedenlerden dolayı ciddi tehlike altında olduğu uyarısında bulunmuştur (FAO 2018). Bu bakımdan bitkilerin varlıklarını sürdürebilmeleri, ekosistemin dengesi ve canlılığın devamlılığı için gereklidir. Ancak günümüzde nüfus artışı ile birlikte bireysel kitlesel talepler artmakta ve çeşitlenmektedir. Hızlı bir şekilde gelişen endüstri ve sanayileşme başta olmak üzere, giderek dengesizleşen çevresel koşulların da etkisiyle, canlıların büyüme, gelişme ve verimlilikleri önemli ölçüde sınırlandırılmaktadır (Rihan *et al.* 2017; Stutts *et al.* 2018).

Dünyada bilimsel çalışmalar ve teknolojik gelişmeler artan taleplere cevap verebilmek üzere gelişmektedir. Nitekim son yıllarda yapılmakta olan çalışmalar birim alandan maksimum ürün elde edilmesi, bitkilerin daha kaliteli besin kaynağı olarak değerlendirilebilmesi için mevsimsel ve iklimsel değişikliklerin bitki yetiştirilmesi üzerinde yaptığı olumsuz etkilerin minimize edilmesi gibi alanlara odaklanmıştır.

İnsan beslenmesinde önemli bitki türlerinden bir tanesi de mısır bitkisidir. Mısır, insan tüketimi, hayvansal yemler için son derece arzu edilir kılan temel özelliklere sahip olması ve çok geniş endüstriyel kullanım alanına sahip olması nedeniyle küresel olarak kritik öneme sahiptir. (Crutzen *et al.* 2008).

Mısırın tanesinden elde edilen nişasta, glikoz ve mısırözü yağı da ekonomide ham madde açısından büyük önem taşımaktadır. Ayrıca ülkemizde mısır tarımı, hayvansal protein üretimine büyük ölçüde katkıda bulunmaktadır.

Mısır bitkisi, dünyada 177 milyon hektar arazide üretilmektedir ve bu alandan yılda yaklaşık 886 milyon ton mısır elde edilmektedir (Taşdan, 2013). Ülkemizde mısır, buğday ve arpadan sonra en çok üretilen bitki türüdür. Yaklaşık 615 bin hektar arazide üretimi yapılmaktadır ve bu alandan yaklaşık 5.6 milyon ton mısır elde edilmektedir (TUİK, 2018).

2020 yılına kadar gelişmekte olan ülkelerde mısıra olan talebin buğday ve pirincin önüne geçmesi ve yıllık mısır ihtiyacının 837 milyon tona kadar artması beklenmektedir (Rosegrant *et al.* 2001). Artan ihtiyacın çoğu, mevcut işlenebilir topraklardaki yoğunlaştırılmış üretim ile yerel kaynaklardan karşılanacaktır (Rosegrant and Cline, 2003).

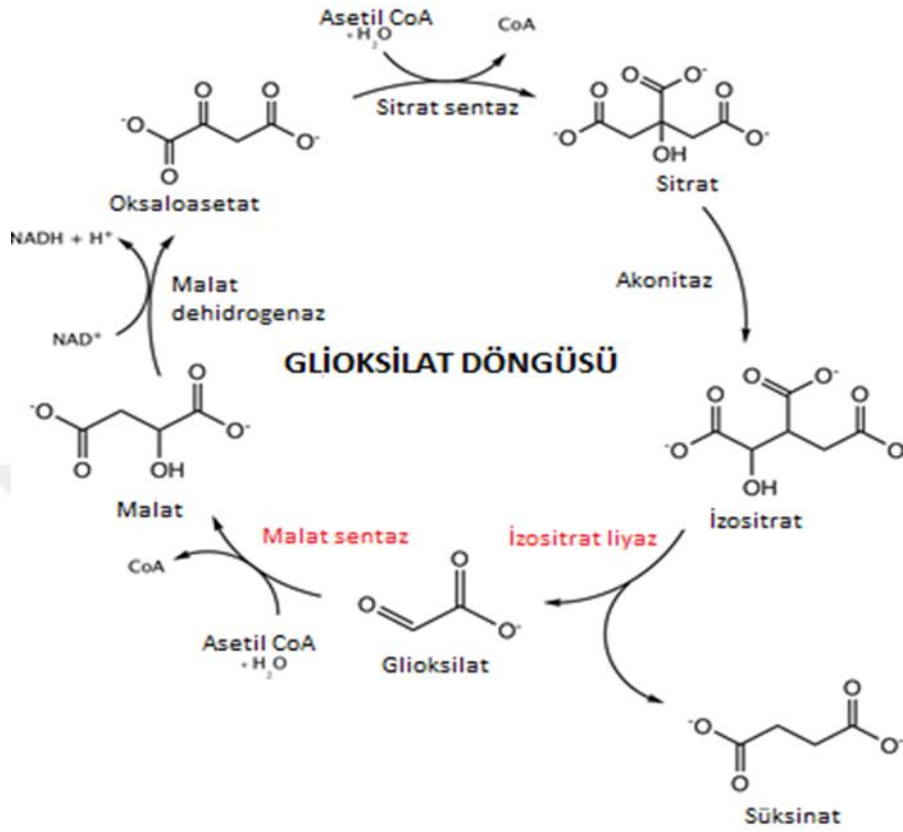
Bitki yaşam döngüsünün en hassas aşamalarından biri tohumun çimlenmesidir. Tohum çimlenmesi ve çimlenme sonrası morfolojisi, fizyolojisi, anatomisi ve biyokimyasının çok iyi ortaya konulması gerekmektedir. (Mooring *et al.* 1971; Bozcuk, 1978).

Çimlenme, bitkilerin uykudan uyanarak yaşamaya, büyüme ve gelişmeye başlaması anlamına gelen önemli bir olaydır. Tohum, çiçekte meydana gelen döllemeden sonra gelişen tohum taslağı içerisinde meydana gelen embriyo ve etrafındaki besi dokudan (endosperm) oluşan bir yapıdır. Besi doku içerisinde, ileride çimlenme safhasına geçecek olan embriyonun ihtiyaçlarını karşılamak üzere nişasta, yağ ve protein gibi organik maddeler depolanmıştır. Çimlenme esnasında birçok fizyolojik ve biyokimyasal olayların gerçekleştiği tohumda büyümeyle doğrudan ilgili olan kısım embriyodur. Embriyodaki meristem hücrelerinin bölünüp çoğalması ile yeni bir yavru bitki oluşmaya başlar. Yani bitkinin oluşumunda temel basamak tohumun çimlenmesidir (Envari, 1984).

Birçok gıda bitkisi tohumlar tarafından çoğaltılır (Laidman and Tavener, 1971; Landolt and Matile, 1990) Bazı bitkilerin tohumlarında depo maddesi olarak daha ziyade, karbohidrat değil de yağların depo edildiği bilinmektedir. İşte, bu tür tohumlarında yağ depo eden bitkilerinin çoğunun tohumları, bu bitkilere özgü olarak, glikosilat döngüsünün enzimlerinin aktivitesi sayesinde çimlenebilmektedir. Lipit bakımından zengin olan bu gruptaki bitki tohumlarında, glikosilat döngüsü önemli bir rol oynar, çünkü çimlenme fazında, tohumun besi dokusunda depo edilmiş olan lipidler bu döngünün aktif hale gelmesi sayesinde, embriyonun büyümesi için ihtiyaç duyduğu şekerler, lipidlerden sentezlenmektedir. Bu döngü Şekil 1.1 'de gösterildiği gibi, yağ asitlerinin beta oksidasyona uğratılması sonucu oluşan esterlenmiş olmayan yağ asitlerinin beta oksidasyonu ile üretilen Asetil-CoA'nın glioksizomlara girmesi ile başlar (Firenzuoli *et al.* 1968).

Glioksizomlarda bulunan izositrat liyaz ve malat sentataz enzimleri sayesinde, Asetil CoA süksinata dönüştürülür ve mitokondriye gönderilerek orada, Krebsin birkaç reaksiyonu ve glikoliz olayının tersi reaksiyonlarla şekerlere dönüştürülürler. Bu açıdan ele alındığında, Glikosilat döngüsünün Krebs döngüsüne (anaplerotik fonksiyon) ara moleküller sağladığı belirtilmektedir.

İzositrat liyazı (ICL) ve malat sentaz (MS), glikosilat döngüsünün temel enzimleridir ve lipit bakımından zengin tohumların çimlenme durumunu gösteren mükemmel moleküler markörlerini temsil eder. Glioksizomda ki tohum çimlenmesi sırasında artarlar, çimlenmenin başlangıcından itibaren aktiviteleri artmaya devam eder, daha sonra çimlenme sonunda azalır ve yok olurlar (Cioni *et al.* 1981). Bu enzimler çimlenme aşaması, embriyonun büyümesi, protein sentezinin aktivasyonu ve ilerlemesi ile lipid kaynaklarının tükenmesi ile ilgilidir (Firenzuoli *et al.* 1968).



Şekil 1.1. Çimlenmekte olan yağlı tohumların endosperm içindeki glioksilat döngüsü

Tohum su alınca, solunum, protein sentezi ve diğer biyokimyasal olaylar gerçekleşmeye başlar. Böylece embriyonun radikula kısmı gelişip tohum kabuğundan çıkar ve böylece tohum çimlenmiş olur (Envari 1984; Pakhomov *et al.* 1999). Radikulanın tohum kabuğundan çıkışı çimlenmenin gözle görülen kısmını oluşturur. Bu aşamadan öncesinde, hormonlar ve enzimlerin etkisiyle tohum içerisinde gözle görülmeyen birçok biyokimyasal olayların vuku bulduğu olaylar meydana gelmektedir.

Konunun daha iyi anlaşılabilmesi için, çimlenme olayı, 2 aşamaya ayrılarak ele alınmaktadır: Bunlar 1. Çimlenme öncesi veya çimlenme sırasındaki fizyolojik ve biyokimyasal olayların gerçekleşmeye başladığı safha ve 2. Radikulanın büyüyerek tohum kabuğunu yırtarak dışarı çıktığı safhalardır. Radikulanın çıkışından sonraki fide

gelişimi ise çimlenme sonrası büyüme olarak nitelendirilmektedir (Pakhomov *et al.* 1999).

Tüm canlı organizmalar büyümek ve üremek, yapılarını korumak ve çevrelerine cevap vermek için enerjiye ihtiyaç duyarlar. Metabolizma, organizmaların moleküllerde depolanan kimyasal enerjiyi hücresel işlemler için kullanılabilir enerjiye dönüştürmesini sağlayan, yaşamı sürdüren kimyasal süreçler kümesidir.

Heterotrof canlılar, enerjisini organik maddelerden sağlayan organizmalar, metabolik faaliyetlerini yürütebilmek için ihtiyaç duydukları enerji ve yapı maddelerini temin etmek üzere; çevrelerindeki suya ve bitkisel-hayvansal gıdalara ihtiyaç duyarlar. Bu gıdaların yapısında bulunan kimyasal enerjiyi, kendi yapılarında kullanabileceği şekle dönüştürebilmesi için solunum adı verilen katabolik reaksiyonlardan oluşan bir metabolik süreci gerçekleştirmeleri gereklidir. Oysa Ototrof organizmalar (enerji kaynağı olarak güneş enerjisini kullanabilen canlılar, bitkisel organizmalar), fotosentez olayı sayesinde, ışık enerjisi glukoza dönüştürülür ve sonrasında yine solunum olayıyla kullanabilecekleri enerji formu olan bu karbohidrat, protein ve yağlar kullanılarak ATP sentezi yapabilirler (Anonim,2019).

Lipoik asit (LA; 6,8-tiyotik asit veya 1,2-ditiolan-3-pentanoik asit), enerji üretimi ve metabolizmada yer alan pirüvat ve glisin metabolizmasında önemli fonksiyonlara sahip olan, ayrıca bazı enzimlerin (pirüvat dehidrogenaz kompleksi ve glisin dekarboksilaz kompleksi, ve a-ketoglutarat dehidrogenazın) kofaktörü olarak işlev gören, kükürt içeren 8 karbonlu bir disülfid molekülüdür (Xiao *et al.* 2018). Piruvat dehidrogenaz ve glisin dekarboksilaz gibi bazı mitokondriyal enzim komplekslerinin bir bileşeni olduğu (Gueguen *et al.* 2000) tarafından da bildirilmiştir.

α -ketoasitlerin dekarboksilasyonunda ve glisin parçalama sisteminde yer alan enzim komplekslerinin aktivitesi için müşterek bir faktör olarak gereklidir. Enerji metabolizmasındaki rolünün yanı sıra LA, doğrudan reaktif oksijen türlerini (ROS)

detoksifiye eder ve glutatyon, askorbat ve tokoferol gibi diğer oksitlenmiş antioksidanların geri dönüşümünde önemli bir rol oynar. (Navari-Izzo *et al.* 2002).

İlk olarak 1937'de *Lactobasillus'un* gelişimi için gerekli olan, growth faktör denen patates ekstresinin bir komponenti olarak keşfedilmiştir (Snell *et al.* 1937). 1951'de Reed tarafından karaciğerden izole edilmiştir (Reed *et al.* 1951). İlerleyen yıllarda LA 'in kimyasal yapısı belirlenmiş ve sentezlenmesi gerçekleştirilmiştir. Hayvansal ve bitkisel dokularda mitokondride bir takım enzimatik reaksiyonlarla oktanoik asit ve sisteinden sentezlenebilmektedir (Szelag *et al.* 2012). Karaciğer, böbrek, akciğer ve kalp gibi hayvansal dokuların yanı sıra brokoli, ıspanak ve domates gibi bitkisel dokular da lipoik asidin en önemli doğal kaynaklarından (Kramer 2001).

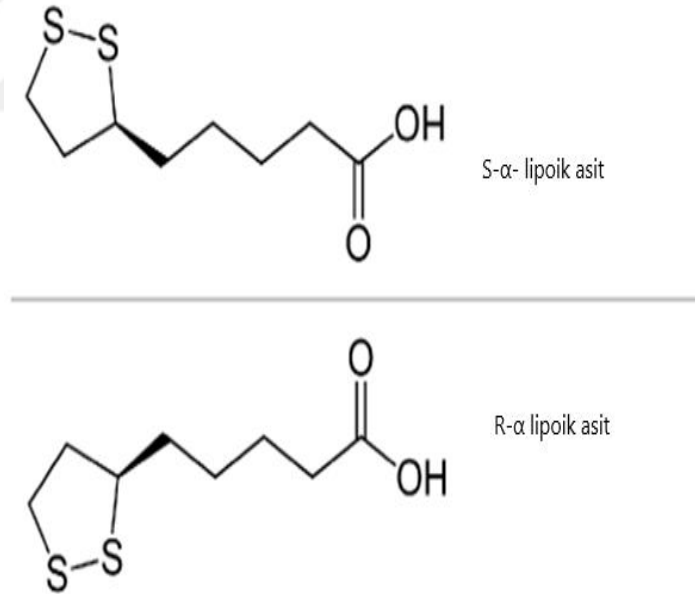
E. coli'de LA, açıl taşıyıcı proteine (ACP) bağlı oktanoil grubuna iki kükürt atomunun eklenmesiyle oktanoik asitten sentezlenmektedir. Bu reaksiyon, *lipA* tarafından kodlanan lipoik asit sentaz ile katalize edilmektedir (Miller *et al.* 2000). Ökaryotik hücrelerde, mitokondride sentezlenen yağ asitlerinin büyük bir kısmının LA biyosentezi için kullanılabileceği bildirilmektedir ve bir lipoil asit sentazı ile bir lipoil grubunu lipoil-ACP' den apoproteinlere aktarabilen bir lipoiltransferazın mitokondride bulunduğu rapor edilmektedir (Yasuno *et al.* 1998 ; Gueguen *et al.* 2000; Wada *et al.* 2001; Morikawa *et al.* 2001).

Lipoik asidin mitokondride sentezlendiği ve kofaktör olarak bir lipoik asit gerektiren mitokondriyal enzim komplekslerinin lipolasyonunda kullanıldığı bununla birlikte, bitki hücrelerinde, bir kofaktör olarak lipoik asit gerektiren enzim komplekslerinden biri olan PDH kompleksinin, sadece mitokondride değil, aynı zamanda plastidlerde de lokalize olduğu rapor edilmiştir (Lernmark *et al.* 1994; Mooney *et al.* 1999).

Bu bulgular, bitkilerde lipoik asidin sadece mitokondride değil, aynı zamanda plastidlerde sentezlenmesi veya sadece mitokondride sentezlenmesi, daha sonra plastidlere taşınması ve plastidlerde PDH kompleksinin E2 alt ünitesinin lipolasyonu için kullanılması olasılığını arttırmaktadır. Nitekim daha sonraki araştırmalarda,

bitkilerde LA biyosentezinin sadece mitokondrilerde değil, plastitlerde de gerçekleştiği bildirilmiştir (Wang *et al.* 1991).

Lipoik asit, asimetrik karbon atomunun varlığından dolayı, optik olarak aktif bir bileşiktir. Doğal olarak sentezlenen lipoik asit, R konfigürasyonundadır ve dekstrorotatiftir. Lipoik asidin doğal olan R formu, farklı mitokondriyal proteinlerin lizin kalıntılarının ϵ -amino gruplarına kovalent bağ ile bağlanabilmektedir. Alfa lipoik asidin R- α lipoik asit ve S- α - lipoik asit olarak iki enantiyomeri vardır. Bu iki form, aynı sayı ve pozisyonda atom içerir, fakat moleküllerinde atomlarının farklı düzenlenmeleri söz konusudur. Hem R, hem de S formları izomerdir (Tritschler 1997). Doğal lipoik asidi elde etmek oldukça zordur. Sentetik lipoik asit, bu iki enantiyomerin yarı yarıya karışımından oluşur (Tritschler 1997).

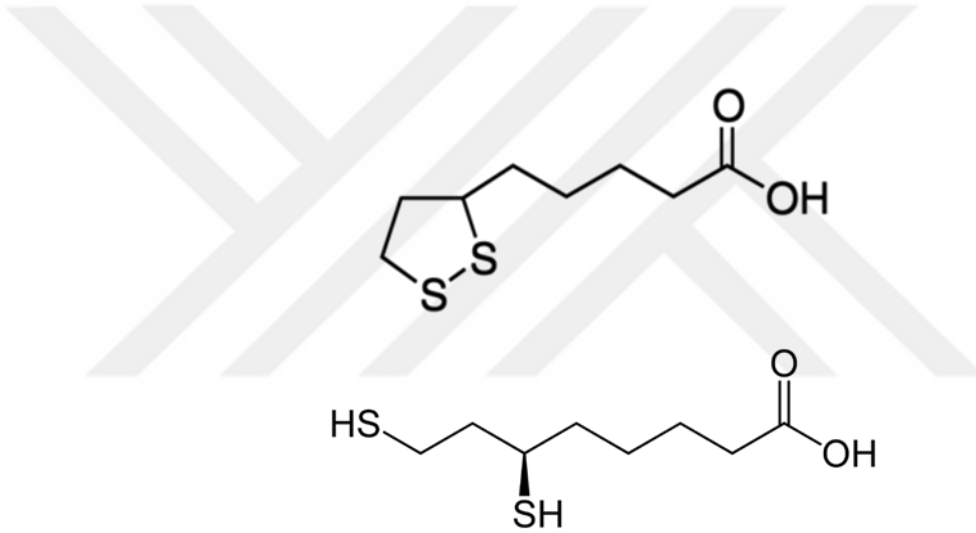


Şekil 1.2. Alfa lipoik asidin R ve S formlarının kimyasal yapıları

Lipoik asitin iki formu vardır: 1. Alfa lipoik asit (ALA) ve indirgenmiş formu 2. dihidrolipoik asit (DHLA) (Şekil 1.3). Okside LA formunda ki 6. ve 8. pozisyonlarda bulunan kükürtler kapalı bir halka meydana getirir. İkinci form ise açık zincir şeklinde

olan redükte lipoik asittir ve dihidrolipoik asit (DHHLA) adı verilmektedir. Bu formda 6. ve 8. pozisyonda bulunan kükürtler sülfidril grubu halinde bulunmaktadır.

LA'in bu iki formu, oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ile birbirine dönüşebilmektedir (Gözükara 1989). Hem redükte hem de okside formlar, biyolojik aktivite göstermesine rağmen, DHHLA biyolojik olarak daha aktif form olarak kabul edilmektedir. Bir başka deyişle DHHLA, lipoik asit'in protonlanmış halidir ve pH: 4,7 ve üzerindeki fizyolojik koşullar altında esas form olan LA'ya dönüştüğü bilinmektedir (Bullock 1954).

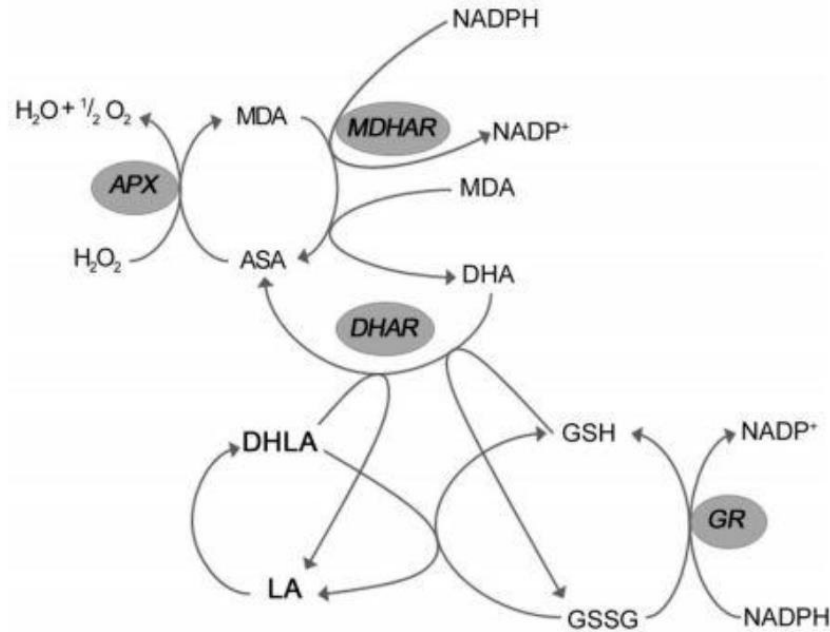


Şekil 1.3. Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin kimyasal yapıları

Bu formlar serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini, oksidatif stresi zayıflatan, metal iyonlarını şelatlayan, endojen antioksidanların rejenerasyonunu teşvik edebilen, serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini giderebilen güçlü antioksidan özelliklerine sahiptir (Biewenga *et al.* 1997; Tao and Huang 2004; Xiao *et al.* 2018).

Ayrıca, lipoik asit hem suda, hem de yağda çözünür özelliklere sahip olan tek antioksidandır. Suda çözünen antioksidanlar (sadece sitoplazmaya etki eder) yağda çözünen antioksidanlar (sadece hücre zarına etki eder) ile zıtlık göstermektedir. Lipoik asit ise, hem sitoplazmada ve hem de hücre zarında aynı anda işlev görebilmektedir ve çift koruma rolü oynamaktadır (Celik *et al.* 2002).

Genellikle, antioksidan maddeler, indirgenmiş formlarında antioksidan özelliklere sahiptir. LA hem indirgenmiş hem de oksitlenmiş formlarında koruyucu işlevler sürdürmektedir. LA'ya göre daha düşük redoks potansiyeline sahip olan DHLA glutasyon ve askorbatı indirgeyebilir (Gossett *et al.* 1994). Hidroperoksil, singlet oksijen ($1O_2$), $O_2 \bullet^-$, $\bullet OH$ gibi reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde LA direkt olarak işlev görmektedir (Navari-Izzo *et al.* 2002). Sadece LA formu, tiyosülfatları ve tiyosülfonatları oluşturan singlet oksijen ile reaksiyona girme yeteneğindedir (Borbe and Ulrich 1989). LA, dehidrogenazın substratından $NAD(P)^+$ 'ye elektronları taşıyan, bir redoks çifti olarak fonksiyon gören farklı multienzim komplekslerini kapsamaktadır (Navari-Izzo *et al.* 1988). Böylece GSH ve AsA'nın okside formlarına (GSSG ve DHA) bir elektron vererek bu bileşiklerin indirgenmesini sağlayabilmektedir (Şekil 1.4) (Biewenga *et al.* 1997). İndirgenmiş form olan DHLA'nın hayvan mitokondrilerinde lipid peroksidasyonuna karşı hücrelerin korunmasında rol oynadığı gösterilmiştir (Lapenna *et al.* 2003). Lipoik asitin buğday, patates, domates ve kuşkonmaz gibi bitki türlerinde de var olduğu belirlenmiştir (Navari-Izzo *et al.* 2002, D'Amico *et al.* 2003, Sgherri *et al.* 2007, 2008).



Şekil 1.4. Antioksidan metabolitlerin yeniden oluşturulmasında rol oynayan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sisteminin şematik gösterimi.

APX, askorbat peroksidaz; AsA, indirgenmiş askorbat; DHA, dehidroaskorbat; DHAR, dehidroaskorbat redüktaz; DHLA, dehidrolipoik asit; GR, glutasyon redüktaz; GSH, indirgenmiş glutasyon; GSSG, okside glutasyon; LA, okside lipoik asit; MDA, monodehidroaskorbat; MDHAR; monodehidroaskorbat redüktaz.

Antioksidan aktivite göreceli bir kavramdır, bu oksidatif stres ve okside substrat tipine bağlıdır. Bir bileşiğin antioksidan potansiyelini değerlendirirken,

1. Serbest radikal temizlemenin özgüllüğü,
2. Diğer antioksidanlarla etkileşimi,
3. Metal şelatlama aktivitesi,
4. Gen ifadesi üzerindeki etkileri,
5. Biyoyararlanımı gibi kriterler
6. Lokasyon (sulu veya membran bölgelerinde veya her ikisinde) ve
7. Oksidatif hasarı onarma kabiliyeti göz önünde bulundurulmalıdır (Navari-Izzo 2002).

Bir antioksidanın, oksidatif stresin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynayabilmesi için sadece yukarıda belirtilen kriterlerden birkaçını karşılaması gerekmektedir. Örneğin, E vitamini sadece membran veya lipid alanlarında etki eder, baskın etkisi lipid peroksil radikallerini süpürmektedir ve sulu fazdaki radikallere karşı çok az aktiviteye sahiptir veya hiç aktivitesi yoktur, ancak vücudun merkezi antioksidanlarından biri olarak kabul edilmektedir (Packer *et al.* 1994).

Mitokondriyal dehidrojenaz reaksiyonlarında önemli bir rol oynayan a-Lipoik asit, son zamanlarda bir antioksidan olarak büyük ilgi görmüştür. Lipoik asit ve indirgenmiş formu dihidrolipoik asit, süperoksit radikalleri, hidroksil radikalleri, hipokloröz asit, peroksil radikalleri ve tekli oksijen gibi reaktif oksijen türleriyle reaksiyona girer. Aynı zamanda, C vitamini ve glutatyon ile etkileşime girerek zarları korur, bu da E vitamini geri dönüşümü sağlayabilir. Antioksidan aktivitelerine ek olarak, dihidrolipoik asit, demirin indirgenmesi yoluyla proksidan etki gösterebilir.

a-Lipoik asit uygulamasının, iskemi-reperfüzyon hasarı, diyabet (hem a-lipoik asit hem de dihidrolipoik asit gibi) hem oksidatif stres modellerinde, hem de glikasyon reaksiyonlarını önleyebilen albümin gibi hidrofobik bağlanma sergilediği gösterilmiştir., katarakt oluşumu, HIV aktivasyonu, nörodejenerasyon ve radyasyon hasarı ayrıca, lipoat, miyogloblin, prolaktin, tioredoksin ve NF-κB transkripsiyon faktörü gibi proteinlerin redoks düzenleyicisi olarak da işlev görebilir (Packer *et al.* 1995). ALA,

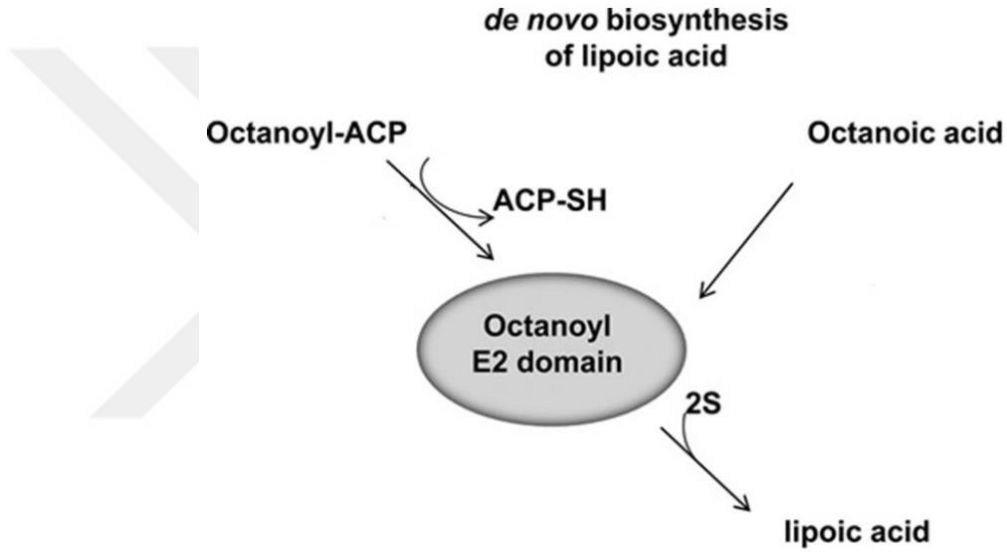
antioksidanlar arasında, her iki formunda da (düşük dihidrolipoik asit, DHLA ve okside lipoik asit) güçlü antioksidan özelliklere sahiptir (Navari-Izzo ve ark. 2002).

Hayvanlarda, serbest ALA ve DHLA, glutatyon ve B ve C vitaminleri gibi diğer antioksidanları geri dönüştürmek için reaktif oksijen türlerini (ROS) detoksifiye edebilen metabolik antioksidanlardır. Serbest ALA ve DHLA, büyüme ve metabolizmanın yanı sıra büyüme ve metabolizma düzenlemesinde rol oynayan genlerin ekspresyonunu arttırmıştır gen transkripsiyonunun redoks düzenlemesi olarak (Packer *et al.* 1995, 1997).

Enerji metabolizmasındaki temel rolüne ek olarak, LA, metal iyonlarını şelatlama, serbest radikalleri detoksifiye etme, oksidatif olarak zarar görmüş proteinleri tamir etme, lipid peroksidasyonunu inhibe etme gibi birçok faydalı özelliğinden dolayı "ideal bir antioksidan" olarak kabul edilir. Askorbat (AsA), glutatyon (GSH) ve tokoferol gibi okside olmuş antioksidanlar, okside edilmiş formlarının indirgenmesi yoluyla (Navari-Izzo *et al.* 2002; Patrick 2002; Sears 2013; Gorcek and Erdal 2015) LA, hem lipit hem de sulu ortamlarda çözünür ve kolayca indirgenmiş dihidrolipoik asite (DHLA) dönüşebilir. Diferansiyel halkasının kimyasal reaktivitesi nedeniyle, hem indirgenmiş hem de oksitlenmiş formlarında güçlü redoks özelliklerine sahip antioksidanlar arasında eşsiz bir bileşiktir (Navari-Izzo *et al.* 2002; Yıldız vd. 2015; Görcek and Erdal 2015). Prokaryotik hücrelerde oktanoik asidin doğrudan bir lipoik asit ön maddesi olduğu, 6-tiyoktanoat ve 8-tiyoktanoatın lipoik asit biyosentezinde olası ara maddeler olduğu gösterildi (Parry and Trainor 1978; Parry 1983). Lipoik asit biyosentezinde yetersiz olan *E. coli'nin* mutant suşları, lipoik asit biyosentezinde yer alan birçok genin izole edilmesini sağlamıştır (Mengene and Lascelles 1967; Vanden *et al.* 1991). Ökaryotlarda lipoik asit, kovalent bağlarla beş farklı mitokondriyal proteinin bir lizin tortusuna bağlanır, sırasıyla piruvatın asetil-CoA ve α -ketoglutaratın süksinil-CoA içine oksidatif dekarboksilasyonunu katalize eder. (Reed 1974). Piruvat dekarboksilasyon reaksiyonunda lipoik asit lipolizini oluşturmak üzere, trapez enzimin yan zincirindeki lizine bağlanarak enzim ile birleşir. Bitkiler ayrıca klorofil piruvat dehidrojenaz içerir (Lernmark and Gardestrom 1994). Nihai lipoamid kısmı, bitkilerde glisin dekarboksilaz kompleksi olarak adlandırılan ve glisinin CO₂, amonyum ve metilen tetrahidrofolat

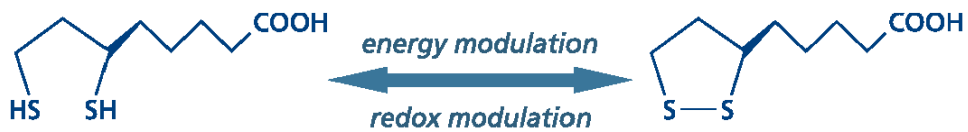
haline dönüştürülmesini katalize eden, glisin parçalama sisteminin bir parçası olan H-protein olarak bulunur (Lodge and Packer 1999).

Hem bitkilerin hem de hayvanların lipoik asidi oktanoik asitten (esansiyel bir yağ asidi) sentezleyebildiği kanıtlanmıştır (Carreau *et al.* 1979). Mitokondrinin, lipoik asidin sentezinde rol alabilen yağ asitlerini sentezleyebileceği bildirilmektedir (Wada *et al.* 1997).



Şekil 1.5. Oktanoik asitten Lipoik asit üretimi

Lipoik asidin bu etkileri, ortamın redoksunu ve enerji durumunu modüle eden tiyol / disülfür değişim reaksiyonları açısından mekanik olarak açıklanabilir (Şekil1.6). Enerji ve redoks bileşenleri, bir enerji redoks eksenine entegre edilmiştir; bu nedenle, mekanik olarak lipoik asit, birkaç alt hücre bölmesindeki her iki bileşeni de birlikte düzenlemektedirler (Packer 2010).



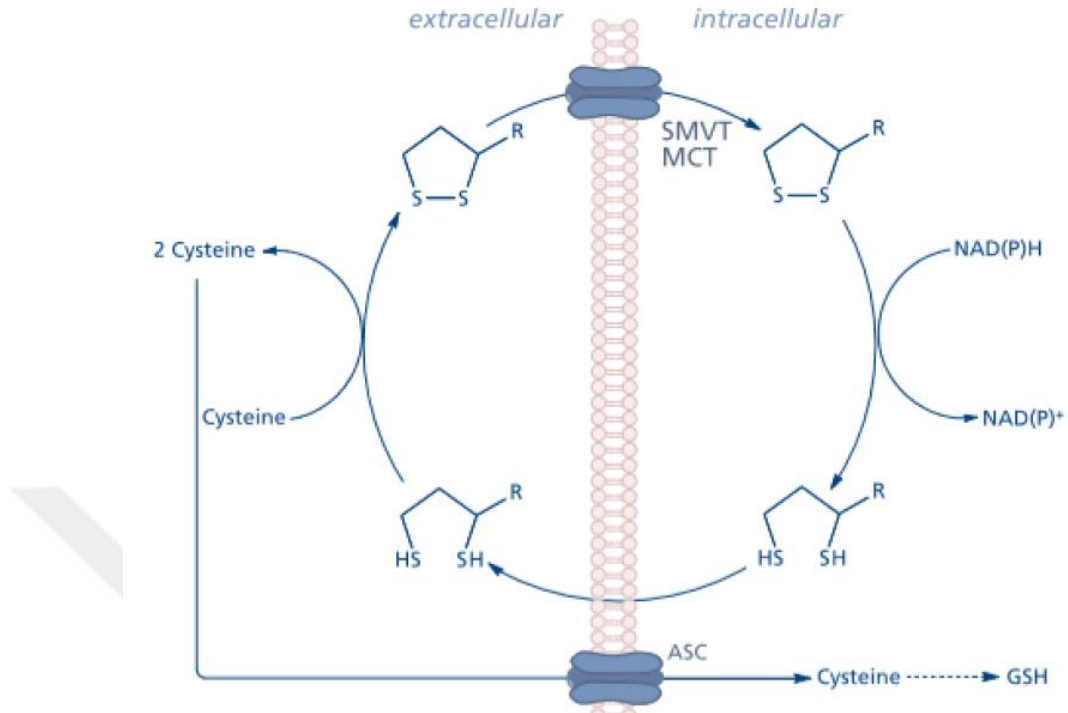
Şekil 1.6. Lipoik asit ile tiyol / disülfür değişimi, hücrenin enerjisini ve redoks durumunu modüle etmenin temelini oluşturur.

Lipoik asit, E ve C vitaminleri gibi diğer antioksidanları yeniden oluşturma, hücre içi GSH (glutatyon) seviyelerini artırma ve proteinlerin ve transkripsiyon faktörlerinin redoks düzenlemesini sağlama kabiliyetinden dolayı, antioksidan ağının kritik (hassas) bir bileşenidir (Packer 1995).

Bu aynı zamanda, antioksidan rejenerasyon döngüsünde sınırlandırıcı bir faktör olarak kaydedilen glutatyonun elde edilmesinde önemli bir basamaktır. Lipoik asit burada vitamin E'yi rejenere eden vitamin C ve glutatyon ile etkileşerek membranları korur.

Lipoik asit suda ve yağda çözünme özelliklerine sahip olduğundan lipid/su fazları arasındaki okside antioksidanların indirgenmesini mümkün kılar. Üstelik lipoik asitle tedavi in vivo ve in vitro glutatyon (GSH) düzeylerini yükseltir.

Hücre dışı tiyol / disülfid redoks ortamının (sistein /sistin çifti tarafından belirlenir), hücre proliferasyonunu, apoptozu, hücre adezyon moleküllerini ve proinflamatuvar sinyalleşmeyi modüle ettiği bildirilmiştir (Go *et al.* 2010). Lipoik asit, dihidrolipoik asit sisteinin sistine indirgenmesinde rol oynadığından hücre dışı redoks durumunu ayarlayabilmektedir (şekil 1.7). Sistein GSH sentezinde bir prekürsördür. Ayrıca sistein, sistinden on kat daha fazla hızla hücreye alınır ve GSH biyosentezini artırır. LA'nın sistini sisteine indirgeme özelliği GSH gibi güçlü bir antioksidan maddenin sentezine ciddi manada katkı sağlar (Han *et al.* 1995, 1997).

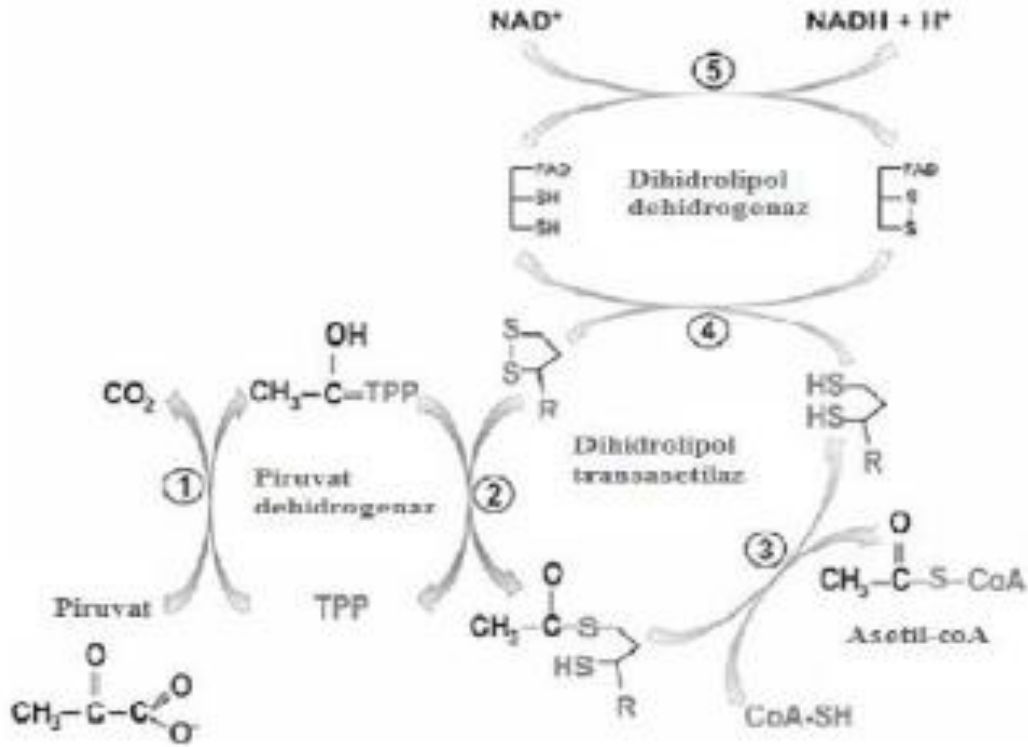


Şekil 1.7. Lipoik asit in hücresel alımı ve salınımı, ve hücre dışı redoks durumunun değiştirilmesi.

LA'nın karakteristik ditiyolan halka yapısı onun antioksidan özelliği için önemlidir. LA ışığı 330 nm civarında absorblar ve ditiyolan halka yapısı kolayca bozulabilir. Bu halka yapı UV altında bozulduğu anda LA / DHLA ya dönüşür ki bu onun antioksidan aktivitesinin daha da artmasına neden olur. Böylece LA bu özelliği ile UV hasarına karşı koruyucu bir rol üstlenir. UV radyasyonu karşısında ki LA davranışı onun doğal fotokimyasal reaksiyonudur. Bu reaksiyon ile UV hasarında meydana gelen singlet oksijen radikali ile S-O₂ bileşiği oluşturulur. Bu durum LA'nın bir singlet oksijen temizleyicisi olduğunun göstergesidir (Matsugo 2011).

Lipoik asit; enerji üretimi ve metabolizmada yer alan mitokondriyal enzimlerde bir kofaktör olarak görev yapan ve doğal olarak meydana gelen bir bileşiktir. Yani enerji oluşumunu içeren pirüvat dehidrogenaz kompleksinin bir parçasıdır (Storm and Müller 2012). Pirüvat dehidrogenaz solunum mekanizmasında glikoliz sonucu oluşan piruvatın krebs çemberine girebilmesi için asetil CoA oluşması aşamasında görev alan bir komplekstir. Bu komplekste üç enzim görev almaktadır.

Bu enzimlerden ilki piruvat dehidrogenazdır. Bu enzim piruvattan asetat oluşumunu katalizler ve bir mol CO₂ ortama verilir. Piruvat dehidrogenazın prostetik grubu tiyaminpirofosfatdır (TPP). Bu aşamada TPP'ya hidroksietil bağlanır ve bu grup ikinci aşamadaki dihidrolipol transasetilaz enziminin prostetik grubu olan lipoik aside devredilir. Lipoik asit bu enzimin protein grubundaki lizinin karboksil grubuna bir amid bağı ile kovalent olarak bağlanır. Piruvattan hidroksietil grubu LA'ya transfer edilince LA, DHLA'ya indirgenir ve hidroksietil grubu asetile yükseltgenir. Sonra asetil grubu DHLA'ya tiyoester bağı ile bağlanır. DHLA'ya bağlı asetil grubu CoA'nın sülfidril grubuna transfer edilir ve asetil-CoA oluşur. Asetil-CoA oluşumunda görevli α-ketoik asit dehidrogenaz kompleksindeki son enzim ise dihidrolipol dehidrogenazdır. Bu enzim ile DHLA ise LA'ya oksitlenir ve yükseltgeyici güç olarak NAD⁺'yi NADH'a indirger (Storm and Müller 2012).



Şekil 1.8. α- ketoik asit dehidrogenaz kompleksi

LA'nın çeşitli metabolik yollar ve hayvanlarda hastalıkların tedavisi üzerindeki etkileri hakkında çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, bitkilerde varlığı, etkisi ve

rolleri ile ilgili çalışmalar halen başlangıç aşamasındadır. İlk çalışmalarda, *Arabidopsis thaliana*'da LA'nın plastid ve mitokondride biyosentetik yolu araştırılmıştır. (Yasuno ve Wada 2002). Benzer şekilde, bakır stresli buğday fidelerinde ve sodyum tuzları stresli fesleğen tohumlarında LA ve DHLA'nın endojen içeriğindeki değişiklikler incelenmiştir (Sgherri *et al.* 2002; Tarchoune *et al.* 2013). Ayrıca, LA'nın, antioksidan özelliğine ek olarak metal iyonlarını şelatlama kabiliyetine sahip olduğu kanıtlanmıştır. (Sgherri *et al.* 2002).

Yakın zamanda yapılan bir başka çalışma, stresinde kanolada LA kaynaklı proteomik ve biyokimyasal tepkilere odaklanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, LA'nın fotosentez, enerji metabolizması, sinyal iletimi ve stres savunması gibi ana metabolik süreçlerle bağlantılı proteinler üzerinde önemli bir etkisi olduğunu ortaya koydu (Yıldız vd. 2015). Bununla birlikte bitkilerde dış kaynaklı olarak uygulanan LA'nın etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir.

Bitkilerde LA'nın stres şartlarına maruz kalan bitkilerin direnç mekanizmalarına etkileri göz önüne alındığında, daha birçok çalışmaya konu olacağı muhakkak gözükmemektedir. Ayrıca hem doğal bir vitamin olan, hem de kuvvetli bir antioksidan özelliğe sahip olan LA'nın zirai alanda kullanılabilir olma potansiyeli göz önünde tutulduğunda, hem normal koşullar altında hem de çeşitli çevresel streslere maruz kalan bitkiler üzerine etkilerinin detaylı bir şekilde araştırılması zorunluluğu vardır. Bitkilerde eksojen LA uygulaması ile ilgili yapılan çalışmalarda onun sadece antioksidan özelliğine odaklanılarak stresi yatıştırma üzerine etkileri çalışılmış olmakla birlikte, LA'nın asıl görev yeri olan enerji metabolizması üzerine etkileri ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle LA'nın etkilerinin doğrudan yada dolaylı olarak solunumla ilgili olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1.1. Antioksidan Enzimler

Güçlü bir elektron afinitesine sahip olması sebebiyle oksijen, oldukça reaktif bir moleküldür. Oksijenin suya redüksiyonu sırasında da oldukça güçlü reaktif ara bileşikler oluşmaktadır (Lledias *et al.* 1998). Oluşan reaktif oksijen türleri (ROT) miktarını kontrol etmek ve stres koşullarında hücreleri ROT etkisinden korumak için hücreler bünyelerinde ROT'larla savaşan ve onları temizleyen bazı önemli enzimler ihtiva ederler. Antioksidan savunma sistemi bünyesindeki bu enzimler ROT'ları kademeli bir şekilde daha az toksik olan bileşiklere dönüştürerek temizlerler. Savunma sistemi içerisinde yer alan bu enzimler; Süperoksit dismutaz (SOD), Guaikol peroksidaz (GPX), Katalaz (CAT), Askorbat peroksidaz (APX) ve Glutasyon redüktaz (GR) olarak beş gruba ayrılır (Lledias *et al.* 1998).

2.1.2. Süperoksit dismutaz (SOD) (EC 1. 15. 1. 1)

SOD, süperoksit radikalinin ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen ve bünyesinde metal barındıran bir enzimdir (Sairam and Srivastava 2000; Eyidogan *et al.* 2003; Minibaeva and Gordon 2003). İlk defa Mann and Keilis (1938) tarafından izole edilen bu enzim McCord and Fridovich (1969) tarafından katalitik fonksiyonu tespit edilinceye kadar indofenoloksidaz, tetrazoliumoksidaz, eritrocuprein gibi isimlerle anılmıştır.



Bu enzim ROT'ların enzimatik olarak temizlenmesinde etkili olan antioksidan savunma sisteminin ilk zinciri oluşturur (Møller 2001; Sen *et al.* 2010). SOD, süperoksit radikalinin parçalanmasını sağlayarak metallerin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonuyla oldukça güçlü bir radikal olan hidroksil radikali ($\cdot OH$) oluşum oranını

azaltır. ROT'a karşı antioksidan savunma sisteminin ilk hattı olan ve bütün aerobik organizmalarda ve aktifleşmiş oksijen üreten bütün hücre alt yapılarında bulunan bu enzimin aktivitesinin çeşitli streslere cevap olarak arttığı ve bu artışların strese karşı dirençle bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Bowler *et al.* 1991; Van Camp *et al.* 1994; Foyer *et al.* 1997; Apel and Hirt 2004; Turk *et al.* 2014). SOD, metalloenzimler grubundadır (Lee and Lee 2000) ve metal kofaktörlerine ve hücre altı yerleşimlerine göre sınıflandırılır. SOD'un üç farklı izoenzimi bulunur. Bunlar; bakır/çinko (Cu/ZnSOD), mangan (MnSOD) ve demir (FeSOD) izoenzimleridir. SOD'un bu üç formu KCN ve H₂O₂'ye duyarlılıklarına göre farklılık gösterirler (Scandalios 1993; Bowler *et al.* 1994; Allen 1995). MnSOD her iki inhibitöre dirençli olup prokaryotik organizmalar ve ökaryotik hücrelerin mitokondrisinde bulunur. Ayrıca peroksizomlarda da yer alır. MnSOD her biri alt birim başına tek bir Mn (III) atomu içeren bir homodimer ve homotetramer türünden oluşur. Cu/ZnSOD diğer iki sınıftan daha farklı elektriksel özelliklere sahiptir. Cu/ZnSOD her iki inhibitöre duyarlı olup yüksek bitkilerin hem sitozolünde hem de kloroplastlarında (Scandalios 1993; Güler 2008) bulunurlar. Oldukça eski SOD metaloenzim olduğu düşünülen FeSOD ise, H₂O₂'ye duyarlı, KCN'ye dirençli olup, bazı bitki türlerinin kloroplastlarında ve prokaryotik organizmalarda bulunabilirler (Bowler *et al.* 1992; Güler 2008). FeSOD bir hemodimer (1-2 g Fe içerir) ve bir tetradimer (2-4 g Fe içerir) olarak iki farklı türe sahiptir (Alscher ve Erturk 2002). Ancak bu enzimin tek başına strese karşı yeterli olamayacağı da bildirilmiştir (Pitcher *et al.* 1991; Erdal 2010).

2.1.3. Peroksidaz (POD) (EC 1.11.1.7)

Peroksidazlar ya da peroksit redüktazlar çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynayan geniş bir enzim grubudur. SOD ve katalaz (CAT) ile koordineli etki göstererek ROT'ların temizlenmesinde önemli rol oynayan Hem prostetik grubuna sahip bir enzimdir (Banci 1997; Kim *et al.* 2000). Aktif bölgelerinde Hem kofaktörü içermelerinin haricinde redoks-aktif sistein ya da selenosistein rezidüleride içerebilir. POD'lar H₂O₂'yi kullanarak fenoller ve hidrokinonlar gibi çok sayıda aromatik bileşenlerin dehidrojenasyonunu katalizlerler (Bergmeyer and Grabl 1983).

Bitki peroksidazları, protein kısmına bağlanan ve enzimin kararlılığında etkisi olan oligosakkarit zincirlerinin varlığı ile karakterize edilen glikoproteinlerdir (Hu and Van Huystee 1989). Peroksidazların pek çok fizyolojik olayla ilişkisi olduğu ve metabolizmada aktif bir rol oynadığı belirlenmiştir (Durmus 2003). Stres altındaki bitkilerde peroksidaz aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Asada 1992a, Erdal and Turk 2015, Genisel *et al.* 2015). POD, elverişsiz çevresel faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve bitki hücresinin en önemli koruyucu enzimlerinden birisidir (Bakardjieva and Christov 1996). Molekül ağırlıkları 35-100 kDa arasında değişmektedir. POD'lar hidrojen vericisi olarak birçok organik ve inorganik substratı (AH₂) kullanarak H₂O₂'yi temizlerler. POD enziminin katalizlediği reaksiyon aşağıda şematize edildiği gibidir.



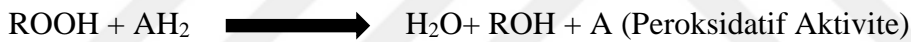
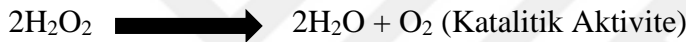
POD'lar oksin katabolizması, hücre duvarı proteinlerinin bağlanması ve pektinlerin çapraz bağlanması gibi birçok metabolik süreçte de etkili olurlar. Sonuç olarak peroksidazlar H₂O₂'yi kontrol altında tutarak hücre duvarının yapısına katılmasını sağlarlar. Çeşitli stres faktörlerinden yüksek seviyede etkilenen POD aktivitesi, bu enzimin stres enzimi olarak anılmasına sebep olmuştur (Whetten *et al.* 1998; Amaya *et al.* 1999; Rout *et al.* 2000; Jaleel *et al.* 2007; Mutlu 2009; Erdal 2010).

2.1.4. Katalaz (CAT) (EC 1. 11. 1. 6)

Mikroorganizmalardan, bitkilere ve hayvanlara kadar tüm yaşayan canlı organizmalarda bulunan bu enzim grubu tabiatta oldukça yaygın bir dağılım göstermektedir (Bergmeyer and Grabl 1983). CAT, aktif bölgesinde Fe⁺³ atomuyla birlikte hem grubu ihtiva eden, yüksek molekül ağırlığına sahip antioksidan bir enzimdir. Her birinde yaklaşık 500 aminoasit içeren 4 polipeptit zincirinden oluşan bir tetramerdir (Boon *et al.* 2007). En yüksek hızla reaksiyon veren enzimlerden biridir. Bir molekül katalaz bir saniyede milyonlarca H₂O₂ molekülünü O₂ ve H₂O dönüştürür (Chelikani *et al.* 2004; Goodsell 2004). ROT'ların oluşturacağı oksidatif hasara karşı hücreleri koruyabilecek önemli bir

enzimdir. CAT yapısında dört adet demir bağılı hem grubu ihtiva eder ki bunlar H₂O₂ ile arasında reaksiyon oluşumunun gerçekleştiği bölgelerdir.

CAT'ın bitki dokularında H₂O₂'nin uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Patykowski and Urbanek 2003). CAT'ın temel fonksiyonu, moleküler O₂ mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen, radikal karakterli H₂O₂'nin ve ROOH gibi bir peroksitin radikalliğini gidererek özellikle membranlarda oluşabilecek geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir. Zira H₂O₂, singlet oksijen (¹O₂) ve hidroksil radikallerinin (*OH) potansiyel kaynağıdır (Scandalios 1993; Chaudiere and Ferrari 1999). CAT, solunum zincirinde oksijenin eksik indirgenmesinden oluşan H₂O₂'yi O₂'ye indirger (Chaudiere and Ferrari 1999).



CAT kararlı bir enzim değildir. Yüksek ışık yoğunluğu ve strese maruz kalan bitki hücrelerinde oluşan H₂O₂'nin yüksek konsantrasyonlarıyla inhibe edilebilir (Streb *et al.*1993). H₂O₂'ye olan zayıf afinitesi ve sadece peroksizomlarda bulunması (çok az miktarda mitokondri matriksinde bulunurlar) CAT'ın etkinliğini azaltmaktadır (Asada 1992a; Scandalios 1993). CAT'ın koruyucu işlevi askorbik asit, glutatyon, E ve K vitaminleri tarafından güçlendirilebilir. Çünkü bu bileşikler kolayca elektron alabilir ve serbest radikalın ortadan kaldırılmasıyla yakalayıcı fonksiyon üstlenebilirler (Keha ve Küfrevioğlu 2000; Taşgın 2004; Erdal 2010).

2.1.5. Askorbat peroksidaz (APX) (EC 1. 11. 1. 11)

APX heme içeren peroksidaz ailesinin bir üyesidir. Hem içeren peroksidazlar H₂O₂ bağılı geniş bir spektrumdaki oksidasyonu katalize ederler. Peroksidazlar, sınıf I, sınıf II ve sınıf III olmak üzere kendi içerisinde üç farklı sınıfa sahiptir. APX sınıf I içerisinde yer almaktadır (Welinder 1992). APX bitkilerde, alglerde ve bazı siyanobakterilerde

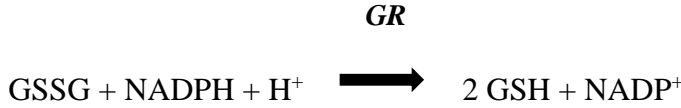
askorbatın H₂O₂'ye bağlı oksidasyonunu katalize eder (Raven 2003). APX, aynı zamanda sınıf I peroksidaz enzimi olan sitokrom c peroksidaz ile yüksek sekans özdeşliğine sahiptir. APX, iki molekül askorbatı kullanılarak H₂O₂'yi suya dönüştüren antioksidan bir enzim olarak bilinmektedir (Noctor and Foyer 1998). Bu reaksiyon sonucunda askorbat iki molekül monodehidroaskorbata (MDHA) dönüşür. MDHA monodehidroaskorbat redüktaz tarafından tekrar askorbata dönüştürülür (Kumar *et al.* 2011). APX, glutatyon askorbat döngüsünün ayrılmaz bir bileşenidir (Noctor and Foyer 1998). APX'in bitki hücrelerinde tilakoid ve mikrozomal mebranlara bağlı formlarda, sitoplazmada ve stromada çözülmüş formlarda ve apoplast da olmak üzere en az beş izoformu vardır (Yamaguchi 1995; Noctor and Foyer 1998). tAPX, gmAPX, sAPX, cAPX gibi en az beş farklı izoformdan oluşan APX ailesi H₂O₂ 'ye karşı CAT'a kıyasla daha yüksek bir affiniteye sahiptir (Büyük *et al.* 2012). APX'in izoformları elektron verici olarak askorbat için spesifik olup, askorbatın yokluğunda aşırı derecede kararsızdırlar (Miyake and Asada 1996). Sitoplazmada bulunan askorbat peroksidazlar, kloroplasttakine benzer ancak askorbat yokluğunda daha fazla kararlı olup askorbattan başka elektron vericilerini de kullanabilir (Ranieri *et al.* 1996; Vanacker *et al.* 1998; Güler 2008). Askorbat peroksidazlar yaygın şekilde çalışılan guaiakol peroksidazlara benzemesine rağmen H⁺ vericisi olarak askorbata olan yüksek afinitelerinden dolayı aralarında farklılıklar vardır (Nakano and Asada, 1987; Güler 2008).



2.1.6. Glutatyon redüktaz (GR) (EC 1. 6. 4. 2)

Glutatyon redüktaz, flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren flavoprotein bir enzimdir. Glutatyon redüktaz, NADPH'nin bir elektronunu okside glutatyonun (GSSG) disülfid bağlarına aktararak yeniden GSH'ye dönüştürülür (Ranieri *et al.* 2005; Yannarelli *et al.* 2007, Deponte 2013). Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarını engellemek için

gereklidir ve en önemli kaynağı heksoz monofosfat (pentoz fosfat) yoludur (Karabulut ve Gülay 2016).



Glutatyon redüktaz, dimerik disülfid oksidoredüktaz olarak işlev görür ve GSSG'nin bir molar eşdeğerini iki molar eşdeğeri olan GSH'ye dönüştürmek için bir FAD protez grubu ve NADPH kullanır. GSH'in antioksidan özelliğinden dolayı, glutatyon redüktaz hücrenin antioksidan kapasitesinin devamlılığı için önemlidir (Meister 1983; Creissen *et al.* 1994; Güler 2008). GR askorbat glutatyon döngüsünde GSH/GSSG oranını yüksek tutarak hücreleri oksidatif hasara karşı korumada görevli anahtar enzimlerden biridir (Foyer and Noctor 2005). GR diğer enzimlerle birlikte H₂O₂'nin radikal özelliğinin ortadan kaldırılmasında görev alır. Oksitlenmiş askorbik asidi (dehidroaskorbat) tekrardan askorbik aside indirgeyen dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enzimi substrat olarak GSH'ı kullanmakta ve reaksiyon sonucu GSSG oluşmaktadır. Oluşan GSSG, GR enzimiyle tekrardan GSH'a indirgenir ve böylece dehidroaskorbat redüktaz enziminin substratı yeniden oluşur. GR enzimi GSSG'yi GSH'a indirgerken, NADPH'ı kullandığından CO₂ fiksasyonu sınırlandığı durumlarda, NADPH/NADP⁺ oranının dengelenmesine yardımcı olur. Bu nedenle GSSG'nin GSH'a indirgenmesi, oksidan temizlenmesinde önemli bir basamaktır ve oksidatif strese karşı savunmada GR'nin önemini ortaya çıkarmaktadır (Aono *et al.* 1995; Creissen *et al.* 1996; Güler 2008).

2.2. Antioksidan Bileşikler

2.2.1. Glutatyon

Yaşayan canlı organizmalarda önemli bir antioksidan olan glutatyon (GSH), bitkilerde çok miktarda bulunan, çok sayıda ve önemli fonksiyonlara sahip olan bir metabolittir (Foyer and Noctor, 2005). Glutatyon, serbest radikaller, peroksit, lipit peroksit ve ağır

metallerin neden olduğu oksidatif hasara karşı önemli hücrenel bileşenlere zarar gelmesini önleme yeteneğine sahiptir (Pompella *et al.* 2003). İndirgenmiş glutatyon (GSH), iki ardışık ATP-bağımlı reaksiyon ile katalizlenir. Bu reaksiyonlarda görev alan enzimler γ -glutamil-sistein sentetaz (γ -ECS, EC 6.3.2.2) ve glutatyon sentetaz (GSH-S; EC 6.3.2.3)'dır (Foyer *et al.* 2002). Glutatyon hayvan hücrelerinin hemen hemen hepsinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Bitkilerde ise özellikle yapraklarda milimolar düzeyindeki konsantrasyonlarda bulunan genel bir indirgeyicidir (Rennenberg and Lamourex 1990; Güler 2008). Bitkilerde glutatyonun sülfür metabolizmasında ve oksidatif savunmada önemli fizyolojik rolleri vardır. Glutatyon protein yapısında olmayan tiyoller içerir ve köklerden sülfür alınımını düzenler (Herschbach *et al.* 1994). Glutatyon ksenobiyotiklerin detoksifikasyon mekanizmasında görev alan GSH S-transferaz enzimi tarafından kullanılır. Ayrıca bitki ağır metallerinin düzeyini kontrol altında tutan fitoşelatinlerin öncül bileşiğidir (Rauser 1987; Scheller *et al.* 1987; Grill *et al.* 1989, Ha *et al.* 1999). GSH hem bitki hem de hayvanlarda bir redoks tamponu ve antioksidandır (Foyer and Halliwell 1976; Law *et al.* 1983; Kunert and Foyer 1993; Meister 1994). GSH'ın yapısındaki sisteinin sülfidril grubu antioksidan fonksiyonunda etkilidir. GSH'daki tiyol grubunun oksitlenmesi ile oluşan GSSG, antioksidan özelliğini kaybeder.

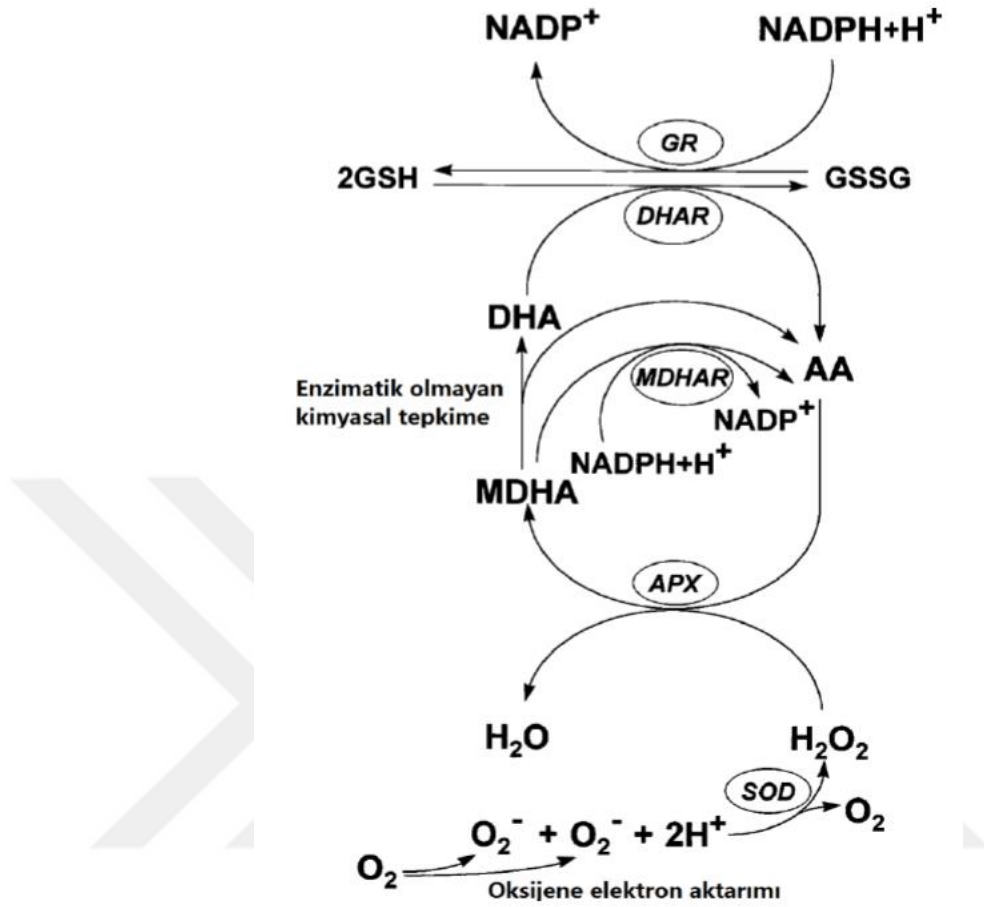
GSH, kimyasal olarak süperoksit, singlet oksijen, hidroksil radikalleri ile reaksiyona girer. Bunun sonucunda da serbest radikallerin direkt temizleyicisi olarak görev yapar (Foyer *et al.* 1994; Creissen *et al.* 1996; Güler 2008). Bunların yanında glutatyon savunma genlerinin ekspresyonunu etkiler (Dron *et al.* 1988; Wingate *et al.* 1988). Hücre bölünmesinin redoks kontrolünün içinde yer alır (Shaul *et al.* 1996; Sanchez-Fernandez *et al.* 1997). Hücrelerde indirgen glutatyonun okside olmuş glutatyona oranı, hücrenel oksidatif stresin bir ölçüsüdür (Pastore *et al.* 2001; Lu 2013).

2.2.2. Askorbat (L-Askorbik Asit, C Vitamini)

Askorbik asit tüm bitkilerde sentezlenebilir (Burns 1957). Fotosentetik ve fotosentetik olmayan tüm bitki dokularında askorbat milimolar konsantrasyonlarında biriktirilebilir

(Foyer *et al.* 1995). Askorbik asidin birçok fonksiyonu vardır. Bunlardan ilki hidroksil, süperoksit ve singlet oksijen radikallerine direkt olarak etki eden önemli bir primer antioksidan maddedir (Nijs and Kelley 1991; Buettner and Jurkiewicz 1996). Fotosentezin basamaklarının dengede tutulması ve ışık hasarını önlemede etkilidir (Foyer and Harbinson 1994; Forti and Elli 1995). Bitki hücrelerinde enzim kofaktörü, antioksidant ve kloroplast ya da hücre zarındaki elektron taşıma sistemlerinde elektron verici-alıcı olarak görev yapar. Ayrıca prostetik grup olarak metal iyonu içeren enzimlerin aktivitelerinin korunmasında da önemli rol oynar. Bunlara ek olarak askorbik asit, önemli bir antioksidan olan α -tokoferollerin okside formlarını indirgeyen güçlü bir sekonder antioksidan olarak da görev yapar (Padh 1990).

Bitkilerde H_2O_2 'nin detoksifikasyonu için bilinen en önemli substrat askorbik asittir (Nakano and Asada 1987; Mehlhorn *et al.* 1996). Askorbat-glutasyon döngüsü olarak bilinen reaksiyonlarda H_2O_2 enzimatik ve enzimatik olmayan bir seri reaksiyonla suya dönüştürülür. Bu döngüde $NADPH^{+}$ 'dan kaynaklanan elektronları kullanarak H_2O_2 'nin suya dönüşmesinde dört enzim rol oynar. Bu döngüde enzimlerin substratları olan glutasyon ve askorbat tükenmez (Noctor and Foyer 1998). Askorbat-glutasyon döngüsünde H_2O_2 'yi suya indirgemek için APX iki molekül askorbat kullanır. Sonuç olarak iki molekül kısa ömürlü bir radikal olan monodehidroaskorbat (MDHA) oluşur. MDHA askorbata direkt olarak indirgenebilir. MDHA'nın indirgenmesi için elektronlarını sitokrom b'ye (Horemans 1997), indirgenmiş ferrodoksine (Miyake and Asada 1992) veya $NADPH$ 'a verebilir. Reaksiyon monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) tarafından katalizlenir (Asada 1997). MDHA'nın enzimatik olarak indirgenmesinin aksine enzimatik olmayan bir tepkime ile dehidroaskorbata (DHA) dönüşebilir. DHA'nın askorbata dönüşümünü ise indirgeyici substrat olarak GSH'ı kullanan dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) katalizler (Foyer and Halliwell 1976). Reaksiyon sonucu yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) oluşur. Glutasyon redüktaz (GR) enzimi ise $NADPH$ tarafından GSSG'nin GSH'a indirgenmesini katalizler (Noctor and Foyer 1998) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Askorbat-glutasyon çemberinde görevli enzimler (Considine 2006)

Mevcut çalışmada antioksidan enzimler olan SOD, GPX, CAT, APX ve GR aktiviteleri ile antioksidan maddeler olan glutasyon ve askorbik asit içeriğine bakılarak lipoik asitin bu antioksidan mekanizma üzerine direkt olarak mı yoksa dolaylı olarak mı etki gösterdiği ve beraberinde bu etkiyi kendisinin sahip olduğu antioksidan etkisinden mi kaynaklandığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

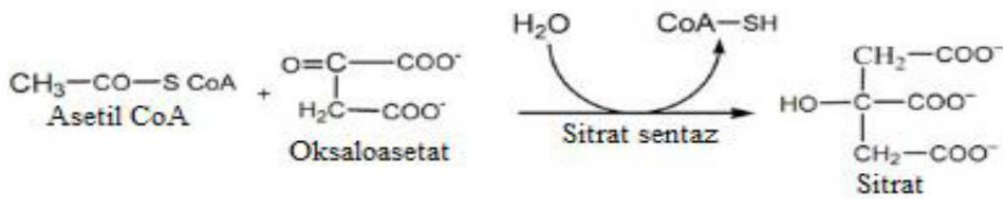
2.3. Sitrat Sentaz (CS) (EC 2.3.3.1)

Mitokondriyal matrikste yer alan ve krebs döngüsünün ilk enzimi olan sitrat sentaz (CS), OAA(4C) ile asetil koenzim-A'nın (2C) asetil grubunun kondansasyonunu katalize etmek suretiyle sitrat (6C) oluşumunu katalizler (Correa *et al.* 2007). OAA, enzime bağlanan ilk substrat olup, enzimin konformasyonunu değiştirmesini sağlar ve

asetil-CoA için bir bağlanma yeri oluşturur. Bu aşamada OAA, sitrat ve CoA üretmek üzere asetil-CoA ve H₂O ile tepkimeye girer. Böylelikle bu enzim, gerek glikolizden gelen pirüvatın yapısındaki gerekse yağ asitlerinin β-oksidasyonu ile oluşan asetil gruplarının yapısındaki C bağlarının parçalanmasını sağlayan döngüyü başlatarak, içerdikleri bağ enerjilerinin elektron taşıyıcılarına (NAD⁺, FAD) aktarımına aracılık etmiş olur. Ayrıca bu enzim, bozulmamış mitokondrilerin varlığı için nicel bir enzim markırı olarak da kullanılmaktadır (Marco *et al.* 1974).

CS'nin önemli rol oynadığı krebs döngüsü, enerji üretiminin yanı sıra, önemli metabolik yollar için prekürsör sağlayan bir mekanizmadır. Bu nedenle, bu enzimin hızındaki değişimler, hücrelerde cereyan eden çok sayıda temel metabolizmanın hızını ve yönünü etkilemektedir (Wiegand and Remington 1986).

Mitokondriyal matrikste bulunmasına olmasına rağmen, bu enzim mitokondriden ziyade nükleer DNA tarafından kodlanıp sitoplamik ribozomlar tarafından sentezlendikten sonra matrikse transport edilir. Dimerik ve multimerik olarak iki farklı formu belirlenen bu enzimin dimerik formu ökaryotlarda ve gram pozitif bakterilerde, multimerik formu ise proteobakterilerde bulunmaktadır.



Şekil 2.2. Sitrat sentaz aktivitesi şeması (Tutorsglobe'dan alınmıştır. Anonymos 2048)

Mevcut çalışmada CS enziminin hem aktivitesine hem de gen ekspresyon seviyesine bakılmak suretiyle, lipoik asitin bu enzim üzerine etkisinin biyokimyasal ve moleküler düzeyde aydınlatılması, bu enzimin aktivitesi temelinde TCA döngüsünün hızında meydana gelen değişimlerin belirlenmesi ve PDH ve ATP sentaz enzimlerinden elde edilen bulguların da birlikte ele alınması suretiyle lipoik asit-indüklü TCA siklusu hızını

artırmak sureti ile ve beraberinde sitokrom oksidaz (COX) geninin ifadesi ile de ETS sistemi üzerine de etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

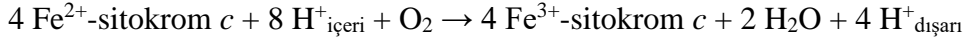
2.4. Sitokrom Oksidaz (COX; EC 1.9.3.1)

Tüm ökaryot ve prokaryot organizmalarda bulunan ve Kompleks IV olarak da bilinen sitokrom oksidaz (COX), solunumun anahtar enzimlerinden birisidir. Mitokondriyal elektron taşıma zincirinin (ETS) son basamağını katalizleyen bu enzim, solunumda görev alan dehidrogenaz enzimlerinin substratları üzerinde yaptıkları oksidasyonlar sonucunda ortaya çıkan elektronların, son akseptör olan moleküler oksijene transfer edilmesi ve suyun oluşturulmasından sorumludur (Heidarvand *et al.* 2017). COX, Hem ve bakır içeren terminal oksidaz konumunda olan süper enzim ailesinin büyük bir üyesidir (Garciahorsman *et al.* 1994; Calhoun *et al.* 1994). Bu enzim, yapısal ve işlevsel olarak yapısında “hem-bakır” grubu barındırdığından, suya dioksijen (O_2) indirgenmesini katalizleyen eşsiz bir bimetalik aktif bölgeye ve elektronları bu bölgeye bağlayan ikinci bir “Hem” grubuna sahiptir. Ayrıca subunit I ve II olarak iki katalitik alt birime de sahiptir. Yapısında sitokrom a, sitokrom a₃ ve ikişer adet CuA ve CuB merkezi barındırır (Tsukihara *et al.* 1995; Singh 2002). Sitokrom a₃ ve CuB formu oksijen indirgenme bölgesi olan bir binükleer merkezdir. Elektronlar, Fe ve Cu metalleri indirgeyerek, sitokrom c’den CuA’ya ve buradan da sitokrom a bölgesi aracılığı ile sitokrom a₃-CuB binükleer merkezinden geçerek taşınır (Hill 1994). Dört sitokrom c molekülünün her birinden birer elektron alarak bunları bir oksijen molekülüne transfer eder ve moleküler oksijeni iki su molekülüne indirger. Ayrıca bu enzim, matriksten membranlar arası boşluğa olacak şekilde bir proton pompası ($4H^+$) olarak da fonksiyon görür.

Siyanid, azid ve karbon monoksit tarafından doğrudan inhibe edilen COX (Alonso *et al.* 2003), hidrojen sülfid ve nitrik oksit bileşikleri tarafından hücre sel solunumun azaltılması suretiyle de dolaylı olarak inhibe edilmektedir (Nicholls *et al.* 2013). Bunların dışında, ortamda yüksek oranda ATP molekülünün bulunması halinde,

allosterik olarak COX enziminin inhibe edildiği rapor edilmiştir (Arnold and Kadenbach 1997).

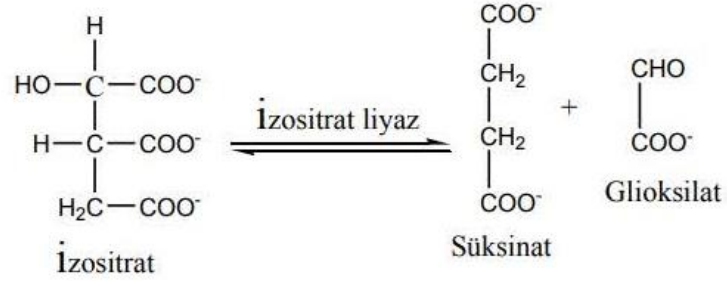
COX'un katalize ettiği reaksiyon şu şekilde gerçekleşir;



Mevcut araştırmada, COX enziminin gen ekspresyon seviyesine bakılmak suretiyle, lipoik asitin bu enzim üzerine etkisinin moleküler düzeyde aydınlatılması, TCA döngüsündeki değişimler ile birlikte COX enziminde meydana gelen değişimlerin çimlenen mısır fidelerinin enerji metabolizması üzerine nasıl bir etki oluşturduğunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

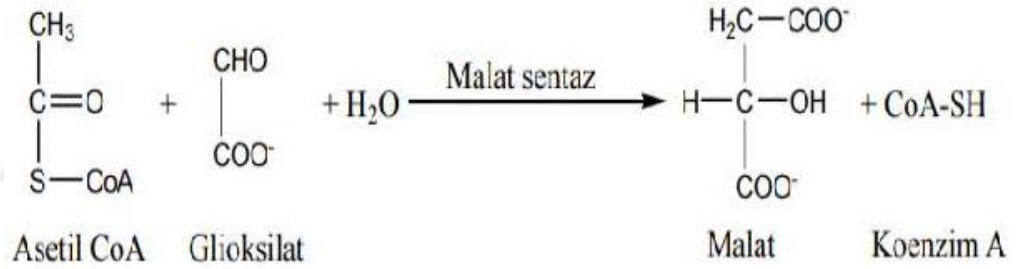
2.5. İsoisitat Liyaz (EC 4.1.3.1) ve Malat Sentaz (EC 2.3.3.9)

Pirüvat dehidrogenaz multienzim kompleksi (PDHC) tarafından katalizlenen pirüvatın 2 karbonlu asetil CoA' ya dönüştürülmesi reaksiyonu dönüşümsüz bir reaksiyondur. Hayvansal organizmalarda asetil CoA' dan karbohidratların sentezi bu sebepten dolayı mümkün olmadığından hayvansal organizmalarda lipidlerden şekerlerin sentez yolu kapalıdır. Fakat yüksek bitkilerde, mikroorganizmalarda ve alglerde bulunan iki farklı enzim; bu organizmalarda lipidlerden şekerlerin ve diğer biyosentetik ara bileşiklerin oluşumuna olanak sağlar. Bu enzimler, glioksilat döngüsü adı verilen ve TCA çevriminin modifiye şekli olan bir metabolik yolda yer alırlar (Kornberg and Beevers 1957). Glioksilat döngüsü ilk olarak mikroorganizmalarda keşfedilmesinden sonra (Kornberg and Krebs 1957), Harry Beevers ve meslektaşları tarafından yapılan öncü araştırmalar sonucunda çimlenmekte olan yağlı tohumlarda da bulunduğu belirlenmiştir. TCA döngüsünde yer alan izositrattan malata kadar ki reaksiyon basamağının yerini, izoisitat liyaz (ICL) ve malat sentazın (MLS) katalizlediği iki reaksiyon alır. Bu döngüde önce bir asetil CoA (2C), izoisitat (6C) oluşturmak üzere okzalasetatla (4C) reaksiyon oluşturur. Bu basmakta glioksilat döngüsünün ilk enzimi olan ICL katalizörlüğünde bir aldol parçalanmasıyla izoisitat, süksinat ve glioksilata ayrılır.



Şekil 2.3. Glioksilat döngüsünde izositrat liyaz

Oluşan glioksilat, ICL dışında glioksilat döngüsünde yer alan diğer enzim olan MLS katalizörlüğünde ikinci bir asetil-CoA ile reaksiyon oluşturarak malatı oluşturur. Malat daha sonra bir başka asetil-CoA ile reakte olacak olan okzalasetata oksitlenir.



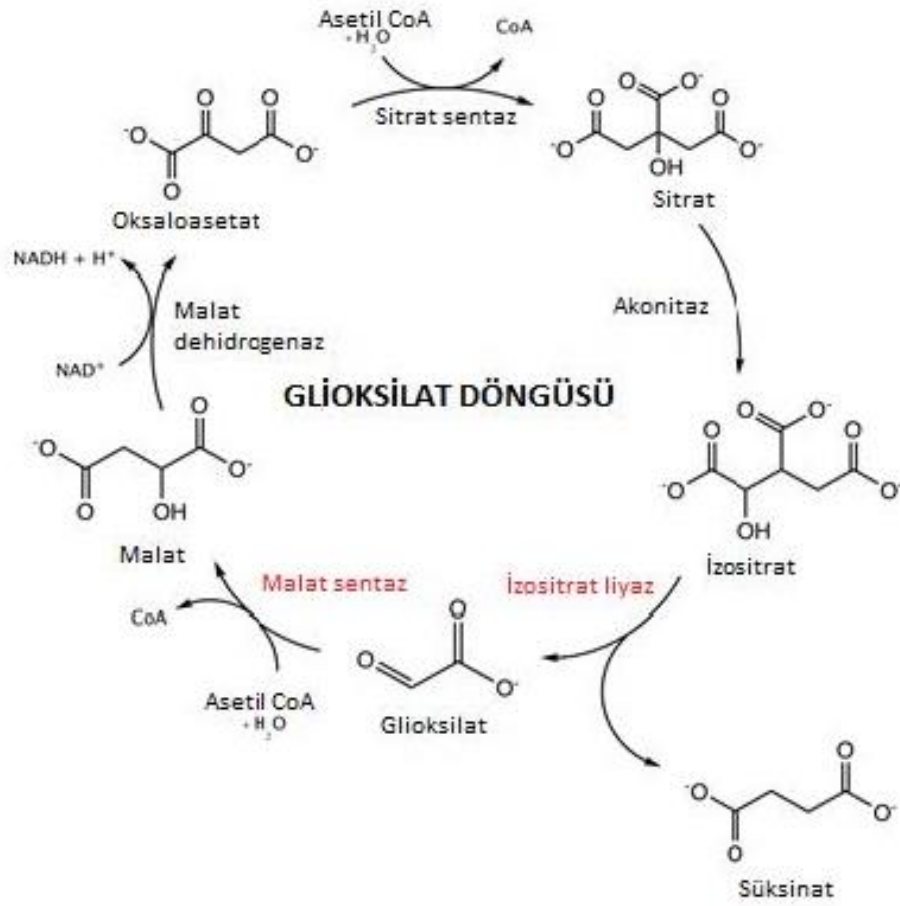
Şekil 2.4. Glioksilat döngüsünde malat sentaz

Fosfoenolpiruvat (PEP) karboksikinaz, oksaloasetatın PEP'e dönüşümünü katalize eder ve sonuçta çözünür karbonhidratların glukoneogenez yoluyla sentezini sağlar (Beever 1980). TCA döngüsü hiçbir net karbon asimilasyonu vermezken, glioksilat döngüsü, glikozu (glukoneogenez yoluyla) ve diğer biyosentetik ürünleri sentezlemek için kullanılabilir ara ürünler üretir. Sonuç olarak, ICL ve MLS kullanan organizmalar, glukozu ve metabolik ara maddelerini, asetattan veya etanolün, yağ asitlerinin veya poli-β-hidroksibutiratın parçalanmasından türetilmiş asetil-CoA'dan sentezleyebilir (Dunn *et al.* 2009). Bu işlev, özellikle yüksek yapılı bitkilerin tohum yağlarını kullanılırken oldukça önemlidir. Çimlenmekte olan tohumlarda, yağların parçalanması sonucunda asetil-CoA üretilir. Bu, fotosentezle şeker üretimine başlamadan önce birincil bir besin kaynağı olarak görev yapan ara ürünler üreten glioksilat döngüsü için

bir substrat görevi görmektedir (Eastmond and Graham 2001). Glioksilatın her devrinde iki asetil-CoA girer ve biyosentetik yolda kullanılacak bir süksinat ve elektron taşıyıcı bir NADH oluşur. Bu döngü hücreye hem enerji hem de dört karbonlu (süksinat) bir biyosentetik ara bileşik sağlar.

Birkaç çalışma, glioksilat döngüsünün çimlenen yağ tohumlarında etkin olduğu zaman, TCA döngüsünün dekarboksilat aşamalarının aktivitesinin, solunum üzerindeki karbohidrat sentezi lehine bastırıldığını göstermiştir (Millhouse *et al.* 1983; Falk *et al.* 1998). Glioksilat döngüsü aynı zamanda kofaktörlerin gereksinimlerinin dengelendiği farklı bir şema ile de temsil edilebilir (Mettler and Beevers 1980). Bu modifikasyonda, bir malat-aspartat mekiği, indirgen eşdeğerleri geri dönüşüme sokmak için mitokondri ve glioksizom arasında çalışır. Bu mekik, glioksizomal malat dehidrogenazın çalışması yoluyla NAD⁺ üretimi ile sonuçlanır. Yüksek bitkilerde TCA çevrimi reaksiyonları mitokondrilerde meydana gelmesine rağmen; glioksilat devri, özellikle ICL ve MLS enzimleri tek zarlı başka bir organel olan glioksizomlarda bulunur (Kornberg and Beevers 1957, Beevers 1980). Glioksizomlar, bazı bitki dokularında bulunan özelleşmiş peroksizomlardır ve tüm bitki dokularında her zaman bulunmaz. Özellikle gelişme öncesi evrede bitkiler fotosentezle glikoz üretme yeteneğini kazanmadan, çok yağlı tohumlarda filizlenme sırasında glioksizomlar meydana gelirler. Böylece, filizlenen tohumlar depo lipidlerinin karbonlarını glukozla dönüştürebilir.

Mevcut çalışmada glioksilat döngüsünün ana enzimleri olan izositrat liyaz ve malat sentaz enzimlerinin hem aktivite hem de gen ekspresyon seviyelerine bakılmak sureti ile lipoik asit uygulamasının çimlenme parametreleri ile beraber bu enzimler üzerine biyokimyasal ve moleküler etkisinin aydınlatılması amaçlanmıştır.



Şekil 2.5. Glioksilat döngüsü

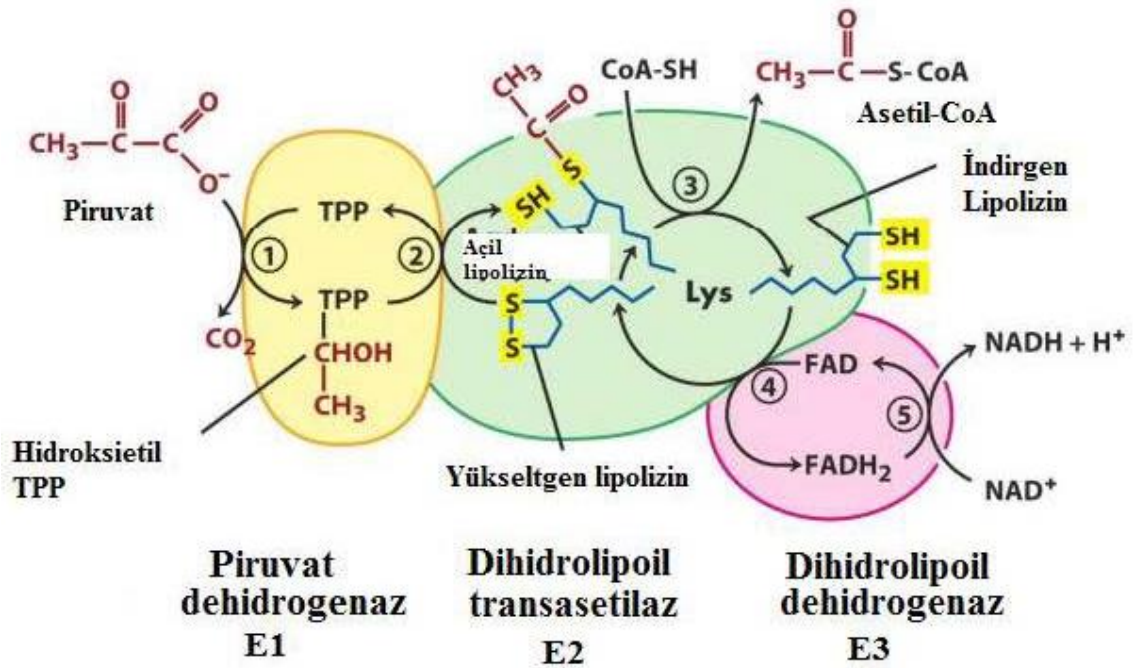
2.6. Piruvat Dehidrogenaz (EC 1.2.4.1)

Piruvat dehidrogenaz kompleksi, glikolizi sitrik asit döngüsüne bağlayan piruvat dekarboksilasyon aşamasından sorumludur. Bu, piruvatın glikolizden asetil-CoA'ya dönüşümünü içerir ve bu daha sonra sitrik asit döngüsünde hücre solunum için kullanılır. Piruvat dehidrogenaz kompleksinde üç farklı enzim bileşeni vardır. Piruvat dehidrogenaz (EC 1.2.4.1) ya da piruvat dekarboksilaz, piruvatın oksidasyonundan sorumludur, dihidrolipoil transasetilaz (EC 2.3.1.12), asetil grubunu CoA'ya transfer eder ve dihidrolipoil dehidrogenaz (EC 1.8.1.4), lipoamidi yeniden oluşturur. Enerji metabolizmasının TCA siklusunda yer alan piruvat dehidrogenaz, asetillenmiş dihidrolipoamid ve karbon dioksit verecek şekilde piruvat ve bir lipoamid reaksiyonunu

katalize eden bir enzimdir. Prüvat dehidrogenaz enzimi genellikle prüvat dehidrogenaz kompleksinin (PDC) E1 bileşeni olarak adlandırılır. PDC, prüvatın oksidatif dekarboksilasyonunu, asetil-CoA, CO₂ ve NADH (H) oluşumu ile katalize eder. E1 enzimi prostetik grup olarak tiamin pifosfat içerir. İlk olarak, prüvat ve tiamin pifosfat (TPP veya vitamin B1) prüvat dehidrogenaz alt birimleri ile bağlanır. TPP'nin tiazolyum halkası zitteriyonik bir formdadır ve anyonik C₂ karbonu piruvatın C₂ (keton) karboniline nükleofilik bir saldırı yapar. Elde edilen hemithioacetal, bir açıl anyon eşdeğeri üretmek için dekarboksilasyona uğrar. Bu anyon, bir lizin tortusuna bağlı olan okside edilmiş bir lipoat türünün S1'ine saldırır. Halka açılan bir S_N2 benzeri mekanizmada, S2 bir sülfid veya sülfhidril kısmı olarak değiştirilir. Tetrahedral hemithioacetal'ın bozulması, TPP kofaktörünü salgılayan ve lipoat S1 üzerinde bir tiyoasetat üreten, tiyazolü çıkarır. E1 tarafından katalizlenen işlem, bütün prüvat dehidrogenaz kompleksinin hız sınırlayıcı aşamasıdır. Dihidrolipoil transasetilaz, piruvatın asetil CoA'ya dönüşümü için reaksiyon mekanizmasına katılan üç enzim bileşeninin ikincisi olduğundan, E2 olarak da adlandırılır. Bu komplekste ayrıca tiamin pifosfat, lipoik asit, CoA, FAD ve NAD olmak üzere 5 farklı kofaktör bulunur. DLAT prostetik grup olarak bunlardan lipoamid ve CoA'yı kullanır. Lipoik asit, DLAT'nin alt ünitesinin prostetik grubudur. Karboksil grubu tarafından, bir amid bağı aracılığıyla enzim proteininin lizin rezidüsüne kovalent olarak bağlanır. Lipoik asit kalıntısı, proteine uzun bir karbon zinciri ile bağlanır ve bu nedenle multienzim kompleksinin çeşitli reaksiyon bölgeleriyle reaksiyona girebilir. Lipoik asit, bir disülfid bağı ile bağlanmış iki S atomu ile donatılmıştır. Hidroksietil kalıntısı lipoik asit kalıntısına transfer edildiğinde, lipoik asit dihidrolipoik aside indirgenir ve hidroksietil kalıntısı bir asetil kalıntısına okside edilir. Sonuncusu dihidrolipoik aside bir tioester bağı ile bağlanmaktadır. Tioester bağları enerji bakımından zengindir ve karbonil grubunun oksidasyonu sırasında salınan enerjiyi depolar. Daha sonra asetil kalıntısı, asetil koenzim A'yı sentezlemek için dihidrolipoil transasetilaz ile koenzim A'nın sülfhidril grubuna aktarılır. Dihidrolipoik asit, dihidrolipoil dehidrogenaz ile lipoik aside yeniden okside edilir ve NAD⁺, FAD yoluyla NADH'ye indirgenir. Bu işlemi şu şekilde gerçekleştirir; kompleksin lizin rezidüsüne bağlı olan dihidrolipoat, daha sonra, disülfür izomeraz için kimyada özdeş olan bir flavin aracılı oksidasyona maruz kaldığı dihidrolipoil dehidrogenaz (E3) aktif bölgesine taşınır. İlk olarak, FAD, dihidrolipoatı

lipoat dinlenme durumuna geri okside eder ve FADH_2 üretir. Ardından, bir NAD^+ kofaktörü FADH_2 'yi tekrar FAD dinlenme durumuna yükseltir ve NADH üretir.

Mevcut araştırmada solunum parametresi olan CS aktivitesi ve gen ekspresyon seviyesi ile beraber PDH enziminin gen ekspresyon seviyesi üzerine lipok asitin moleküler düzeyde nasıl bir etki gösterdiğinin belirlenmesi doğrultusunda bu enzimin ekspresyon seviyesi temelinde TCA döngüsünün hızında meydana gelen değişimlerin belirlenmesi ve COX ve ATP sentaz enzimlerinin gen ekspresyon seviyelerinden elde edilen bulguların da birlikte ele alınması suretiyle lipoik asit-indüklü TCA siklusu hızını artırmak sureti ile ETS sistemi üzerine de etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 2.6. Piruvat dehidrogenaz kompleksi- (acikders.ankara.edu.tr)

2.7. ATP Sentaz (EC 7.1.2.2.)

Mitokondri ve kloroplastlar canlı hücreler için enerji santralleri olarak iş görürler. Membran bağımlı proton taşıyıcısı olan ATPase/ATP-sentaz; bakteri, mitokondri ve kloroplastalarda ADP ve Pi'dan dönüşümlü ATP sentez/hidrolizini katalizleyerek (O'Rourke and Wilson 1987) bu süreçte belirleyici bir rol oynamaktadır (Ballmoos *et al.* 2008; Ballmoos *et al.* 2009). Mitokondrial ATPase, fotosentez yokluğunda hücresel ATP'nin ana kaynağıdır. Elektron taşınımı sırasında üretilen elektro-kimyasal gradient, ATP sentezi sırasında ATPase tarafından proton translokasyonunu içeren bir işlemde kullanılır. Enzim aktivitesi için divalent katyona ihtiyaç duyulur. Kloroplast (Vambutas and Racker 1965) ve fasulye mitokondrisinde iki değerlikli kalsiyum bu ihtiyacı giderirken (Grubmeyer and Spencer 1979) genel itibari ile magnezyum kullanılmaktadır. 1960'lı yılların başında elektron mikroskobu ile izole edilmiş mitokondrilerin sistematik bir şekilde çalışması başlatıldı ve mikrograflarda, “temel parçacıklar” adı verilen ve önemli bir mitokondriyal fonksiyon birimi olarak tanımlanan ilk bileşen belirlendi (Fernández-Morán 1962). Bu parçacıklar ATP sentezinden (ve hidrolizden) sorumlu, küresel yapılı suda çözünür bir alt kompleks olan F1 ve membrana gömülü hidrofobik bölgelere sahip olan Fo'dan oluşur. “O” harfi, ATP hidrolizinin oligomisin ilave edilerek inhibe edildiği deneylerden kaynaklanmaktadır (Racker 1963). FO, F1'in dönmesini sağlar ve c-halkasından ve a, b, d, F6 alt birimlerinden oluşurken, F1 ise α, β, γ ve δ birimlerinden oluşur. FO F1, membran boyunca proton hareketi için bir yol oluşturur (Velours *et al.* 2000). ATP sentazın F1 kısmı hidrofildir ve ATP'yi hidrolize etmekten sorumludur ve mitokondriyal matris boşluğuna doğru uzanmaktadır. Alt birimlerden, α ve β altı bağlanma yerine sahip bir heksameri oluştururken bunlardan üçü katalitik olarak inaktiftir ve ADP'yi bağlar. Diğer üç alt birim ATP sentezini katalize eder. FO, sekiz alt birime ve bir transmembran halkasına sahip suda çözünmeyen bir proteindir. ATP sentazının FO bölgesi, mitokondriyal zar içine gömülmüş bir proton bölgesidir. Diğer enzimler gibi, F1FO ATP sentaz aktivitesi de geri dönüşümlüdür. ATP sentezi için, bir elektrokimyasal proton gradyanı, ATP sentazın zar bütünleyici kısmında hidrofobik alt birimlerin intramoleküler rotasyonunu indükler (Yoshida *et al.* 2011; Junge *et al.* 2009). Rotor alt üniteleri III (kloroplastlarda)

veya c (mitokondri veya bakteriler) silindir şeklinde bir oligomer IIIx / cx olarak düzenlenmiştir. Rotor alt ünitelerin bir özelliği yüksek hidrofobik olmaları ve proteolipitler olarak adlandırılmalarıdır (Folch ve Lees 1951). N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) bu alt üniteye bağlanarak proton translokasyonunu inhibe edebilir (McCarty ve Racker 1962). Elektrokimyasal proton gradyanının kimyasal enerjiye dönüşümünü dengelerken, ATP sentezi için aşağıdaki hesaplama kullanılır: oligomer IIIx / cx'in 360°'den tam bir dönüşü, üç ATP molekülünün sentezlenmesiyle sonuçlanır, böylece protonların sayısı, alt birimlerin sayısına eşdeğerdir. Eşleşme oranı olarak adlandırılan ATP başına düşen protonların miktarı, ATP sentezinin ve solunum zinciri ya da fotosentez işlemlerinin enerji verimliliğini değerlendirmek için önemli bir değerdir (Hinkle 2005). Daha sonra yapılan çalışmalarda bu değer mitokondri için 2 ile 3.8 arasında, kloroplast için ise 2 ile 5 arasında olduğu bildirilmiştir (Tomashek ve Brusilow 2000). Bugüne kadar, yapısal olarak belirlenen değerler, maya ve sığır kalp mitokondrisi için sırasıyla 3.3 ve 2.7 (Stock *et al.* 1999; Watt *et al.* 2010) iken, ıspanak kloroplastları için H / ATP oranı 4.7 gibi bir değerle oldukça yüksek bulunmuştur (Seelert *et al.* 2003; Pogoryelov *et al.* 2009).

Mevcut araştırmada solunum parametresi olan CS aktivitesi ve gen ekspresyon seviyesi ile beraber PDH enziminin gen ekspresyon seviyesi ile COX ve beraberinde ATP sentaz enzimlerinin gen ekspresyon seviyelerinden elde edilen bulguların birlikte değerlendirilmesi doğrultusunda lipoik asit-indüklü TCA siklusu hızını artırmak sureti ile ETS sistemi üzerine de etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.8. α -Amilaz (EC 3.2.1.1)

Nişasta bitkilerde karbon depo formu olarak iş görür. Nişasta, fotosentez ürünlerinden gün boyunca yapraklarda üretilir ve kloroplastta gün sonuna kadar birikir ve çözünmeyen granüller oluşturur. Fotosentez süreci tamamlandığında nişasta ağırlıklı olarak maltoz ve daha az miktarda glukoz olarak plastitten ihraç edilir (Niittyta *et al.*, 2004). Sitosolde, maltoz heksoz fosfata dönüştürülür ve, ya glikolitik yolla tüketilir ya da hücreden ihraç edilmesi için sukroz halinde sentezlenir. Sükroz, fotosentetik

dokulardan, floem yoluyla bitkinin diğer dokularına taşınır. Taşınan bu dokular, enerji üretmek için sükrözü katabolize eden meristemler ve genç yapraklar, veya plastidde nişastayı yeniden süspanse eden nişasta kökleri, yumrular, kabuklar ve meyveler gibi saklama organları gibi hızla büyüyen dokular olabilir. Depo nişastası bitkiler için çok önemlidir ve köklerde ve kabuklarda baharın başlaması ve birçok meyvede olgunlaşmanın başlangıcı gibi belirli mevsimsel veya gelişimsel uyarıların ardından parçalanır. Çimlenme sırasında embriyo, alevron tabakasının hücrelerini uyararak enzimleri endosperm içine salgılamak için gibberellinleri serbest bırakarak nişasta bozulmasını tetikler (Beck and Ziegler, 1989). Çimlenme aşamasında nişasta bozulması için hayati öneme sahip bazı enzimler tanımlanmıştır. En önemli enzimlerden biri, diğer enzimlerin iş görmesi için nişastayı hızlı bir şekilde çözünen substratlara indirgeyen bir endohidrolaz olan α -amilazdır (Beck and Ziegler, 1989). Bununla birlikte, endospermdeki nişasta bozulma koşulları, diğer bitki dokularındakilere benzemez, çünkü endosperm nişastanın parçalanmasında yer alan enzimlerin çoğu, canlı bir organel içinde değil aselüler bir matriste etki eden salgılanan enzimlerdir. Arabidopsis ile yapılan çalışmalar doğrultusunda üç tip α -amilaz ailesi belirlenmiştir (Stanley *et al.* 2005). Birinci tip α -amilaz ailesi, öngörülen bir salgılayıcı sinyal peptidi ile karakterize edilir ve bütün tahıl α -amilazlarını kapsar (Stanley *et al.* 2002). Bu ailenin tahılların endospermelerinde nişastanın parçalanmasındaki kritik rolü iyi bilinmektedir ve gerçekten de yıllarca bu enzimlerin bütün bitki α -amilazlarını temsil ettiği varsayılmıştır. Enzimlerin alevron tabakalarının hücrelerinden salgılanması, tahıl tanelerinde iyi bilinmektedir ve benzer bir işlemin, en azından bazı dikotiledon tohumlarında gerçekleştiğine dair kanıtlar vardır (Beck and Ziegler, 1989; Nakajima *et al.* 2004). İkinci tip aile, önceden belirlenmiş bir hedef peptit içermemesi ile karakterize edilir ve bu nedenle sitoplazmaya lokalize olduğu düşünülmektedir. Yapılan gen analizi ile üç enzim ailesinin atalara ait bir bitki α -amilazına yakın olduğu belirlenmiştir (Stanley *et al.* 2002). Ailenin üçüncü α -amilazı, tipik olarak uzunluğu 400-500 amino asit olan geniş bir N-terminal alanı ile karakterize edilir. Birinci tip α -amilazlar, örneğin, tahıl tanelerinin ve dikotiledon tohumların endospermde (Beck and Ziegler, 1989; Nakajima *et al.*, 2004), örneğin hücre ölümünün meydana geldiği hastalıklı dokularda, hücre dışı nişastanın parçalanmasında rol oynarlar (Heitz *et al.*, 1991; Monroe *et al.*, 2003). Salgılanan α -amilazlar ayrıca, polen tüpünün çimlenmesi ve stigma yüzeyinin

istilası sırasında büyüme için de önemli olabilir (Edlund ve ark. 2004). İkinci tip α -amilaz, muhtemelen hipotetik bir sitozolik α -glukan veya bir heteroglikanı bozan sitozolik enzimlerdir (Yang & Steup 1990; Fettke *et al.* 2004). Bu polisakkarit, nişasta parçalanma ve heksoz fosfat metabolizması işlemleri arasında bir tampon görevi görebilir (Chia ve diğ., 2004). Bu α -amilaz ailesinin genel stres tepkilerine cevap oluşturması da mümkündür. Örneğin, bitkilerde soğuk aklimasyon sırasında sitozolde çözünür şekerlerde ve heksozfosfatlarda bir artış meydana gelir (Ristic ve Ashworth, 1993; Hurry ve diğerleri, 1995) ve sitozolik α -glukanda geçici bir artışa yol açabilir. Soğuğa tepki olarak upregüle edilmiş olan α -amilazlar (Wegrzyn ve diğerleri, 2000), sitozolik α -glukanın parçalanmasından sorumlu olabilir ve karbonun plastid membranlar boyunca taşınmasına izin vermeden sitosol içinde yüksek şeker konsantrasyonunu bu şekilde koruyabilir. Üçüncü α -amilaz familyası, nişasta depolama dokularında ve belki nişasta fosforilasyonunun düşük olduğu ya da saptanamadığı diğer bitki türlerinin yapraklarındaki plastid bağlı nişastanın parçalanmasından sorumlu olabilir (Blennow ve ark. 2002). Bu enzim hızla β -amilazlar ve ayıklama enzimleriyle degrade edilebilen plastidial nişastadan çözünebilen α -glukanlar üretebilir.

Mevcut çalışmada çimlenme parametreleri ile beraber çimlenme enzimleri olan izositrat liyaz ve malat sentaz enzimlerinin hem aktivite hem de gen ekspresyon seviyeleri üzerine lipoik asit indüklü biyokimyasal ve moleküler etkisinin yine çimlenme için önem arz eden α -amilaz enzimi aktivitesi ile beraber değerlendirilmesi ve ayrıca lipoik asit uygulamasının çimlenme üzerine olan etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Soğutucu (+4°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-20°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-86°C)	: Nuaire, Glacier NU-9483 17.1, USA
Elektroforez	: Biorad elektroforez sistemleri
Hassas terazi	: Shimadzu AT220
Çoklu plaka okuyucu	: Thermo, Multi Scan Go/Epoch Biotek
Karıştırıcı	: Fisons Whirlimixer
Manyetik karıştırıcı	: Heiodolph
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Otomatik pipetler	: Eppendorf, Axigen
PCR	: Qiagen-Rotor Gene
RNA izolasyon robotu	: Qiagen, Qiacube
RNA yoğunluk ölçüm cihazı	: Qiagen, QIAexpert
pH metre	: Mettler Toledo
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Micro 22 R
Spektrofotometre	: Shimadzu UV-1800
Ultra saf su cihazı	: Milipore Direct Q3

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanma Koşulları

Çalışmada kullanılmış olan çözeltilerin hazırlanış şekilleri ve kullanıldığı parametreler aşağıda detaylı bir şekilde belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm sarf ve kimyasal maddeler Sigma ve Merck şirketlerinden temin edilmiştir.

1. 10, 20, 25 ve 35 µM Lipoik asit çözeltisi: 100 ml, 1 mM stok lipoik asit çözeltisi hazırlandı. 0,0206 g lipoik asit tartılıp bir miktar alkolle çözümlenerek üzerine saf su ilave

edilir ve son hacmi 100 ml'ye tamamlanır. Stok çözeltilerden 1 ml alınıp üzeri saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak 10 µM lipoik asit çözeltisi, 2 ml alınıp üzeri saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak 20 µM lipoik asit çözeltisi, 2.5 ml alınıp üzeri saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak 25 µM lipoik asit çözeltisi ve 3.5 ml alınıp üzeri saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak 35 µM lipoik asit çözeltisi elde edildi.

2. 0.1 M KH_2PO_4 (pH: 6.75), %1 PVP, 1 mM EDTA (protein ve antioksidan enzim aktiviteleri için homojenizasyon tamponu): 1.36 g KH_2PO_4 80 ml saf suda çözüldü, 1 N KOH kullanılarak pH 6.75'e ayarlandıktan sonra üzerine 1 g PVP ve 0,0292 g EDTA ilave edildi ve hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3. BCA reaktifi (Protein tayini için): 15 ml Bicinchoninic asit 0,3 ml CuSO_4 ile karıştırılarak hazırlandı.

4. 103.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.5 (Katalaz aktivitesi için tampon çözelti): 1.36 g KH_2PO_4 , 80 ml saf suda çözüldü, 1 N KOH ile pH 7.5'e ayarlandı. 40 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 346 µl %35'lik H_2O_2 çözeltisinden alınıp tampon üzerine ilave edildi ve hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

5. 5 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılan): 43 µl %35'lik H_2O_2 çözeltisinden alınıp hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

6. 0.1 M Na_2HPO_4 , pH 5.5 (Peroksidaz aktivitesi için tampon çözeltisi): 1.41 g Na_2HPO_4 alınarak 80 ml saf suda çözüldü ve pH 5.5'e ayarlandı. Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi (5mM guaikol + 5mM H_2O_2): 54 µl guaikol ve 15 µl H_2O_2 'dan (d: 1.13 g/mol) 5 mM olacak şekilde 0.1 M fosfat tamponu (pH 5.5) içinde çözülerek hazırlandı. Tamponun hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

- 7.** 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.8) (SOD aktivitesi için tampon çözelti): 1.36 g KH_2PO_4 80 ml saf suda çözüldü, pH 7.8'e ayarlandı. 13 mM metiyonin çözeltisi (SOD reaksiyon karışımı için): 0,193 g metiyonin alınır, 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözüldü. 63 μM Nitroblue Tetrazolium Klorür (NBT) (SOD reaksiyon karışımı için): 0.005 g NBT alınır, 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözüldü. 0.1 mM EDTA-Etilen Diamin Tetra Asetik asit (SOD reaksiyon karışımı için): 0.0029 g EDTA alınır, 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözüldü. Tamponun hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- 8.** 13 μM riboflavin (SOD aktivitesi için 2. çözelti): 0,012 g riboflavin, 250 ml saf suda çözüldü.
- 9.** 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.0) (APX aktivitesi için tampon çözeltisi): 1.36 g KH_2PO_4 80 ml saf suda çözüldü, pH 7.0'ye ayarlandı. 250 μM olacak şekilde 0.0044 g askorbik asit tartıldı ve APX çözeltisi için hazırlanan tampona ilave edildi. 5 mM olacak şekilde 15 μl H_2O_2 çözeltisi alınıp APX tampon çözeltisine ilave edildi ve hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- 10.** 50 mM Tris-HCl (pH 7.8)(GR aktivitesi için tampon çözelti): 0.788 gr trizma tartıldı ve 80 ml saf suda çözümlenerek pH 7.8'e ayarlandı. Üzerine 0.014 g EDTA (0.5 mM) ilave edildi ve hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- 11.** 0.25 mM NADPH çözeltisi hazırlamak için (GR aktivitesi için): 0.0020 g NADPH bir miktar saf su içerisinde çözüldü ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
- 12.** 1 mM oksitlenmiş glutatyon (GSSG) (GR aktivitesi için): 0.0065 g GSSG bir miktar saf su içerisinde çözüldü ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
- 13.** %5'lik TCA (GSH ve AsA için homojenizasyon tamponu): 1 g TCA bir miktar saf su içerisinde çözüldü ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

- 14.** 200 mM Na₂HPO₄ (GSH içeriği belirlemek için): 0.283 g Na₂HPO₄ bir miktar saf su içerisinde çözüldü ve pH 7.5'e ayarlandı ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
- 15.** 50 mM Na₂-EDTA (GSH içeriği belirlemek için)Ç 0.186 g Na₂-EDTA bir miktar saf su içerisinde çözüldü ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
- 16.** 2 mM β-NADPH (GSH içeriği belirlemek için): 0.016 g β-NADPH bir miktar saf su içerisinde çözüldü ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
- 17.** 6 mM DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) (GSH içeriği belirlemek için): 0,023 g DTNB bir miktar saf su içerisinde çözüldü ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
- 18.** 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.0) (AsA içeriğini belirlemek için): 1.36 g KH₂PO₄ 80 ml saf suda çözüldü, pH 7.0'ye ayarlandı. Çözeltinin üzerine 0.0876 g EDTA (3 mM) ve 0.0154 g DTT (1 mM) ilave edildi iyice karıştırıldı ve hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- 19.** 0.61 M TCA çözeltisi (AsA içeriğinin belirlenmesi için): 0.996 g TCA (0.61 M) tartıldı bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
- 20.** 2.5 N HCl (Total karbohidrat içeriği için homojenizasyon tamponu): 35 ml için 7.25 ml HCl alınır üzeri saf su ile 35 ml'ye tamamlanır.
- 21.** Antron çözeltisi (Total karbohidrat içeriği için): 200 mg antron tartıldı ve 90 ml soğuk %95'lik sülfürik asit içerisinde çözüldü ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
- 22.** %10 Na₂CO₃ çözeltisi (fenolik madde içeriği için): 10 g Na₂CO₃ tartılarak bir miktar saf su içerisinde çözümlenerek son hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

23. 0.051 M sodyum asetat (α -amilaz aktivitesi için homojenizasyon tamponu): 0.082 g sodyum asetat tartıldı ve 80 ml saf su içerisinde çözülerek pH 5.6 olarak ayarlandı. İçerisine 0.221 g CaCl_2 (0.02 M), 0.116 g NaCl (0.02 M) ve 1 g PVP (%1) ilave edildi ve hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

24. %0.15'lik nişasta çözeltisi (α -amilaz aktivitesi için): 0.082 g sodyum asetat (0.01 M, pH 5.6) tartıldı bir miktar saf su içerisinde çözüldü üzerine 15 g nişasta ilave edilerek hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

25. %0.5 I_2 ve %5 KI çözeltisi (α -amilaz aktivitesi için): 0.5 g I_2 ve 5 g KI tartıldı ve bir miktar saf su içerisinde çözüldükten sonra hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

26. 0.165 M N-trishidroksimetilglisin (pH 7.5) (izositrat liyaz ve malat sentetaz aktiviteleri için homojenizasyon tamponu): 2.956 g tartıldı ve 80 ml saf su içerisinde çözülerek pH 7.5'e ayarlandı. 13.69 g sukroz (0.4 M) ve 0.154 g DTT (0.01 M) ilave edilerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

27. 87 mM fosfat tamponu (pH 6.9) (izositrat aktivitesi için): 1.183 g tartıldı ve 80 ml saf su içerisinde çözülerek pH 6.9'a ayarlandı. 0.07 g DDT (4.6 mM), 0.082 g MgCl_2 (8.7 mM), 0.299 g izositrat (13 mM) ve 0.108 g fenilhidrazin (10 mM) ilave edildi ve hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

28. 77 mM tris (pH 8.0) (malat sentetaz aktivitesi için): 0.932 g tris tartıldı ve 80 ml saf su içerisinde çözülerek pH 8.0'a ayarlandı. 0.059 g DTNB (1.5 mM), 0.073 g MgCl_2 (7.7 mM), 1.45 g asetil Co-A (18 mM) ve 0.228 g sodyum gliksilat (20 mM) ilave edildi ve saf su ile hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

29. 0.4 M mannitol, 50 mM MOPS, 2mM EGTA, 4 mM L-sistein, %0.6 PVP, 20 mM β -merkaptotanol, %0.5 BSA (Mitokokondri izolasyonu için homojenat tamponu): 3.64 g mannitol, 0.5225 g MOPS 40 ml saf suda çözüldü, pH 7.2'ye ayarlandıktan sonra 0.0388 g EGTA, 0.0242 g L- sistein, 0.3 g PVP, 0.25 g BSA ve 70 μl β -merkaptotanol, aynı çözeltide çözüldü ve son hacmi saf su ile 50 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

- 30.** Monomer (akrilamid/bis) çözeltisi (%30 akrilamid, %2.7 bis): 29.2 akrilamid 80 ml saf suda çözüldü. Üzerine 0.8 g bis katılıp çözüldü ve son hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
- 31.** 1.5 M Tris (pH 8.8) (Ayırma jeli tamponu için): 18.15 g tris tartıldı ve 50 ml saf su içerisinde çözüldü. 1 N HCl ile pH 8.8' e ayarlandı ve hacmi saf su ile 100 ml' ye tamamlandı.
- 32.** 0.5 M Tris (pH 6.8) (Yükleme jeli tamponu): 3 g tris tartıldı 40 ml saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH 6.8' e ayarlandı ve hacmi saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.
- 33.** %10 SDS: 1g SDS son hacim 10 ml olacak şekilde saf suda çözüldü.
- 34.** %10 Amonyum persülfat (polimerizasyon başlatıcı): 0.05 g amonyum persülfat tartıldı ve son hacmi 500 µl'ye saf su ile tamamlandı.
- 35.** Örnek uygulama tamponu (0,125 M Tris, %4 SDS, %20 gliserol, %10 2-merkaptotanol, %0,2 bromfenol mavisi pH 6.8): 2.5 ml yükleme jeli tamponu, 4 ml %10 SDS, 2 ml gliserol, 1 ml 2-merkaptotanol alınıp son hacim 10 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanır, pH 6.8'e ayarlandı. Karışıma 0.02 g bromfenol mavisi katılarak karıştırıldı. Kullanılacak hacimlere bölünüp -20°C'de saklandı.
- 36.** Tank tamponu (0.025 M Tris, 0.192 M glisin, %0.1 SDS, pH 6.8): 3g Tris, 14.4 g glisin, 1 g SDS 900 ml saf suda çözülerek pH 6.8'e ayarlandı. Son hacmi 1000 ml'ye saf su ile tamamlandı.
- 37.** İnkübasyon çözeltisi (Amilaz izoenzimi için): 2.77 g sodyum asetat tamponu (0.1 M, pH 4.6) tartıldı ve 200 ml saf su içerisinde çözülerek pH 4.6 olarak ayarlandı. İçerisine 0.277 g CaCl₂ (10 mM) ve %1.75 olacak şekilde 5 gram çözümlü nişasta ilave edildi ve son hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

38. Boyama çözeltisi (Amilaz izoenzimi için): 0.360 g I₂ ve 1.795 g KI tartıldı ve bir miktar saf su içerisinde çözüldükten sonra hacmi saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

39. RNA izolasyonu için: Rneasy plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılmıştır. Real-time pcr aşamasında kullanılan genler ve housekeeping gen (β actin) için spesifik primerler ve Taqman propları Qiagen firmasında dizayn ettirilmiştir.

3.3. Yöntemler

3.1.1. Bitkilerin temin, büyütme ve lipoik asit uygulama koşulları

Yapılan bu tez çalışmasında mısır (*Zea mays* cv. Hido) tohumu kullanıldı. Tohumlar May Tohumculuktan temin edildi. Tohumlar ekilmeden önce %96'luk alkol ile hızlıca yıkanarak %5'lik sodyum hipoklorit içerisinde yaklaşık 10 dk. yüzey sterilizasyonuna tabi tutuldu. Sterilizasyon işlemi sonrasında tohumlar saf su ile iyice yıkanarak oda koşullarında kontrol grubu saf su içerisinde, uygulama grupları ise hazırlanan konsantrasyonlardaki lipoik asit çözeltileri (10, 20, 25 ve 30 μ M lipoik asit) içerisinde devamlı çalkalanarak yaklaşık 6 saat şişmeye bırakıldı. Sterilizasyonu yapılmış olan ve alt tabakasında iki kat filtre kağıdı bulunduran petri kaplarına her gruba kendi çözeltisinden olmak koşulu ile 13 ml ilave edildi ve o çözeltide şişirilen 10 adet mısır tohumu yerleştirildi. Yaklaşık 4 gün süre ile çimlenmeleri için 25°C'ye ayarlı olan çimlenme kabinine yerleştirildi. Tohumlar amilaz aktivitesi için 1, 2, 3 ve 4. gün hasat edilirken, diğer parametreler için ise 4. günde hasat edilerek moleküler ve biyokimyasal parametrelerindeki değişimler belirlenmeye çalışıldı.

3.3.2. Kök ve gövde uzunluklarının belirlenmesi

Hasat edilen mısır bitkilerinin kök ve gövde kısımları bir cetvel yardımı ile ölçülerek sonuçlar cm cinsinden verildi.

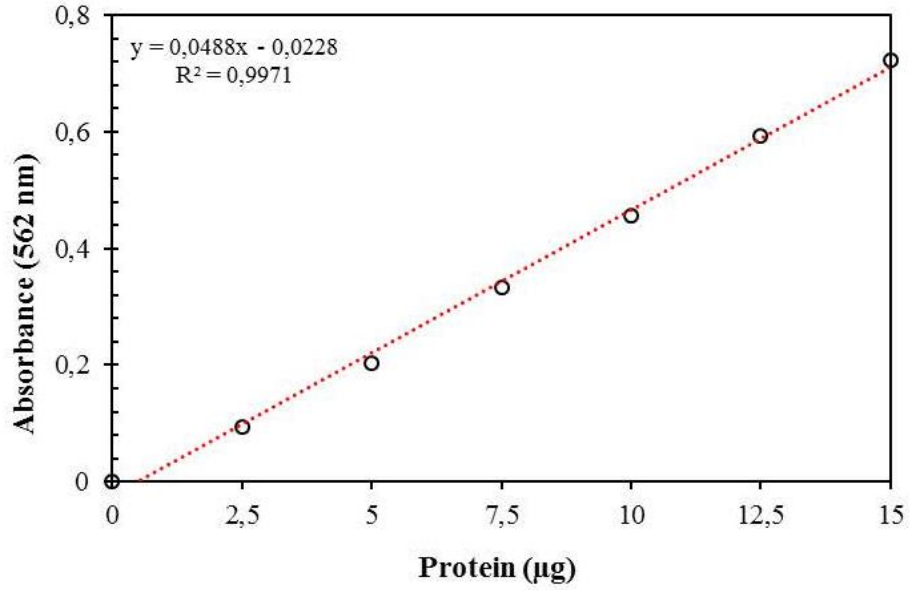
3.3.3. Çimlenme yüzdesinin belirlenmesi

Çimlendirilmeye bırakılan tohumların 1, 2, 3 ve 4. gün olmak koşulu ile her gün çimlenme sayıları belirlenerek çimlenme yüzdeleri hesaplandı.

3.3.4. Çözünabilir protein miktarının tayini

Mısır bitkisinin kök, gövde ve endospermelerinden Smith ve arkadaşlarının yaptığı metoda göre protein tayini spektrofotometrik yolla tayin edildi (Smith *et al.* 1985). Sonuçlar “mg protein/g taze doku” cinsinden hesaplandı. Protein miktarının belirlenmesi için gerekli olan standart grafik şu şekilde hazırlandı; 1 ml’inde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden 0, 2.5, 5, 7.5, 10 ve 12 µg protein içeren hacimler mikropalakadaki kuyucuklara aktarılıp, saf su ile bütün kuyucukların hacimleri 12 µl ’ye tamamlandı. Bu kuyucuklara 0.2’şer ml de BCA (Bicinchoninic asit+ CuSO₄) reaktifi ilave edilip karıştırıldı. Kör numune olarak 0.2 ml BCA reaktifi kullandı. Plaka kısa süreli çalkalma işleminden sonra 15 dk. boyunca 65°C’de inkübe edildi. Spektrofotometrik ölçümler sonucunda, 562 nm’deki absorbans değerlerine karşılık gelen protein değerleri kullanılarak standart grafik elde edildi.

0.18’er gram kök, gövde ve endosperm örnekleri 1.8 ml 0.1 M fosfat tamponunda (pH 6.75) homojenize edilerek 15.000 rpm’de 15 dk. santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alınarak protein kaynağı olarak kullanıldı. Örneklerden 15 µl alınıp, 0.2 ml BCA reaktifiyle karıştırıldı, 65°C’de 15 dk. bekletildikten sonra 562 nm’de absorbansları ölçüldü ve standart grafikten yararlanılıp, 15 µl homojenattaki protein miktarları belirlendi. Standart grafik kullanılarak gerekli hesaplamalar yapıldı ve protein miktarları “mg protein/g taze doku” olarak ifade edildi.



Şekil 3.1. Protein tayininde kullanılan standart grafik

3.3.5. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

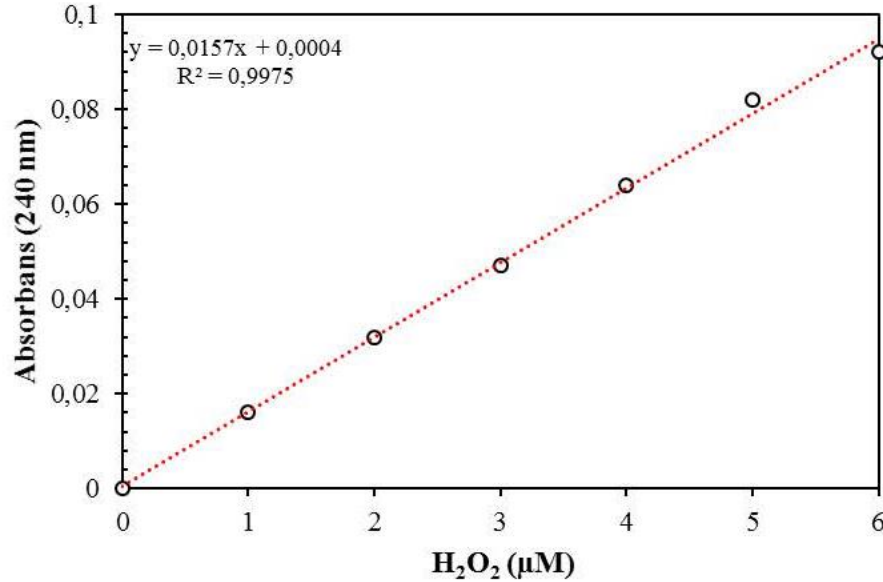
0.18'er gram kök ve gövde örnekleri 1.8 ml 0.1 M fosfat tamponunda (pH 6.75) ekstrakte edilerek 15 dk. boyunca 15.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alındı ve -86 °C'de enzim kaynağı olarak kullanılmaya kadar muhafaza edildi.

3.3.5.a. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz (CAT) aktivitesi tayini, Gong *et al.* (2001) metodu kullanılarak belirlendi. Bu yöntem, katalazın ortamdaki H₂O₂'nin oksijen ve suya dönüşümünü sağlayarak oluşan absorbans değişiminin 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır.

Standart grafik reaksiyonda azalan H₂O₂ miktarını belirlemek için hazırlandı. Standart grafik şu şekilde hazırlandı; 5 mM H₂O₂ çözeltisinden 3 ml'lik spektrofotometre küvetlerine sırasıyla; 0, 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35 ve 1.5 ml konuldu, tüplerin hacimleri saf su ile 1.5 ml'ye tamamlandı ve her tüpe 1.47 ml 103.5 mM KH₂PO₄ ve 30 µl su ilave edildi. Spektrofotometrede 240 nm'de köre karşı okundu ve absorbans değerlerine karşılık gelen µM H₂O₂ değerleri kullanarak standart grafik elde edildi.

Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine, 103 mM KH_2PO_4 tamponundan 1.475 ml ve 40 mM'lık H_2O_2 substrat çözeltisinden 1.5 ml konulduktan sonra, 25 μl enzim ekstraktı ilave edildi. Spektrofotometrede 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı okundu ve absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla μmol cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürüldü. 25°C'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 μmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi ve sonuçlar g doku başına düşen enzim ünitesi ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein) olarak sunuldu.



Şekil 3.2. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik

3.3.5.b. Guaikol Peroksidaz (GPX) aktivitesinin belirlenmesi

Guaikol peroksidaz (GPX) aktivite tayini, guaikol ve H_2O_2 'nin substrat olarak kullanıldığı ve oluşan renkli reaksiyon ürününün meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de belirlenmesi esasına dayanmaktadır.

GPX aktivitesi için; 100 ml 0.1 M, NaH₂PO₄ (pH 5.5) ve 5 mM guaikol ve 5mM H₂O₂ içeren substrat çözeltisinden 3 ml spektrofotometre küvetine konulduktan sonra, üzerine 10 µl enzim özütü ilave edildi. 470 nm'de 1 dakika aralıklarla olmak koşulu ile 5 dakika boyunca absorbans artışı kaydedildi ve bulunan absorbans artışı 1 dakikaya oranlanarak dakikadaki absorbans hesaplandı. Oda koşullarında 1 dakikada, absorbansı 0.01 artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi ve sonuçlar g doku başına düşen enzim ünitesi (U.mg⁻¹ protein) olarak sunuldu (Yee *et al.* 2002; Erdal 2010).

3.3.5.c. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi

SOD aktivitesi, süperoksit radikalleri ile nitro blue tetrazoliumun (NBT) oluşturduğu mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirlenmesidir (Mutlu 2009).

Reaksiyon karışımı (3 ml); 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.8), 13 mM metiyonin, 63 µM NBT, 13µM riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için, reaksiyon karışımından 2.915 ml alınarak küvete aktarıldı ve üzerine 35 µl enzim ekstraktı pipetlenerek karıştırıldı. Daha sonra küvet üzerine 13 µM'lık riboflavin çözeltisinden 50 µl pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirilerek reaksiyon başlatıldı. Küvet, 15 dk. boyunca ışık kaynağının karşısında bekletildi ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durduruldu. 15 dk. içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okundu. Kör; aynı işlemin enzim içermeyen örneğinden oluşmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi ve değerler U.mg⁻¹ protein olarak sunuldu (Agarwal and Pandey 2004; Yordanova *et al.* 2004).

3.3.5.d. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tayini

APX aktivitesi, 290 nm'de absorbansdaki azalışa bağlı olarak belirlendi (Nakano and Asada 1981). Aktivite, 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.0), 250 µM askorbik asit (ASC), 5 mM

H₂O₂ ve 20µl enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlendi. APX aktivitesi, 290 nm'de ASC için 2.8 mM⁻¹cm⁻¹ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar U.mg⁻¹ protein olarak verildi.

3.3.5.e. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin tayini

Glutasyon redüktaz aktivitesi spektrofotometrik olarak 340 nm'de Foyer ve Halliwell (1976)'in metoduna göre belirlendi. Aktivite belirlenmesinde substrat olarak 0.25 mM NADPH ve 1 mM oksitlenmiş glutasyon (GSSG) kullanıldı. Yükseltgenmiş glutasyonun enzim tarafından 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 340 nm'de 5 dakika boyunca azalmanın ölçülmesiyle belirlendi. GR aktivitesi U.mg⁻¹ protein olarak ifade edildi.

3.3.6. Antioksidan maddelerin içeriklerinin belirlenmesi

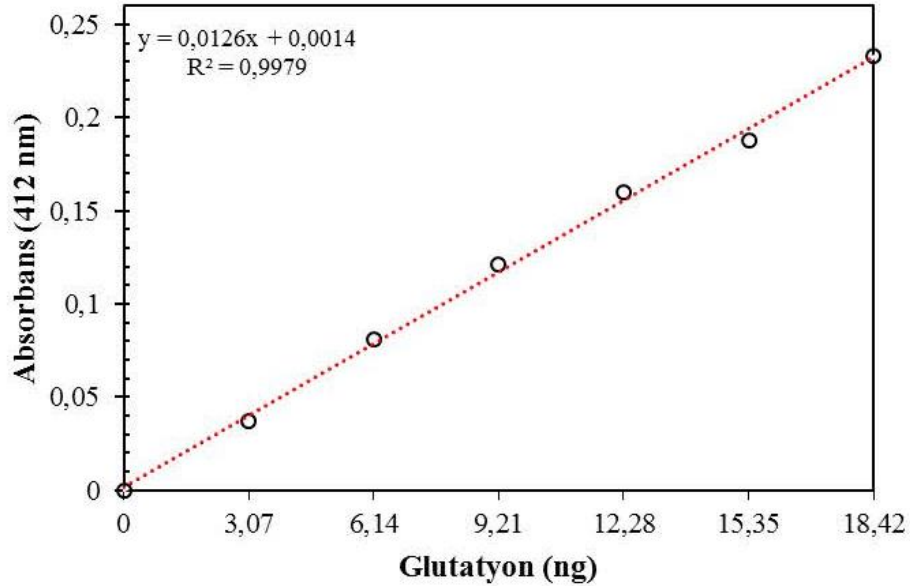
3.3.6.a. Glutasyon ve askorbik asit ekstraksiyonu

Kök ve gövdelerden alınan 0.18 g doku 1.8 ml %5'lik TCA içerisinde homojenize edildi. Ekstrakt 4°C'de 12.000xg'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant glutasyon ve askorbik asit içeriğinin belirlenmesinde kullanıldı.

3.3.6.b. Glutasyon (GSH) ve GSSG içeriğinin belirlenmesi

Glutasyon içeriği Hodges *et al.* 1996 prosedürünün Wu *et al.* (2009) tarafından modifiye edilmiş olan metodun kullanılması ile belirlendi. Glutasyon içeriğini belirlerken 0.3 ml süpernatant üzerine 38.7 µl K₂CO₃ (1.25 M) katıldı. Karışım 12.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Total GSH içeriğini belirlemek için 0.1 ml süpernatant, 0.5 ml sodyum fosfat (200 mM pH 7.5), 0.1 ml Na₂EDTA (50 mM), 0.1 ml β-NADPH (2 mM), 0.1ml

DTNB (6 mM), 0.1 ml 5 U/ml GR ilave edilip karıştırıldı. 30°C’de 5 dakika bekletildikten sonra 412 nm’deki absorbans değişimleri kaydedildi. GSSG içeriğini belirlemek için ise 0.1 ml süpernatant alınarak üzerine 2 µl 2-vinil pridin eklendi ve 1 saat 25°C’de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda total GSH içeriği belirlenirken yukarıda kullanılan çözeltiler aynı şekilde katıldı ve 412 nm’deki absorans değişimleri ölçüldü. Total GSH içeriğinde bulunan GSSG içeriği çıkarılarak GSH içeriği belirlendi. GSH içeriği standart grafikten yararlanılarak gram dokudaki ng cinsinden hesaplandı.

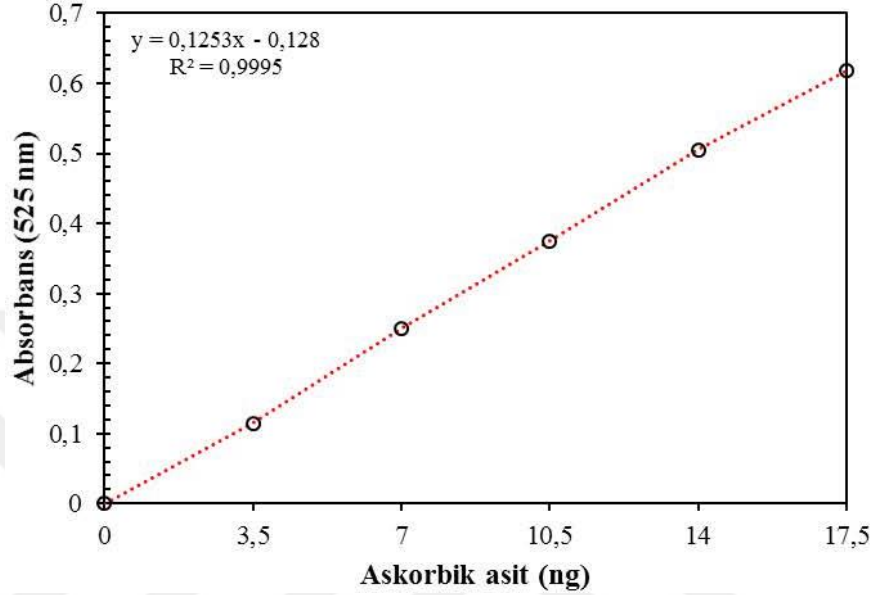


Şekil 3.3. Glutasyon içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.6.c. Askorbik asit (ASC) içeriğinin belirlenmesi

Askorbik asit içeriği Hodges *et al.* (1996) metodunun Wu *et al.* (2009) tarafından modifiye edilmiş hali ile belirlendi. Süpernatanttan 200 µl alınarak üzerine 800 µl 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.4), 3 mM EDTA, 1 mM dithioeritrol (DTT) içeren karışımdan eklendi. Karışım kısa bir şekilde vortekslendikten sonra 25°C’de 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra karışım üzerine sırasıyla 100 µl N-ethylmaleimide, 400 µl 0.61 M TCA, 400 µl ortofosforik asit ve 400 µl α-bipyridyl eklenerek iyice karıştırıldı. Yeni karışım üzerine 200 µl FeCl₃ eklenerek vortekslendi ve 1 saat süreyle 40°C kuru blokta

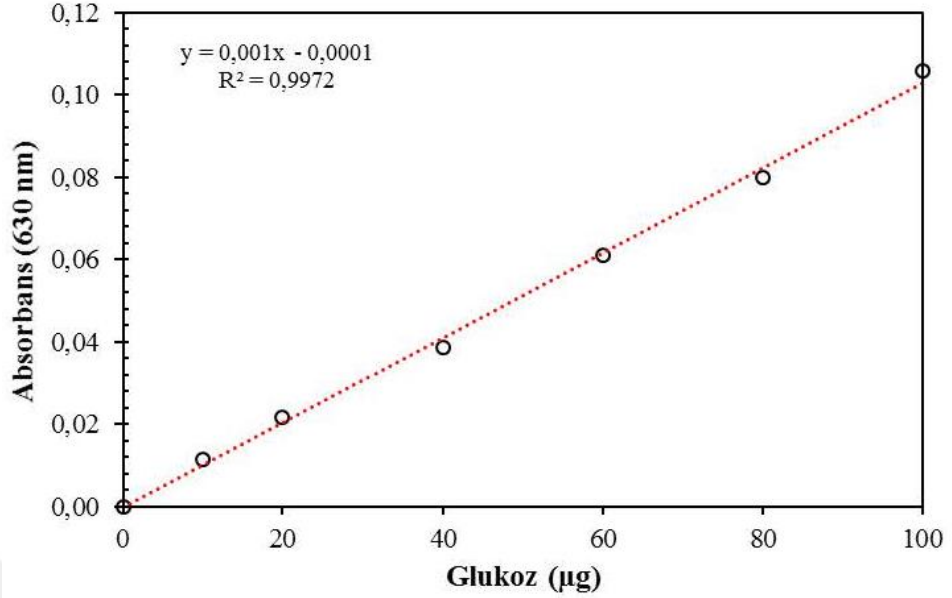
inkübe edildikten sonra 525 nm de absorbans değerleri belirlendi. Askorbik asitin konsantrasyonu standart grafikten gram dokudaki ng cinsinden hesaplandı.



Şekil 3.4. Askorbik asit içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.7. Total karbohidrat içeriğinin belirlenmesi

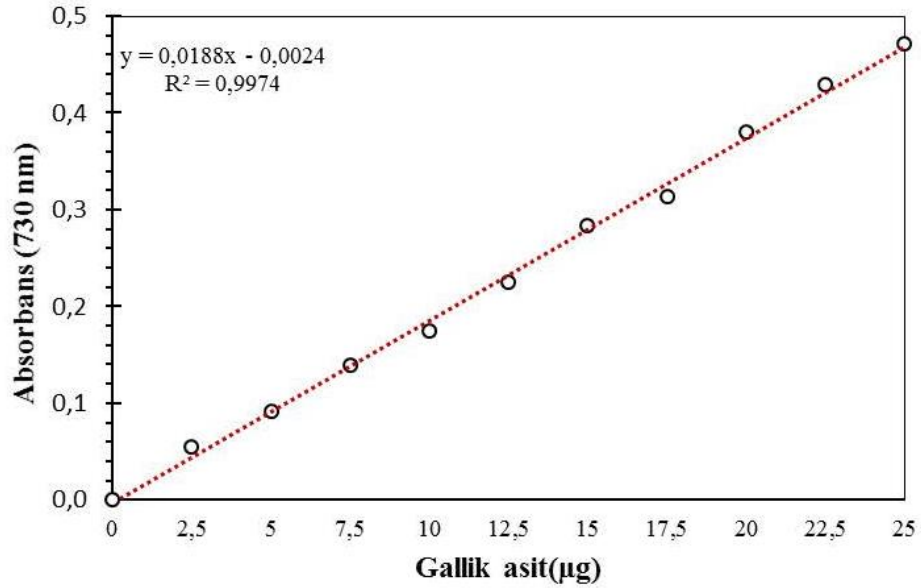
Total karbohidrat içeriği Dische Z. (1962) tarafından kullanılan metotta küçük modifikasyonlar yapılarak belirlendi. Mısır bitkisinin kök, gövde ve endospermelerinden alınan 0.1 g doku örnekleri 5 ml soğuk 2.5 N HCl içerisinde homojenize edildi. Homojenatlar 3 saat 100°C sıcak suda bekletildikten sonra soğuk su banyosuna alınarak soğutuldu. Üzerlerine reaksiyon duruncaya kadar katı Na₂CO₃ ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Reaksiyon durunca üzerleri 45 ml saf su ile 50 ml olacak şekilde tamamlandı ve 15.000 rpm' de 15 dk. boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra 50 ml içerisinden 1 ml süpernatant alınarak üzerine 4 ml Antron çözeltisi ilave edilerek tekrar soğutulduktan sonra 630 nm'de ki absorbans değişimleri okunarak kaydedildi. Total karbohidrat içeriği standart grafikten gram dokudaki µg cinsinden hesaplandı.



Şekil 3.5. Total karbohidrat içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik

3.3.8. Fenolik madde içeriğinin belirlenmesi

Fenolik madde içeriğinin belirlenmesi için Dewanto *et al.* (2002) tarafından belirlenen prosedürde bazı modifikasyonlar yapılarak uygulandı. Mısır bitkisinin kök ve gövdelerinden alınan 0.18 gr örnekler 1.8 ml 0.1M'lık fosfat tamponunda homojenize edildi. Homojenatlar 15.000 rpm de 15 dk. santrifüj edildi. Sonrasında süpernatanttan 0.5 ml alınarak 5 ml saf su ile dilüe edildi. Buradan 1 ml alınarak üzerine 1 ml 1N folin çözültisi ilave edilip karıştırıldı ve 5 dakika inkübe edildi. Numunelerin üzerine 2 ml % 10 Na₂CO₃ çözültisi ilave edildi 10 dakika oda sıcaklığında ikinci kez inkübe edildi. 150xg'de 8 dakika santrifüj edildi ve 730 nm'de absorbans değişiklikleri kaydedildi. Gallik asit kullanılarak hazırlanan standart grafikten yararlanılarak fenolik madde içeriği gram dokudaki µg doku olarak hesaplandı.



Şekil 3.6. Fenolik madde içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik

3.3.9. Çimlenme parametrelerinin belirlenmesi

3.3.9.a. α -Amilaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

α -amilaz aktivitesinin belirlenmesi için mısır endospermeleri 1, 2, 3 ve 4. günlerde hasat edildi. Hasat edilen endospermelerin 0.2 gramı 3.5 ml 0.02 M CaCl_2 , 0.02 M NaCl ve % 1 PVP bulunduran 0.01 M (pH 5.6) Na-asetat tamponu içerisinde homojenize edildi. 12.000xg de 15 dakika santrifüj edildi (Valencia *et al.* 2000). 0.01 M sodyum asetat tamponu (pH 5.6) içerisinde %0.15 çözünür nişasta içeren solüsyondan 500 μl alınıp üzerine homojenizasyon tamponundan 650 μl ilave edildi ve karıştırıldı. En son da üzerine 50 μl enzim kaynağı eklenerek iyice karıştırıldı ve 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Karışım üzerine 5 ml iyot çözeltisi (%0.5 I_2 ve %5 KI) ilave edildi ve 620 nm'de absorbans değişiklikleri okunarak kaydedildi.

3.3.9.b. İzositrat liyaz ve Malat sentaz enzimlerinin ekstraksiyonu

İzositrat liyaz ve malat sentetaz aktivitesi tohumların çimlendikten sonra 4. gününde endosperm dokusunda belirlendi. Bunun için 10 g endosperm dokusu 15 ml homojenizasyon tamponunda 4°C’de homojenize edildi. Homojenizasyon tamponu 0.4 M sukroz, 0.165 M N- trishidroksimetilglisin (pH 7.5) ve 0.01 M dithiotretiol’ dan oluşmaktadır. Homojenizasyon işleminin ardından homojenat 10 dakika 270xg’de santifüj edilip ardından pelet kısmı 4 ile 6 ml homojenizasyon tamponunda tekrar homojenize edildi. Homojenat 23.000 rpm’de 5 saat santifüj edilerek süpernatant kısmı enzim kaynağı olarak kullanıldı (Cooper and Beever 1969).

3.3.9.c. İzositrat enzim aktivitesinin belirlenmesi

İzositrat liyaz aktivitesi Kornberg (1960)’ın tanımladığı metoda göre belirlendi. Bu metoda göre endosperm dokusundan elde edilen 15 µg protein içeren örnekler 87 mM fosfat tamponu (pH 6.9), 4.6 mM dithiothreitol, 8.7 mM MgCl₂, 13 mM izositrat, 10 mM fenilhidrazin reaksiyon karışımı ile son hacim 1.2 ml olacak şekilde karıştırıldı. Reaksiyon karışımındaki izositrat en son katılarak reaksiyon başlatıldı. 324 nm’de reaksiyonun absorbans değişimi kaydedildi. Kör numune olarak protein örneği içermeyen numune kullanıldı. $\epsilon_{324} = 1.7 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ katsayısına göre enzim aktivitesi belirlendi.

3.3.9.d. Malat sentaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Malat sentaz aktivitesi Hock nad Beever (1966)’ın tanımladığı metoda göre belirlendi. Bu metoda göre 77 mM tris (pH 8), 1.5 mM dithiobis(nitro benzoik asit), 7.7 mM MgCl₂, 18 mM asetil koenzim-A, 20 mM sodyum glioksalat ve 2-25 µg protein içeren reaksiyon karışımı kullanılarak enzim aktivitesi 412 nm’ de belirlendi. Kör numune olarak protein örneği içermeyen numune kullanıldı.

3.3.10. Mitokondri izolasyonu

Hasat edilen mısır bitkisinin kök ve gövdeleri homojen olması açısından öncelikli olarak sıvı azotta homojenize edildi. Tartılan bitki dokuları ağırlığının 4 katı kadar hacimde; 0.4 M mannitol, 50 mM MOPS (pH 7.2), 2mM etilen glikol tetra asetik asit (EGTA), 4 mM L-sistein, %0.6 polivilprolidin (PVP), 20 mM β - merkaptotanol ve %0.5 bovine serum albumin (BSA) içeren ekstraksiyon tamponunda 4°C’de homojenize edildi. Karışım 5 dakika 400xg’de santifüj edildi. Süpernatant kısmı alınıp 15 dakika 2000xg’de tekrar santifüj edildi. Santifüj işleminden sonra süpernatant alınıp 30 dakika 10.000xg’de tekrar üçüncü kez santifüj edildi (Plummer 1980; Chien 2011). Elde edilen pelet az miktarda CellLytic M Cell Lysis Reagent tamponunda homojenize edilerek 11.000xg’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak pelet az miktarda CellLytic M Cell Lysis Reagent tamponunda tekrar homojenize edilerek sitrat sentaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmak üzere -86 °C’de depo edildi.

3.3.11. Sitrat sentaz aktivitesinin belirlenmesi

İzole mitokondrilerden 10-80 μ g protein içeren örnekler, Citrate Synthase Assay Kiti (Catalog Number CS0720 Sigma-Aldrich) kullanılarak oda sıcaklığında üretici firma yönergesine uygun olarak inkübasyona tabi tutularak absorbanansı 412 nm’de ölçüldü. $\epsilon_{412} = 13.6 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ katsayısına göre enzim aktivitesi hesabı yapıldı (Kato *et al.* 1995).

3.3.12. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)

SDS-PAGE için %4–10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezinde Laemmli (1970) yöntemi ile yürütüldü. Bunun için elektroforez plakaları önce alkol, sonra su ile iyice yıkandı. İki cam plaka birbiri üstüne konularak kısıkaçlarla tutturulmuş ve jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Ayırma jeli hazırlanarak cam plakalar arasına pipetle aktarıldı. Bu işlemler yapılırken hava almamasına dikkat edildi ve jel yüzeyinin düzgün olması için izopropil alkol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerleşinceye kadar yaklaşık yarım saat beklendi. Polimerizasyon bittikten sonra üzerindeki izopropil alkol döküldü ve hazırlanan yığıma jeli cam plakaların en üst seviyesine kadar aktarıldı ve tarak dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Yaklaşık 45 dakika sonra cam plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme

tamponu konulup tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde numune tamponu içerisinde hazırlandı. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Beş dakika boyunca kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğuk su banyosuna alınıp kuyucuklara pipet yardımı ile aktarıldı. Tank kapağı kapatılarak (+) kablo (anot) ve (-) kablo (katot) yerleştirildi. Önce 80 voltluk akım yarım saat geçirildi. Daha sonra akım 120 volta ayarlanarak 2-4 saat kadar bir sürede oda sıcaklığında yürütme işlemi gerçekleştirildi. Süre sonunda akım kesilerek, cam plakalar tanktan alındı ve plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı.

Yığıma jeli: 1 M'lık Tris-HCl (pH 6.8)'den 380 µl, %30'luk akrilamid-%0.8'lik bisakrilamid'den 400 µl, %10'luk SDS'den 30 µl, %5'lik N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin'den (TEMED) 3 µl ve saf sudan 2.2 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanan %10'luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER)'den 30 µl ilave edildi.

Ayırma jeli: 2.03 ml 1M Tris-HCl (pH: 8.8), 2.67 ml %30'luk akrilamid, %0.8'lik bisakrilamid, 80 µl %10 SDS, 3.2 µl %5'lik TEMED ve 3.15 ml su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 80 µl %10'luk PER ilave edildi.

3.3.13. Amilaz izoenziminin belirlenmesi

Doğal page, yukarıda ifade edilen SDS-PAGE jelleri gibi aynı şekilde sadece SDS içermeden hazırlandı. 0.3 g endosperm dokusu 1.5 ml fosfat tamponunda (pH 6.75) homojenize edildi. Homojenatlar 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant alındı ve ikinci kez 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Amilaz enzimi izoenzimleri belirlenirken 50-300 µg protein ekstraktlarına %20 gliserol eklenip karıştırıldı ve kuyucuklara yüklendi. Çalışmada %7.5'luk ayırma jeli kullanıldı. Yığıma jelinde proteinler 80 volta yaklaşık 20 dakika yürütüldü. Ayırma jelinde 120 volta yaklaşık 120 dakika yürütüldü. Elektroforez sonrasında çıkarılan jel, 0.1 M sodyum asetat (pH 4.6) içerisinde hazırlanan 10 mM CaCl₂ ve %1.75'lik nişasta solüsyonunda 37 °C'de 15 dakika bekletildi. Nişastalı jelin bantları KI/I₂ solüsyonu ile boyandı ve bantlar Vilber Lourmat cihazı ile görüntüledi.

3.3.14. RNA izolasyonu ve gen analizleri

Sitrat sentaz, sitokrom oksidaz, izositrat liyaz, malat sentaz, pruvat dehidrogenaz ve ATP sentaz enzimlerinin gen analizinde RNA izolasyonu için Rneasy plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanıldı. Üretici firmanın talimatlarına göre 100 mg mısır bitki dokusundan RNA izolasyon robotu kullanılarak total RNA izole edildi. RNA içerisindeki genomik DNA kalıntılarını yok etmek için RNA izolasyonu yaparken genomik DNA elemine edici kolon kullanıldı, ardından RNA'nın miktarı ve saflığı QIAexpert (Qiagen) cihazı kullanılarak ölçüldü. cDNA hazırlarken bütün örneklerdeki RNA miktarı 1 µl'de 100 nanogram olacak şekilde eşitlendi. RT-NANOSCRİPT2 PD kiti protokolü uyarınca 12 µl RNA 0.2ml'lik PCR tüplerine alınıp üzerine 2 µl genomik DNA elemine edici tampon ilave edildi. 42°C'de 2 dk Thermal Cycler'daki inkübasyondan sonra örnekler üzerine; Reverse-transcriptase: 1 µl, RT Buffer: 4 µl, dNTP: 1 µl ilave edilerek hazırlanan karışımdan cDNA üzerine 6 µl eklenip son hacmin 20 µl olması sağlandı. 42°C'de 15 dk ve 95°C'de 3dk Thermal Cycler'da inkübasyona bırakıldı. Üretilen cDNA'ların yoğunluğunun seyreltilmesi için 91 µl RNAase ve DNAase içermeyen su eklendi. RT-PCR reaksiyon karışımı toplam hacim 20 µl olacak şekilde 5 µl cDNA, 1 µl Taqman problu reverse ve forward primerleri, 6.5µl dH₂O ve 12.5 µl Mastermix (Rotor-Gene Probe PCR Master Mix, 2x) içerecek şekilde hazırlanan karışım PCR tüplerine dağıtıldı.

Sitrat sentaz ve sitokrom oksidaz proteinlerinde referans gen olarak β-actin kullanılmıştır.

Gerçek Zamanlı PCR protokolü ise şu şekilde programlanmıştır;

1. Hold =95°C de 10 dakika (*Taq polymerase* aktifleşir)
2. Cycling (40 Döngü) = 95°C'de 10 saniye, 56°C'de 30 saniye (primerlerin yapışma sıcaklığına göre değişim gösterebilir). 72°C'de 30 saniye (okuma yapılan aralık).

Elde edilen Ct (Cycle threshold) değerleri, Qiagen sitesinde yer alan GeneGlobe Data Analiz Merkezi'nde kontrol ve kat değişim kriteri olarak β -actin referans geni kullanılması ile ham veri normalizasyonu ile $2^{\Delta Ct}$ yöntemine dayalı gerçek zamanlı PCR verilerini analiz etmek için kullanıldı.

Çizelge 3.1. Çalışılan genler, ID numaraları ve primer dizilimleri aşağıda yer alan tabloda verilmiştir (F: forward, R: reverse)

Genler	ID Numaraları	Primer Dizilimleri
<i>Zea Mays</i> Beta Actin	NM_001155179	F: GTGACAATGGCACTGGAATG R: CCATGCTCAATCGGGTACTT
<i>Zea Mays</i> Citrate synthase	NM_001152570	F: TGCTCACAGTGGAGTTTTGC R: AACACTCTTCGGCCTCTCAA
<i>Zea Mays</i> Cytochrome c oxidase	NM_001301541	F: CATGAGTGCGACTTGGAGAA R: TCAGGAGATGTACCCGCTTC
<i>Zea Mays</i> Isocitrate lyase	NM_001301519	F: GAGATGGCCAAGAAGCTGTG R: GTAGATGGTGTCCAGGTGCT
<i>Zea Mays</i> Malate synthase	NM_001111858	F: TCGACTTCGGCCTCTACTTC R: ATCCTCGCTTCTCTGGAGTG
<i>Zea Mays</i> ATP synthase	XM_0205466655	F: CACTTAACGAGCACCACCAG R: GGATCCTGCAGACTCTCTCC
<i>Zea Mays</i> Pyruvate dehydrogenase	NM_001308504	F: CTCAACATTTTCGGCCCTCTG R: CATAGTCGCCACGCTTGTAG

3.4. İstatistiksel analiz

Tezde sunulan sonuçlar, her bir uygulamadan üç örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 3 tekrerrür yapıldıktan sonra elde edilen 9 değerin ortalamasıdır. Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 20 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiki anlamlar $p < 0.05$ önem seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

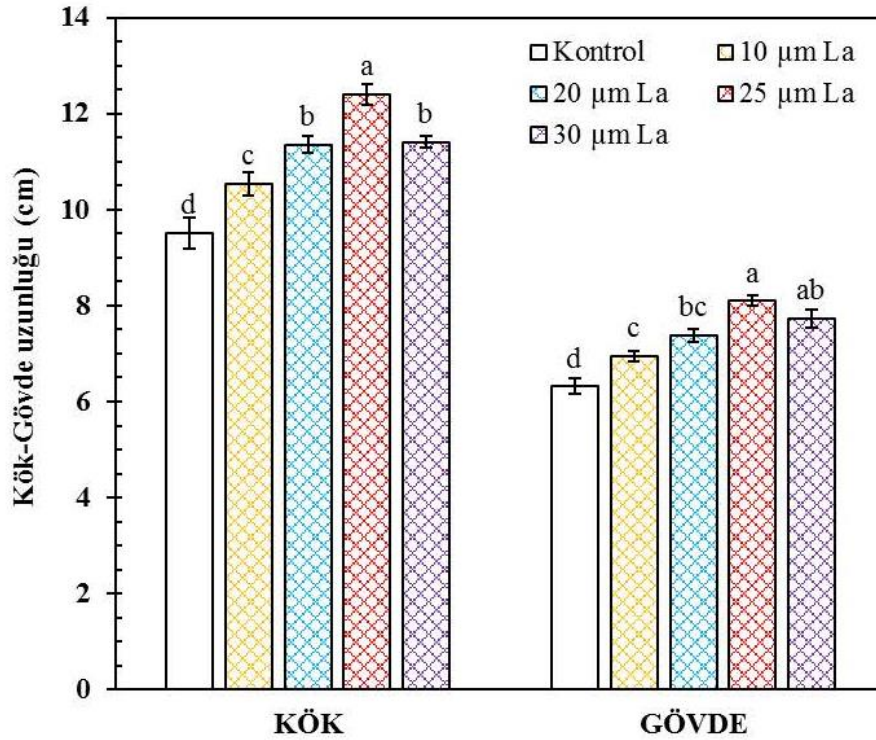
Çalışmamızda mısır (*Zea mays* L.) tohumlarının çimlenmesi ve solunum metabolizması üzerine etkisini belirlemek amacıyla kullanmayı düşündüğümüz α -lipoik asit'in en uygun konsantrasyonlarını bulmak için, öncelikli olarak literatür verilerinden de yararlanarak ön çalışmalar yapılmıştır. Ön çalışmalarda; 0,1 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M, 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M, 35 μ M, 40 μ M ve 50 μ M konsantrasyonlarda hazırlanan lipoik asit çözeltileri kullanıldı. Mısır tohumları farklı konsantrasyonlarda hazırlanan lipoik asit çözeltisi içerisinde yaklaşık 6 saat çalkalanmak koşulu ile şişirildi. Sterilizasyonu yapılmış olan ve alt tabakasında iki kat filtre kağıdı bulunduran petri kaplarına her gruba kendi çözeltisinden olmak koşulu ile 13 ml ilave edildi ve o çözeltide şişirilen 10 adet mısır tohumu ekildi. Yaklaşık 4 gün süre ile çimlenmeleri için 25°C'ye ayarlı olan çimlenme kabine yerleştirildi. Tohumlar 4. günde hasat edilerek çimlenme parametreleri olan kök gövde uzunlukları ile protein içeriklerine ve çimlenme süresi boyunca çimlenme yüzdelere bakılarak optimum konsantrasyon aralığı belirlendi (10, 20, 25 ve 30 μ M lipoik asit). Çalışmaya belirlenen bu konsantrasyon aralığı ile devam edildi. Tohumlar amilaz aktivitesi için 1, 2, 3 ve 4. gün hasat edilirken, diğer parametreler için ise 4. günde hasat edilerek moleküler ve biyokimyasal parametrelerindeki değişimler belirlenmeye çalışıldı.

Çizelge 4.1. Deney grupları

Oluşturulan Deney Grupları	
Kontrol	K
10 μ M Lipoik asit	10 μ M La
20 μ M Lipoik asit	20 μ M La
25 μ M Lipoik asit	25 μ M La
30 μ M Lipoik asit	30 μ M La

4.1. Lipoik Asidin Kök ve Gövde Uzunlukları Üzerine Etkisi

Kontrol bitkilerinde ortalama kök uzunluğu 9,51 cm olarak ölçülürken, 10, 20, 25 ve 30 μM La uygulamasında ise ortalama kök uzunluğu sırası ile 10,54, 11,35, 12,40 ve 11,41 cm olarak ölçüldü. Kontrole kıyasla LA uygulamalarında sırası ile %10,8, 19,4, 30,4 ve 20 oranında artış olduğu belirlendi. Kontrol bitkilerinde ortalama gövde uzunluğu 6,32 cm olarak ölçüldü. 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamalarında ortalama gövde uzunluğu kontrole kıyasla % 9,9, 16,7, 28,2 ve 22,2 oranında artış göstererek sırası ile 6,94, 7,38, 8,10 ve 7,72 cm olarak ölçüldü. En iyi artış oranı hem kök hem de gövdede 25 μM LA grubunda belirlendi. Bu bulgular, lipoik asit uygulamasının çimlenme safhasında olan mısır bitkilerinin kök ve gövde uzunluğu üzerine uyarıcı bir etkiye sahip olduğunu gösterdi (Şekil4.1).



Şekil 4.1. Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde uzunluğu üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

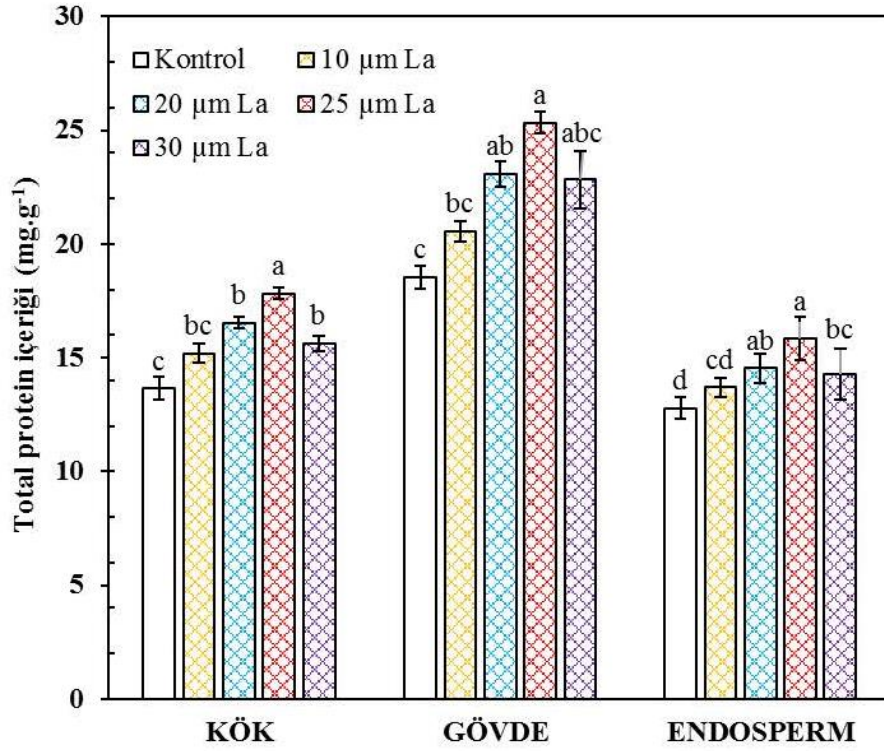
4.2. Lipoik Asidin Çimlenme Yüzdesi Üzerine Etkisi

Çimlenmeye bırakılan mısır tohumlarının çimlenme yüzdelerinin belirlenmesi için dört gün boyunca çimlenme sayıları kaydedilmiş ve kontrol ve LA grupları arasında çimlenme yüzdesi bakımından belirgin bir fark elde edilememiştir.

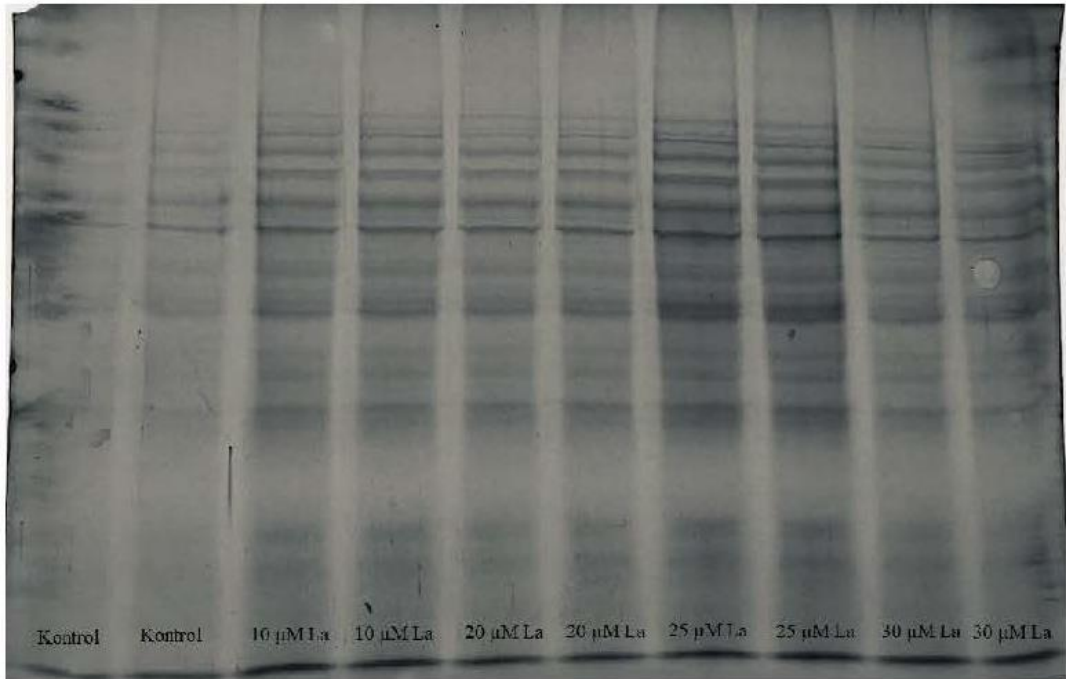
4.3. Lipoik Asidin Çözünebilir Protein Miktarı ve Protein Profili Üzerine Etkisi

Mısır bitkisinin kök, gövde ve endospermelerinde protein içeriğinin kontrole göre tüm uygulama gruplarında arttığı belirlendi. Kontrol grubuna kıyasla kök, gövde ve endospermelerde en iyi artış 25 µM LA uygulama grubunda kaydedildi.

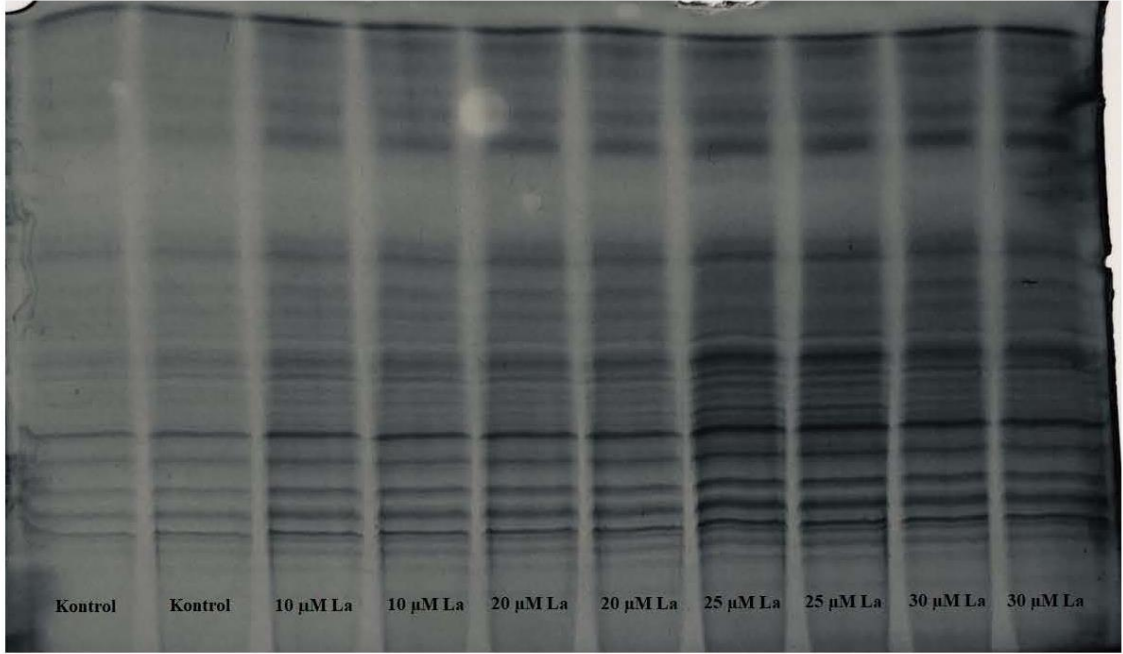
Köklerde kontrol grubunda protein içeriği 13,64 mg/g⁻¹ iken 10, 20, 25 ve 30 µM LA uygulamalarında %11,3, 21,1, 30,7 ve 14,5 oranında artış sağlayarak sırasıyla 15,19, 16,52, 17,83 ve 15,63 mg/g⁻¹ olarak ölçüldü. Gövdede kontrol grubunda 18,53 mg/g⁻¹ olarak ölçülen protein içeriği, 10, 20, 25 ve 30 µM LA uygulama gruplarında % 10,84, 24,5, 36,7 ve 23,15 oranında artış göstererek 20,54, 23,07, 25,33 ve 22,82 mg/g⁻¹ olarak kaydedildi. Endospermelerde ise kontrol grubunda 12,79 mg/g⁻¹ olarak ölçülen protein içeriği 10, 20, 25 ve 30 µM LA uygulamalarında 13,69, 14,53, 15,84 ve 14,26 mg/g⁻¹ değerleri ile sırası ile % 7, 13,6, 23,84 ve 11,5 oranında artış gösterdiği belirlendi. Lipoik asidin uygulanan tüm konsantrasyonlarında çimlenme aşamasında olan mısır bitkisinin kök, gövde ve endospermelerindeki protein içeriği üzerine uyarıcı etkiye sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının kök, gövde ve endosperm dokularının protein içeriği üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).



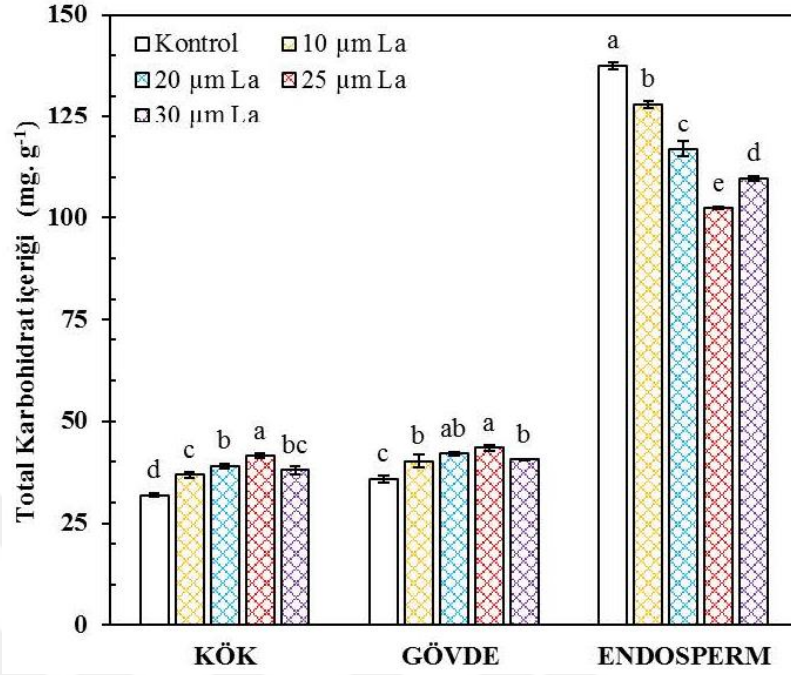
Şekil 4.3. Lipoik asitin kök dokusunda protein profili üzerine etkisi



Şekil 4.4. Lipoik asitin gövde dokusunda protein profili üzerine etkisi

4.4. Lipoik Asidin Total Karbohidrat İçeriğinin Belirlenmesi

Total karbohidrat içeriğinde kök ve gövdede kontrol grubuna göre tüm uygulama gruplarında artış kaydedilirken, endospermlerde kontrole kıyasla uygulama gruplarında azalış gösterdi. Köklerin kontrol grubunda karbohidrat içeriği $31,91 \text{ mg.g}^{-1}$ iken bu değer 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamaları sonucunda sırası ile % 15,43, 22,33 29,93 ve 19,07 oranında artışla 36,83, 39,04, 41,46 ve 37,99 mg.g^{-1} olarak kaydedildi. Gövdede kontrol grubunda $35,82 \text{ mg.g}^{-1}$ olarak ölçülen bu değer 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulama gruplarında sırası ile % 12,37, 17,31 21,44 ve 13,44 oranında artışla 40,25, 42,02, 43,50 ve 40,64 mg.g^{-1} olarak kaydedildi. Endospermlerde kontrol grubunda $137,62 \text{ mg.g}^{-1}$ olarak kaydedilen karbohidrat içeriği 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulama gruplarında sırası ile % 6,97, 15,09, 25,66 ve 20,29 oranında azalışla 128,02, 116,85, 102,30 ve 109,7 mg.g^{-1} olarak kaydedildi. Lipoik asidin uygulanan tüm konsantrasyonlarında çimlenme aşamasında olan mısır bitkisinin kök, gövde ve endospermlerindeki total karbohidrat içeriği üzerine uyarıcı etkiye sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.5).



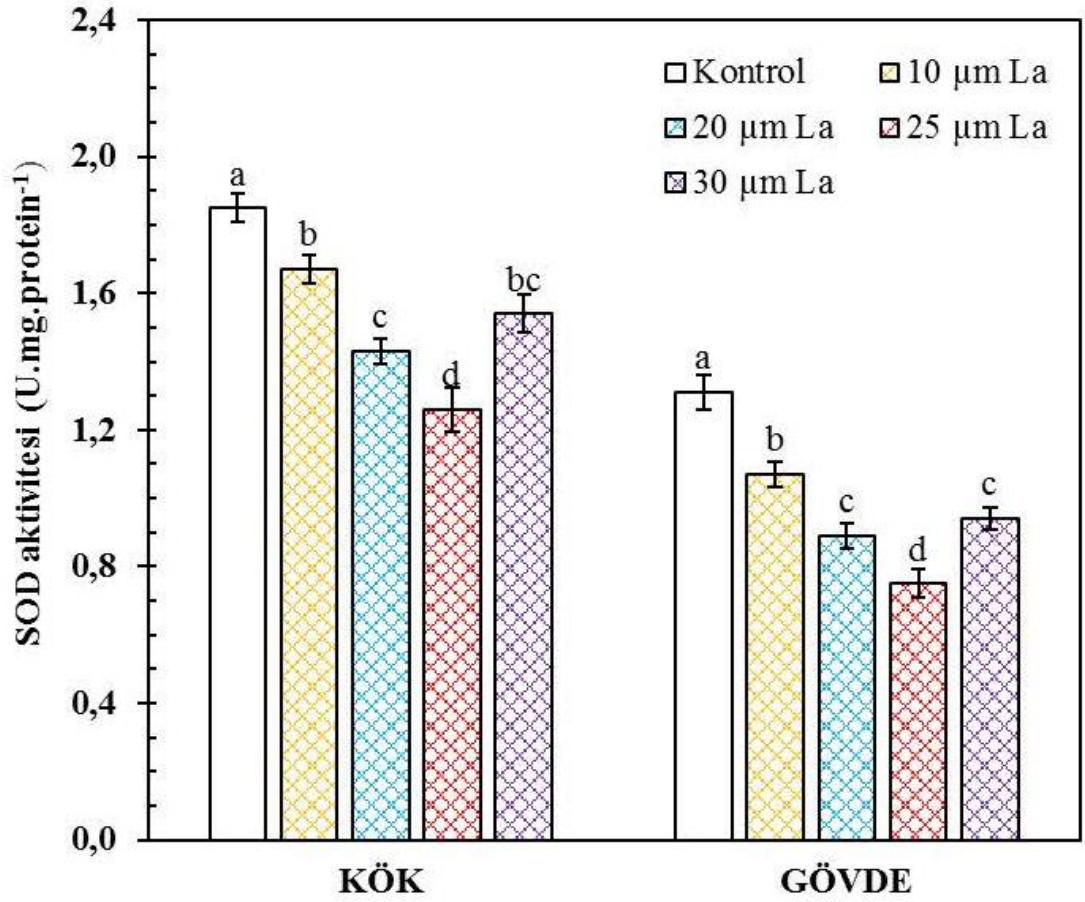
Şekil 4.5. Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının kök, gövde ve endosperm dokularının karbohidrat içeriği üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

4.5. Antioksidan Sistem Üzerine Etkileri

4.5.1. Lipoik asidin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi

4.5.1.a. SOD aktivitesi üzerine etkisi

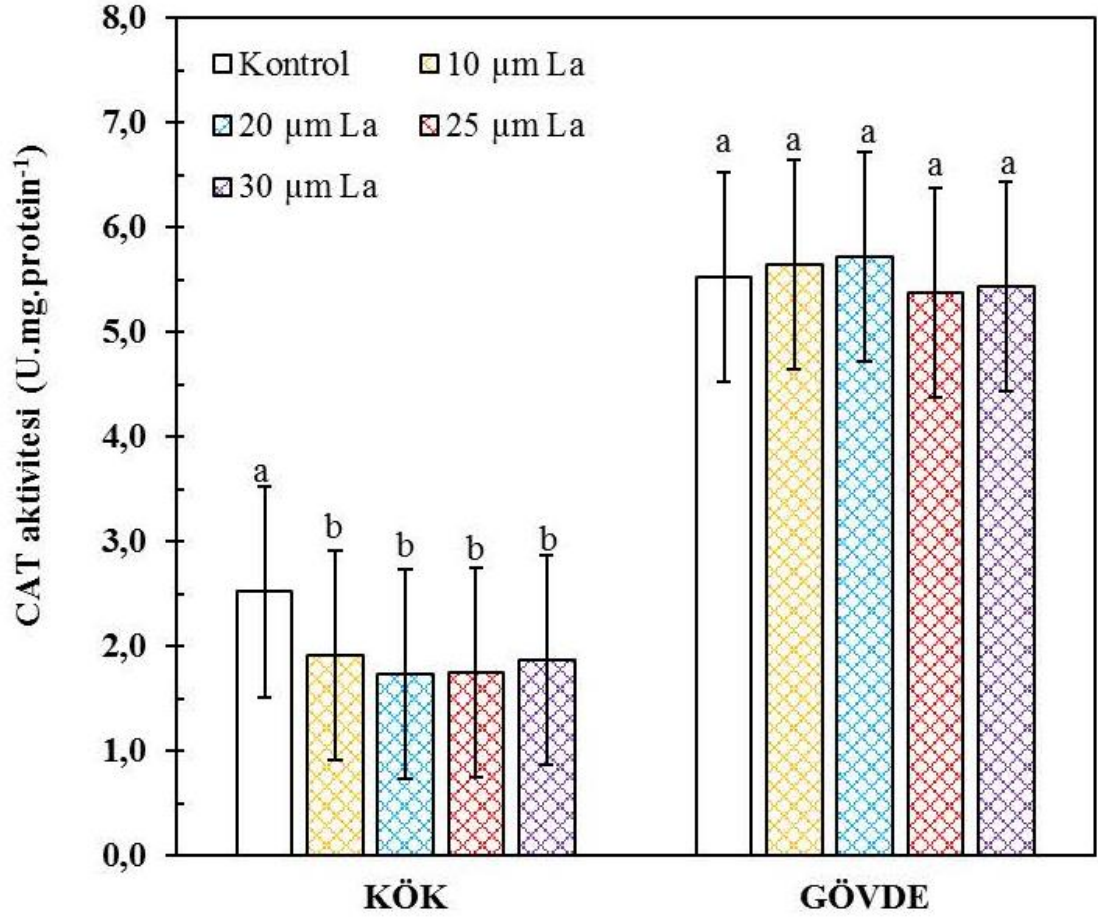
Mısır bitkisinin kontrol grubunun köklerinde SOD aktivitesi $1,85 \text{ U.mg.protein}^{-1}$ değerinde ölçülürken 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamaları, SOD aktivitesini sırası ile % 9,73, 22,7, 31,9 ve 16,76 oranında azaltarak 1,67, 1,43, 1,26 ve 1,54 U.mg.protein^{-1} değerine ulaşmasına neden oldu. Kontrol bitkilerinin gövdesinde SOD aktivitesi $1,31 \text{ U.mg.protein}^{-1}$ olarak ölçüldü. Kontrol bitkilerine kıyasla 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamalarının sırasıyla %18,32, 32,06, 42,75 ve 28,25 oranlarında SOD aktivitesini azalttığı tespit edildi ve sırasıyla bu uygulamalarda ki SOD aktivitesi 1,07, 0,89, 0,75 ve 0,94 U.mg.protein^{-1} olarak kaydedildi. SOD aktivitesindeki azalma lipoik asit uygulama gruplarının hepsinde gözlenirken en bariz azalma 25 μM LA uygulamasında kaydedildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P > 0,05$).

4.5.1.b. CAT aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

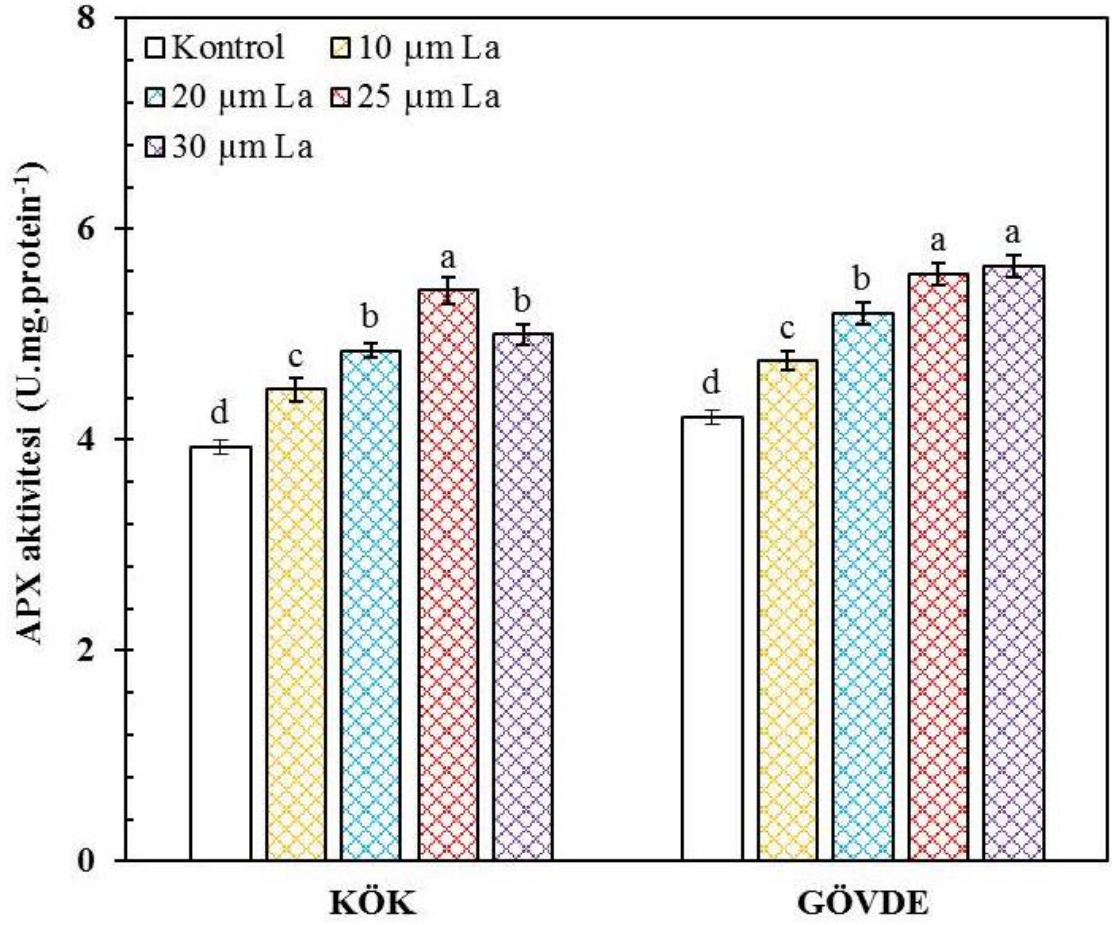
Mısır bitkisinin köklerinde CAT aktivitesi kontrol grubunda $2,52 \text{ U.mg.protein}^{-1}$ değerinde ölçülürken 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamaları CAT aktivitesini sırası ile %23,8, 31, 30,6 ve 25,8 oranında azaltarak 1,92, 1,74, 1,75 ve 1,87 U.mg.protein^{-1} değerine düşmesine neden oldu. 10, 20, 25 ve 30 μM La uygulamaları gövdenin kontrol bitkilerine ($5,53 \text{ U.mg.protein}^{-1}$) kıyasla sırasıyla % 2,17, 3,44, 2,89 ve 1,8 oranlarında CAT aktivitesini azalttığı tespit edildi ve sırasıyla bu uygulamalarda ki CAT aktivitesi değeri 5,65, 5,72, 5,37 ve 5,43 U.mg.protein^{-1} olarak kaydedildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında CAT aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

4.5.1.c. APX aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

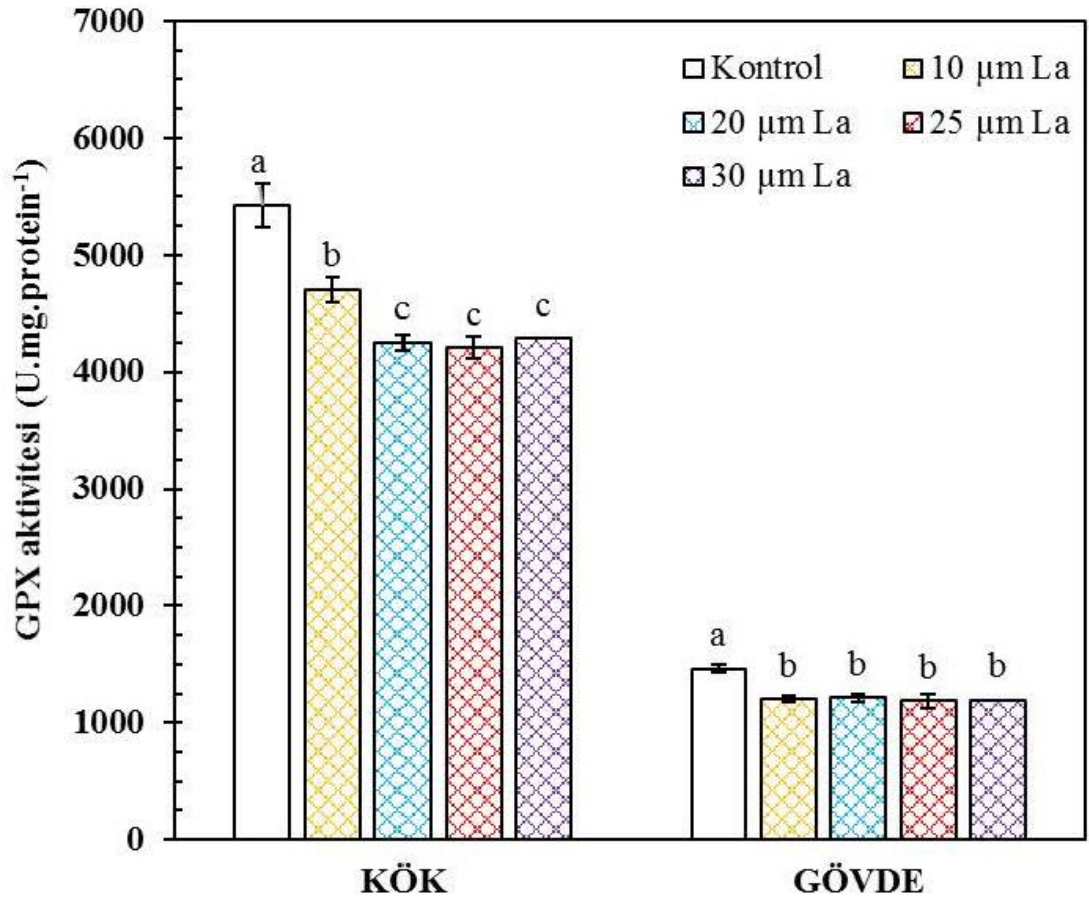
Mısır bitkisinin köklerinde APX aktivitesi köklerde $3,93 \text{ U.mg.protein}^{-1}$ değerinde ölçüldü. 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamaları APX aktivitesini sırası ile % 14, 23,4, 37,9 ve 27,2 oranında artırarak $4,48, 4,85, 5,42$ ve $5 \text{ U.mg.protein}^{-1}$ değerine ulaşmasına neden oldu. Kontrol bitkilerinde APX aktivitesi gövdede $4,22 \text{ U.mg.protein}^{-1}$ olarak ölçüldü. Kotrole kıyasla 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamaları %12,6, 23,2, 32,2 ve 33,9 oranlarında APX aktivitesini artırarak $4,75, 5,2, 5,58$ ve $5,65 \text{ U.mg.protein}^{-1}$ değerine ulaşmasına neden oldu. APX aktivitesindeki artış lipoik asit uygulama gruplarının hepsinde gözlenirken en bariz artış 25 μM LA uygulamasında kaydedildi (Şekil4.8).



Şekil 4.8. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında APX aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

4.5.1.d. GPX aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Mısır bitkisinin kontrol grubunda GPX aktivitesi köklerde $5420 \text{ U.mg.protein}^{-1}$ değerinde ölçülürken 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamaları GPX aktivitesini sırası ile % 13,23, 21,53, 22,43 ve 20,94 oranlarında azalışla 4703, 4253, 4204 ve 4285 U.mg.protein^{-1} değerleri kaydedildi. Kontrol bitkilerinde GPX aktivitesi gövdede $1464 \text{ U.mg.protein}^{-1}$ değerinde belirlenirken 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamalarında kontrole kıyasla sırasıyla % 17,96, 17,28, 19,12 ve 18,37 oranlarında GPX aktivitesini azalttığı tespit edildi. Uygulama gruplarında sırasıyla GPX aktivitesi 1201, 1211, 1184 ve 1195 U.mg.protein^{-1} olarak kaydedildi.



Şekil 4.9. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında GPX aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

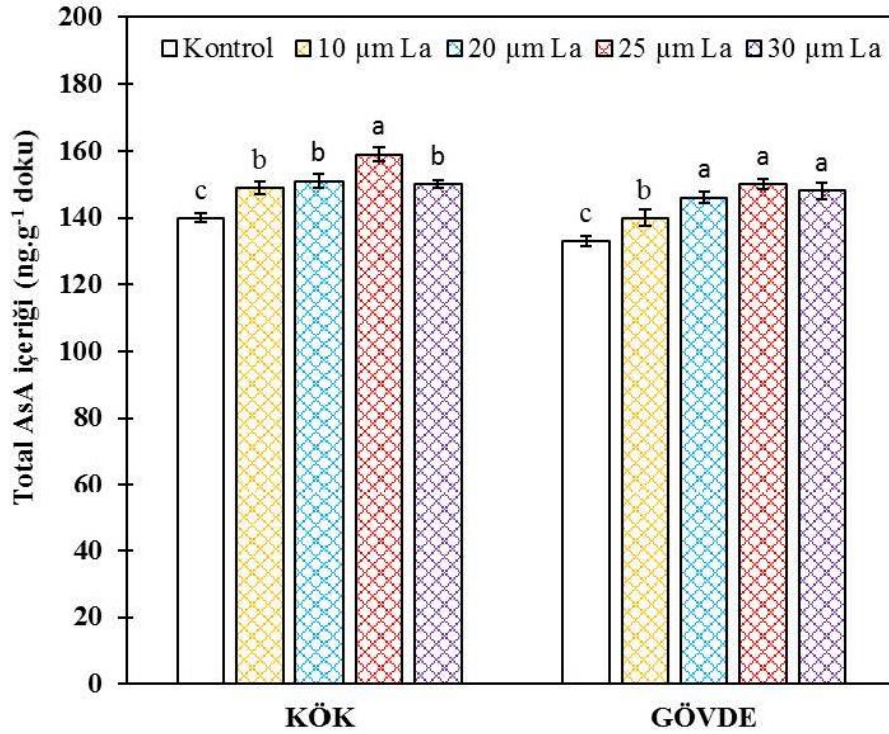
4.5.1.e. GR aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Mısır bitkisinin köklerinin kontrol grubunda GR aktivitesi 1154 U.mg-1 protein değerinde ölçülürken 10, 20, 25 ve 30 µM LA uygulamaları GR aktivitesini artmasına neden oldu. 10, 20, 25 ve 30 µM LA uygulamaları gövdenin kontrol bitkilerine kıyasla GR aktivitesini artırdıkları tespit edildi ve sırasıyla bu uygulamalarda ki GR aktivitesi değeri 1546 U.mg-1 protein olarak kaydedildi.

4.5.2. Antioksidan maddeler üzerine etkisi

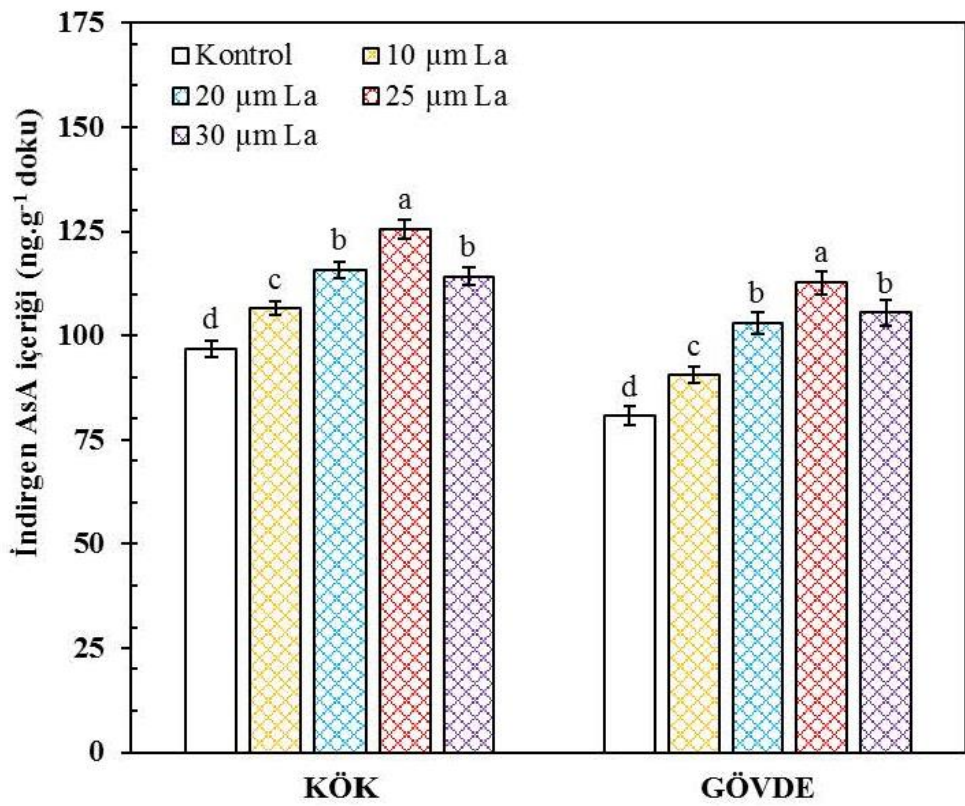
4.5.2.a. Total AsA, AsA ve DHA içerikleri ve DHA/AsA oranı üzerine etkisi

Mısır bitkisinin köklerinde total AsA, AsA, DHA ve DHA/AsA içeriklerine bakılmış ve total AsA ve indirgen AsA içeriğinin kontrol grubu bitkilerine göre bütün uygulama gruplarında artmış olduğu, DHA içeriğininde kontrol grubu bitkilerine göre 20 μM LA uygulaması hariç (istatistiki olarak kontrol ile aynı) diğer bütün uygulama gruplarında ise arttığı kaydedildi. Köklerde total AsA içeriğine bakıldığında, kontrol bitkisinde 140 ng.g^{-1} olarak bulunurken, 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamaları % 6,42, 7,85, 13,57 ve 7,14 oranında artış sağlayarak bu değeri 149, 151, 159 ve 150 ng.g^{-1} değerine yükselttiği kaydedildi. Gövdedeki total AsA içeriğine bakıldığında ise, kontrol bitkisinde 133 ng.g^{-1} değeri bulunurken, 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamaları % 5,26, 9,77, 12,78 ve 11,27 oranında artışla 140, 146, 150 ve 148 ng.g^{-1} değerleri kaydedildi.



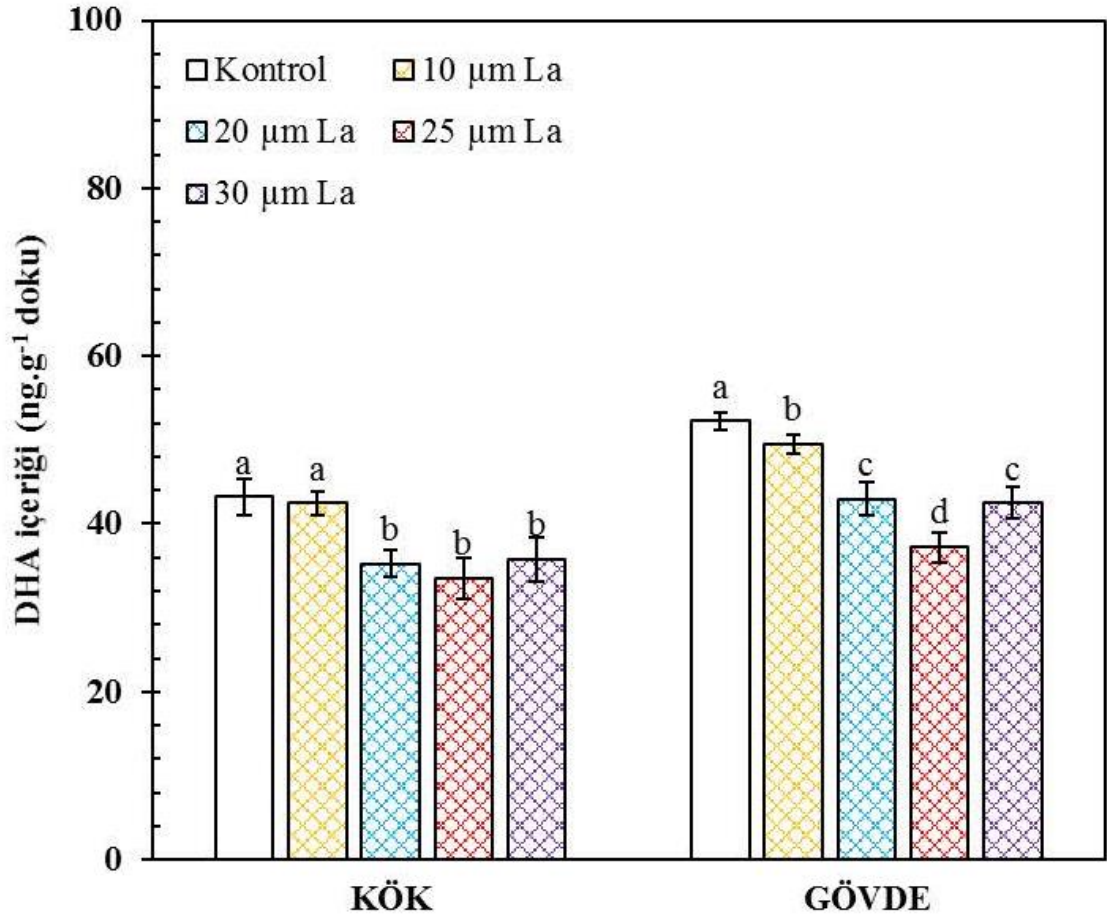
Şekil 4.10. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında total AsA içeriği üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

Köklerde indirgen AsA içeriği kontrol bitkilerinde $96,75 \text{ ng.g}^{-1}$ değerinde ölçülürken 10, 20, 25 ve $30 \mu\text{M}$ LA uygulamalarında bu içerik % 10, 19,7, 30 ve 18,08 oranında artışla 106,5, 115,75, 125,5 ve $114,25 \text{ ng.g}^{-1}$ değerinde olduğu belirlendi. Gövdelerde indirgen AsA içeriği kontrol bitkilerinde $80,75 \text{ ng.g}^{-1}$ değerinde ölçülürken 10, 20, 25 ve $30 \mu\text{M}$ LA uygulamalarında bu içerik %12,07, 27,55, 39,62 ve 32,65 oranında artışla 90,5, 103, 112,75 ve $105,5 \text{ ng.g}^{-1}$ değerinde olduğu kaydedildi.



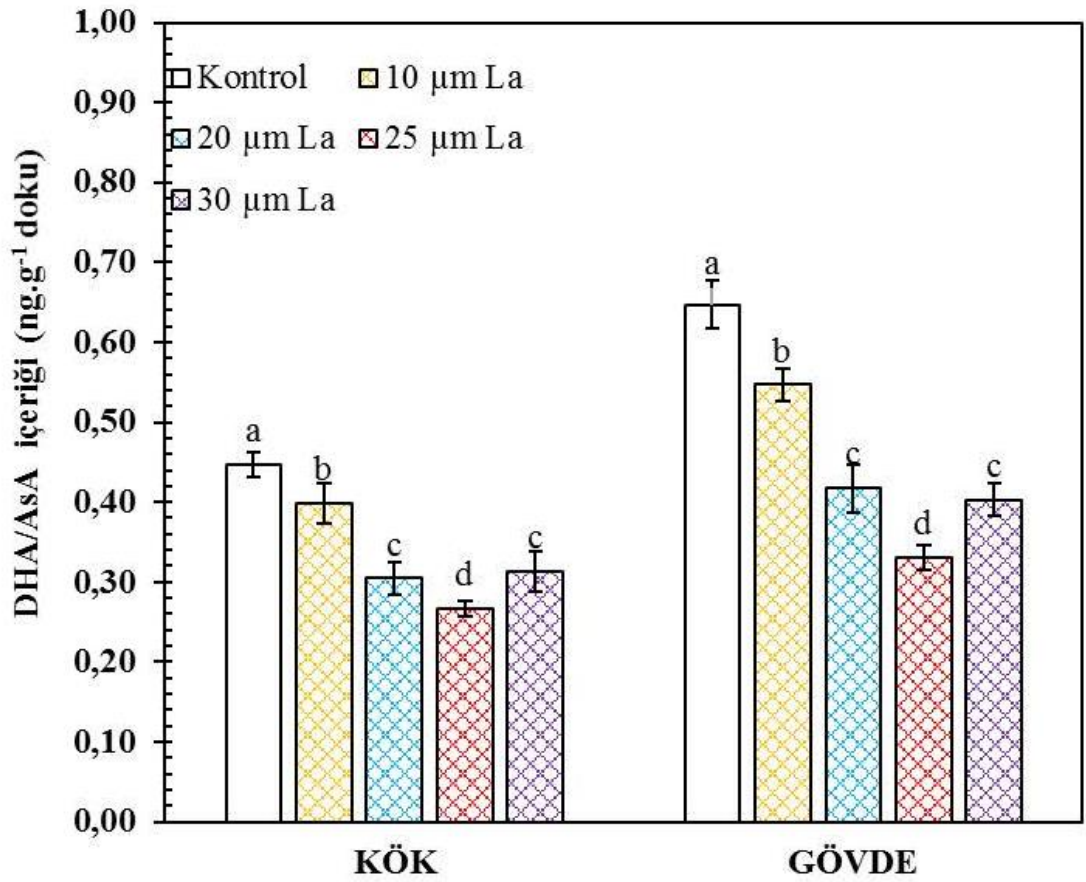
Şekil 4.11. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında indirgen AsA içeriği üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

Köklerde DHA içeriği kontrol bitkilerinde $43,25 \text{ ng.g}^{-1}$ değerinde ölçülürken 10, 20, 25 ve $30 \mu\text{M}$ LA uygulamalarında bu içerik % 1,7, 18,5, 22,54 ve 17,34 oranında azalışla 42,5, 35,25, 33,5 ve $35,75 \text{ ng.g}^{-1}$ değerinde olduğu belirlendi. Gövdelerde DHA içeriği kontrol bitkilerinde $52,25 \text{ ng.g}^{-1}$ değerinde ölçülürken 10, 20, 25 ve $30 \mu\text{M}$ LA uygulamalarında bu içerik % 5,26, 17,7, 28,7 ve 18,66 oranında azalışla 49,5, 43, 37,25 ve $42,5 \text{ ng.g}^{-1}$ değerinde olduğu kaydedildi.



Şekil 4.12. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde DHA içeriği üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

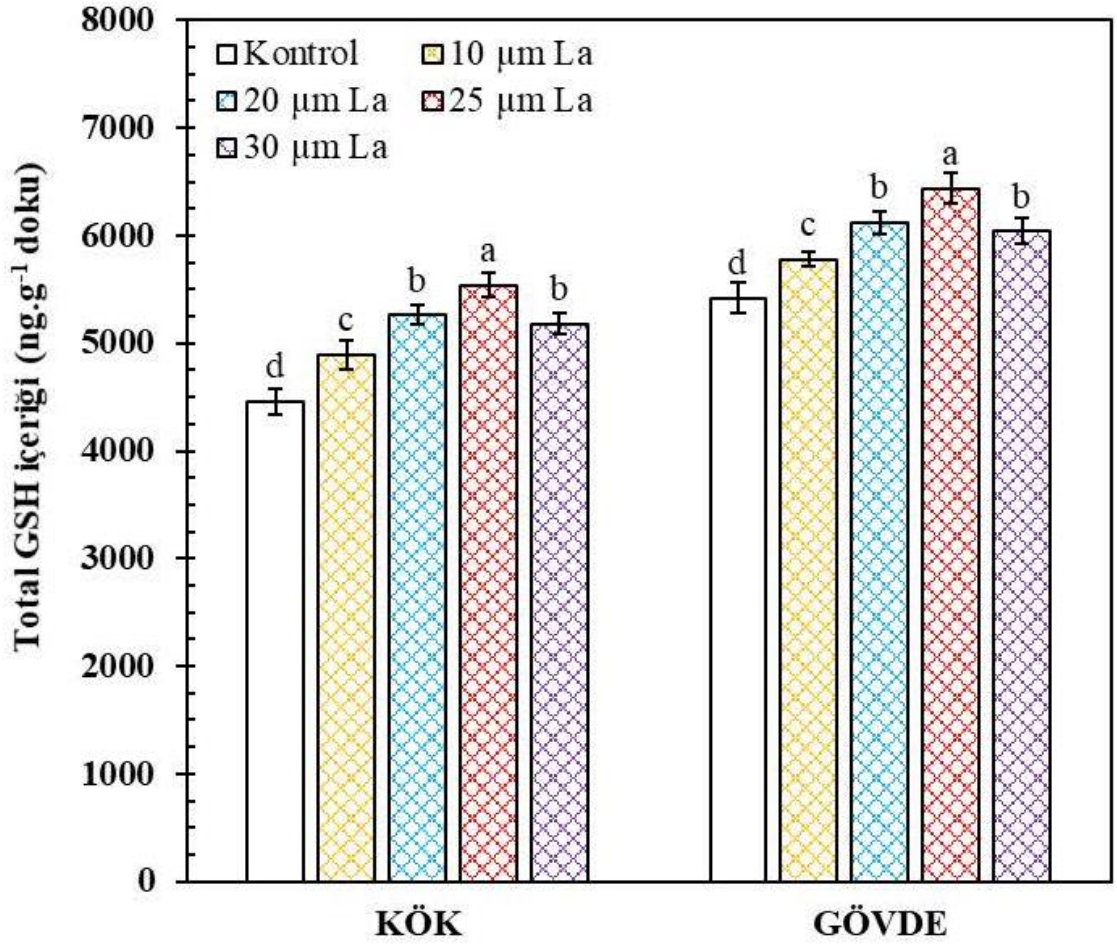
DHA/AsA içeriğine bakıldığında ise, kontrol bitkilerinde $0,45 \text{ ng.g}^{-1}$ olan bu içerik, 10, 20, 25 ve 30 µM LA uygulanan bitki köklerinde % 11,31, 32,32, 40,68 ve 30,46 gibi bir azalış göstererek $0,40$, $0,30$, $0,27$ ve $0,31 \text{ ng.g}^{-1}$ değerinde olduğu saptandı. Gövdede DHA/AsA içeriğine bakıldığında ise, kontrol bitkilerinde $0,65 \text{ ng.g}^{-1}$ olan bu içerik, 10, 20, 25 ve 30 µM LA uygulanan bitki gövdelerinde % 0,55, 24,09, 39,93 ve 26,75 gibi bir azalış göstererek $0,55$, $0,42$, $0,33$ ve $0,40 \text{ ng.g}^{-1}$ değerinde olduğu saptandı.



Şekil 4.13. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde DHA/AsA içeriği üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

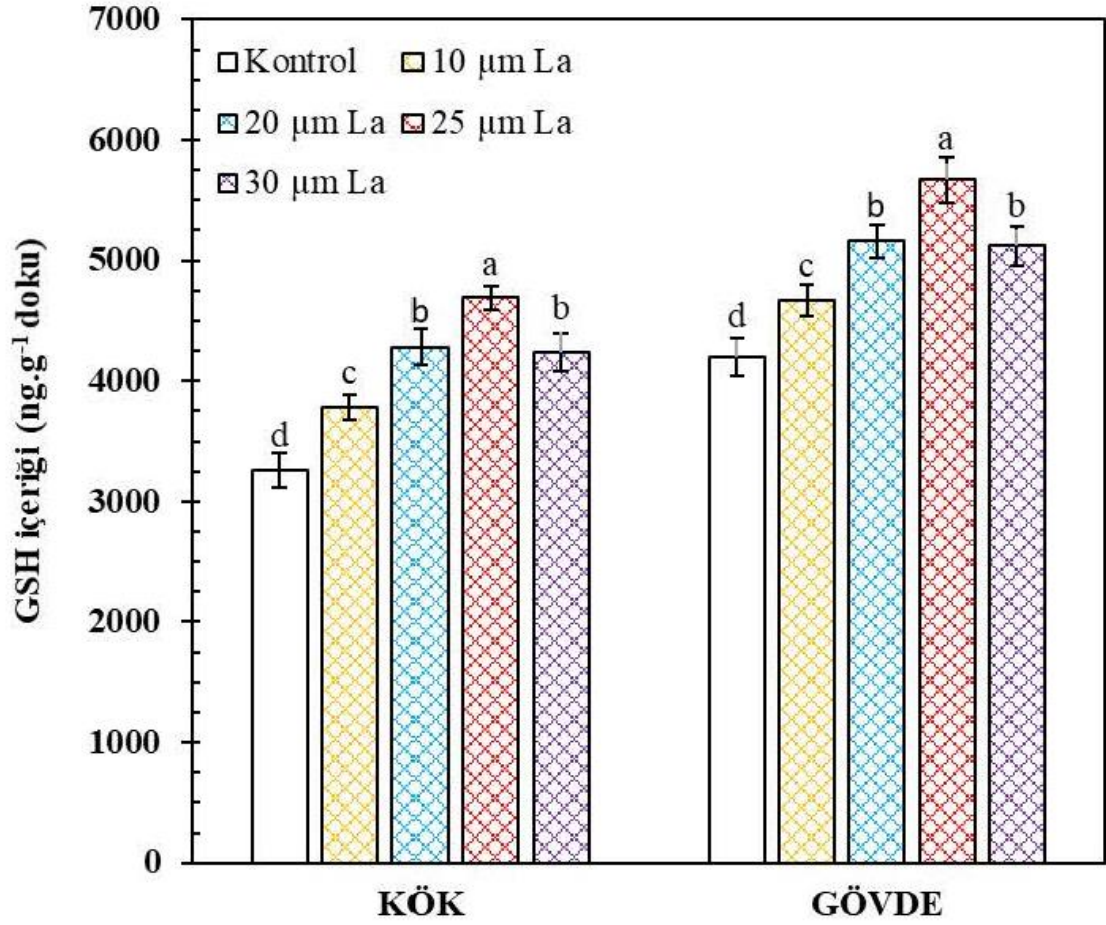
4.5.2.b. Total GSH, GSH ve GSSG içerikleri ve GSSG/GSH oranı üzerine etkisi

Mısır bitkisinin köklerinde total GSH, indirgen glutatyon (GSH), yükseltgen glutatyon (GSSG) ve GSSG/GSH içerikleri ölçüldü ve önemli değişiklikler kaydedildi. Köklerde, kontrol grubunda total GSH içeriği 4456 ng.g^{-1} olarak bulunmuşken 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamasında bu değer, %9,82, 18,04, 23,32 ve 16,24 oranında artış göstererek sırası ile 4894, 5260, 5540 ve 5180 ng.g^{-1} olarak kaydedildi. Gövdede ise, kontrol grubunda GSH içeriği 5420 ng.g^{-1} olarak bulunmuşken 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamasında bu değer, % 6,64, 12,91, 18,81 ve 11,44 oranında artış gösterdi ve sırası ile 5780, 6120, 6440 ve 6040 ng.g^{-1} olarak kaydedildi.



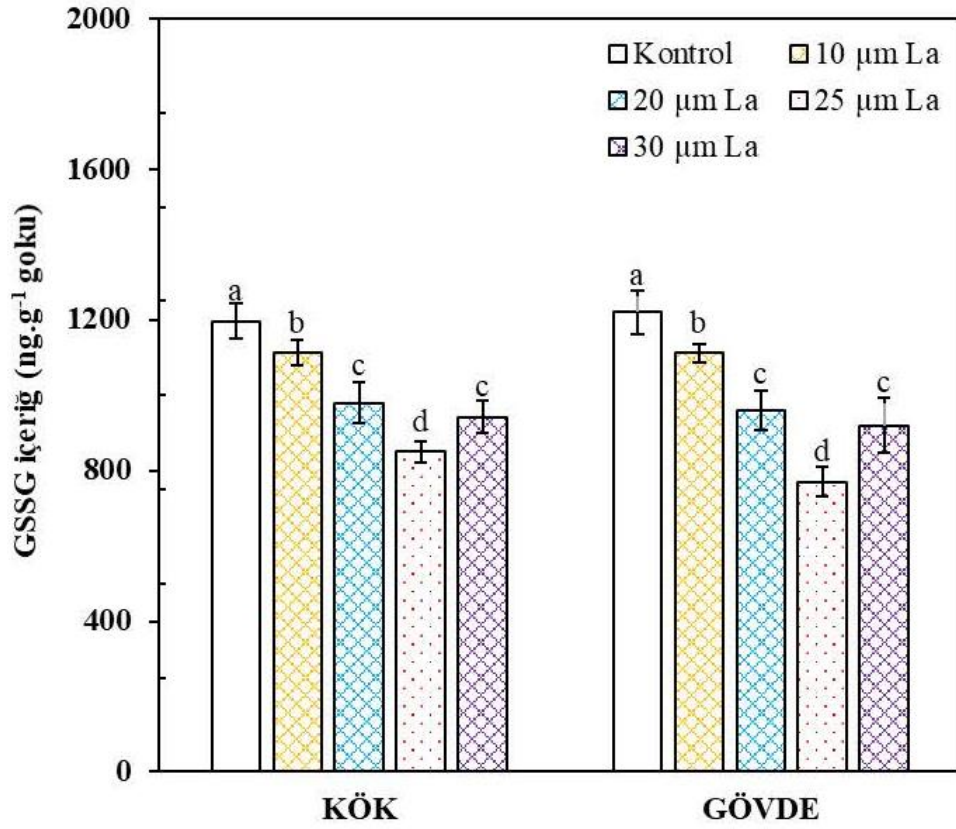
Şekil 4.14. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında total GSH içeriği üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

Kontrol bitkisinin köklerinde GSH içeriği 3259 ng.g^{-1} iken bu içerik 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamasında % 16,04, 31,32, 43,9 ve 30,1 oranında bir artışla 3782, 4280, 4690 ve 4239 ng.g^{-1} değerinde ölçüldü. Kontrol bitkisinin gövdelerinde GSH içeriği 4200 ng.g^{-1} iken bu içerik 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamasında % 11,16, 22,85, 35 ve 21,9 oranında bir artışla 4669, 5160, 5670 ve 5120 ng.g^{-1} değerinde ölçüldü.



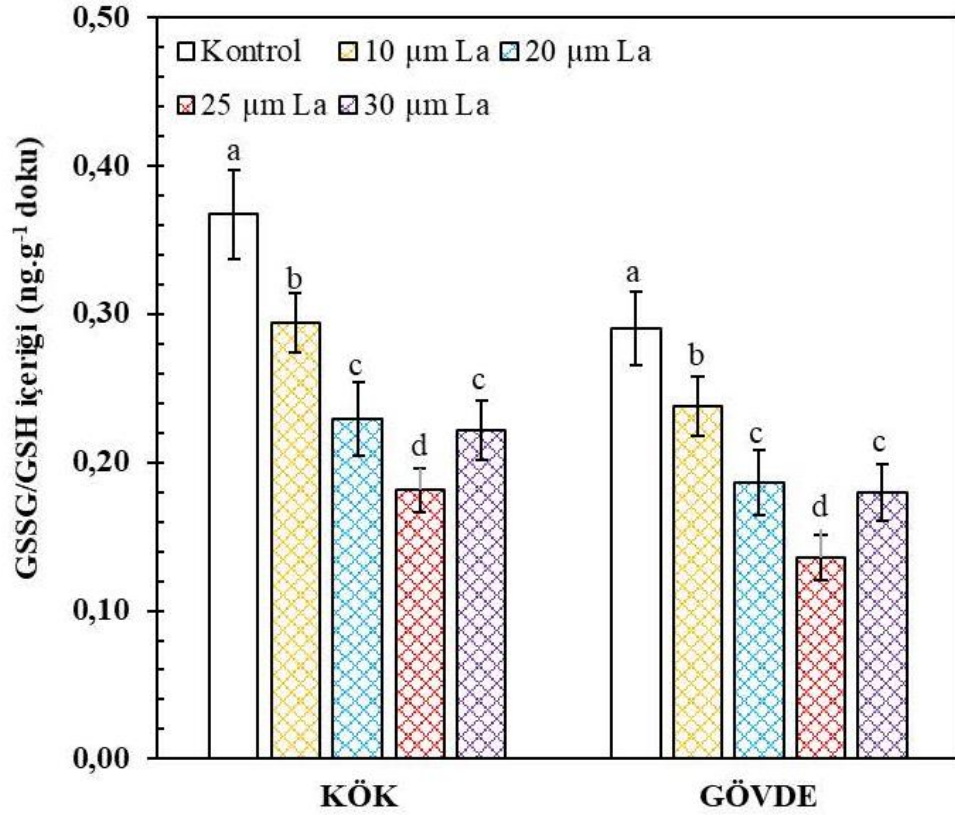
Şekil 4.15.Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında GSH içeriği üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

Kontrol bitkisinin köklerinde GSSG içeriği 1197 ng.g^{-1} olarak ölçülürken 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulanan bitki köklerinde bu içerikte % 7,1, 18,12, 28,98 ve 21,38 oranında bir azalışla 1112, 980, 850 ve 941 ng.g^{-1} değerinde bulundu. Kontrol bitkisinin gövdelerinde ise, GSSG içeriği 1220 ng.g^{-1} olarak ölçülürken 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulanan bitki gövdelerinde bu içerikte % asdf oranında bir artışla 111, 960, 770 ve 920 ng.g^{-1} değerinde bulundu.



Şekil 4.16. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında GSSG içeriği üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

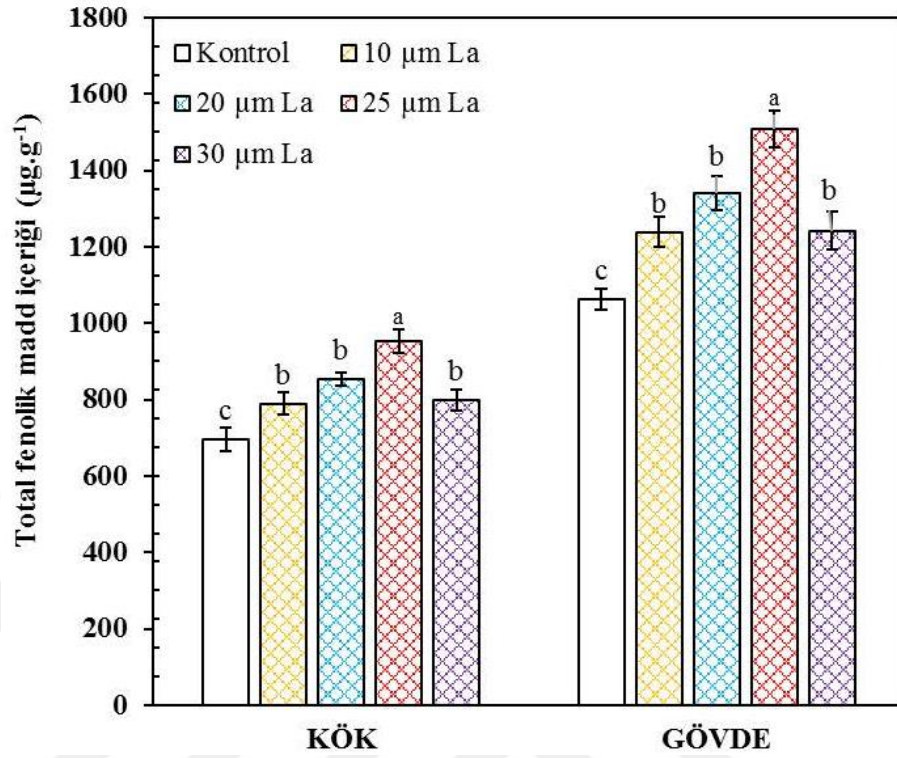
GSSG/GSH içeriğine bakıldığında ise, kontrol bitkisinin köklerinde bu içerik $0,37 \text{ ng.g}^{-1}$ olarak bulunmuşken 10, 20, 25 ve 30 µM LA uygulanan bitki köklerinde % 20, 38,11, 51 ve 40 oranında azalış göstererek $0,29, 0,23, 0,18$ ve $0,22 \text{ ng.g}^{-1}$ değerinde kaydedildi. GSSG/GSH içeriğine bakıldığında ise, kontrol bitkisinin gövdelerinde bu içerik $0,29 \text{ ng.g}^{-1}$ olarak bulunmuşken 10, 20, 25 ve 30 µM LA uygulanan bitki gövdelerinde % 17,95, 35,85, 53,17 ve 38,04 oranında azalışla $0,24, 0,19, 0,14$ ve $0,18 \text{ ng.g}^{-1}$ değerinde ölçülerek kaydedildi.



Şekil 4.17. Mısır bitkisinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövdede GSSG/GSH içeriği üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

4.5.2.c. Fenolik madde içeriği üzerine etkisi

Kontrol bitkisinin köklerinde fenolik madde içeriği $695 \mu\text{g.g}^{-1}$ olarak ölçülürken, 10, 20, 25 ve $30 \mu\text{M}$ LA uygulamasında ise bu içerik sırası ile 789, 854, 954 ve $798 \mu\text{g.g}^{-1}$ olarak ölçüldü ve kontrole kıyasla sırası ile % 13,5, 22,87, 37,26 ve 14,82 oranında artış olduğu belirlendi. Gövdede kontrol bitkilerinde fenolik madde içeriği $1062 \mu\text{g.g}^{-1}$ olarak bulundu. 10, 20, 25 ve $30 \mu\text{M}$ LA uygulamalarında kontrole kıyasla sırası ile % 16,57, 26,08, 42,09 ve 16,95 oranında artışla fenolik madde içeriği 1238, 1339, 1509 ve $1242 \mu\text{g.g}^{-1}$ olarak kaydedildi. En iyi artış oranı hem kök hem de gövde için $25 \mu\text{M}$ LA uygulama grubunda belirlendi. Fenolik madde içeriğinde ki artış lipoik asit uygulama gruplarının hepsinde gözlenirken en bariz artış $25 \mu\text{M}$ LA uygulamasında kaydedildi (Şekil 4.18).

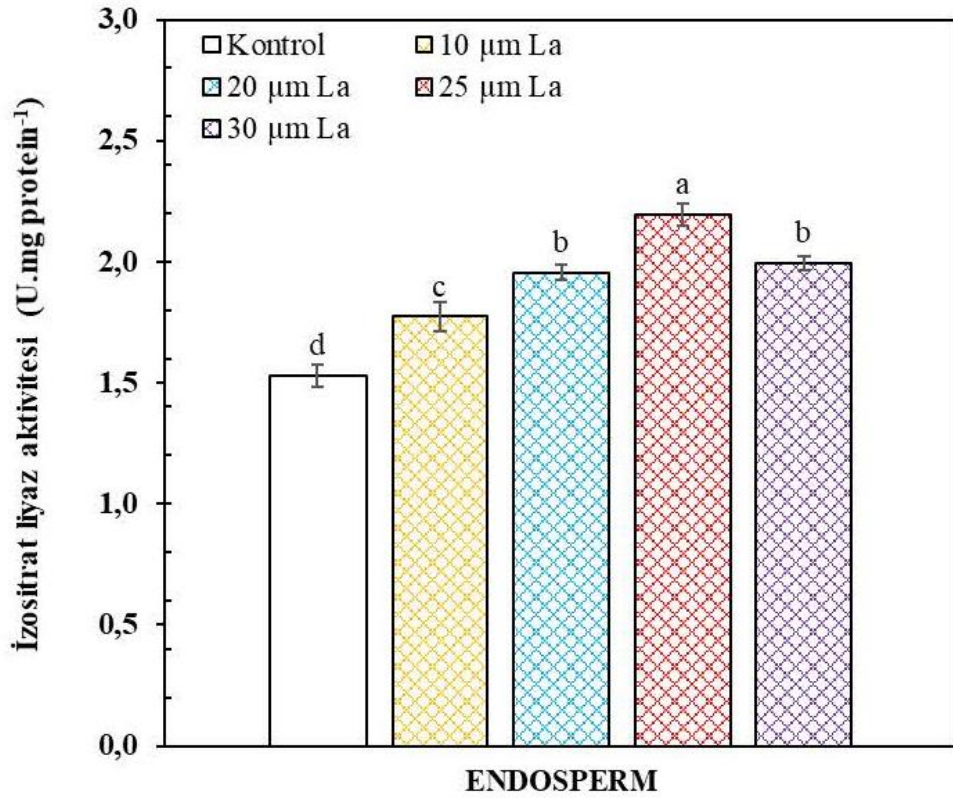


Şekil 4.18. Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında fenolik madde içeriği üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

4.6. Lipoik asidin çimlenme enzimleri üzerine etkisi

4.6.1. İzositrat liyaz aktivitesi üzerine etkisi

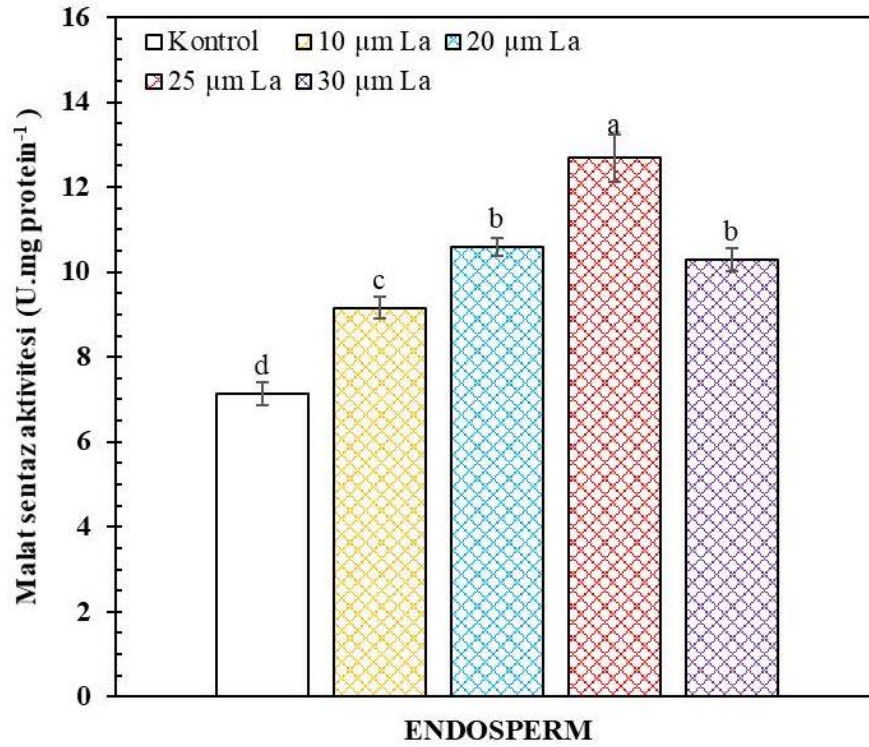
Mısır bitkisinin kontrol grubunun endospermlerinde ICL aktivitesi $1,529 \text{ U.mg.protein}^{-1}$ değerinde ölçülürken 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamaları ICL aktivitesini sırası ile % 15,95, 27,86, 43, 56 ve 30,35 oranında artırarak 1,773, 1,955, 2,195 ve 1,993 U.mg.protein^{-1} değerine ulaşmasına neden oldu. Çimlenme için önem arz eden bu enzimin aktivitesinde lipoik asit indüklü bir artış olduğu ve en iyi artış ise 25 μM LA uygulamasında olduğu belirlendi. Bu enzimin gen ifadesine de bakılmış olup bulunan aktivite sonuçları ile de paralellik göstermektedir. İzositrat liyaz enzim aktivitesindeki artış lipoik asit uygulama gruplarının hepsinde gözlenirken en bariz artış 25 μM La uygulamasında kaydedildi (Şekil 4.19)



Şekil 4.19 Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının endosperm dokularında izositrat liyaz enzim aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

4.6.2. Malat sentaz aktivitesi üzerine etkisi

Mısır bitkisinin kontrol grubununun köklerinde MS aktivitesi $7,14 \text{ U.mg.protein}^{-1}$ değerinde ölçülürken 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamaları MS aktivitesini sırası ile % 28,29, 48,46, 77,59 ve 44,12 oranında artış göstererek 9,16, 10,6, 12,68 ve 10,29 U.mg.protein^{-1} değerine ulaşmasına neden oldu. Çimlenme için önem arz eden bu enzimin aktivitesinde lipoik asit indüklü bir artışın olduğu ve en iyi artışın ise 25 μM LA uygulamasında olduğu belirlendi. Bu enzimin gen ifadesine de bakılmış olup bulunan aktivite sonuçları ile de paralellik göstermektedir. Malat sentaz aktivitesindeki artış lipoik asit uygulama gruplarının hepsinde gözlenirken en bariz artış 25 μM LA uygulamasında kaydedildi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının endosperm dokularında malat sentaz enzim aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

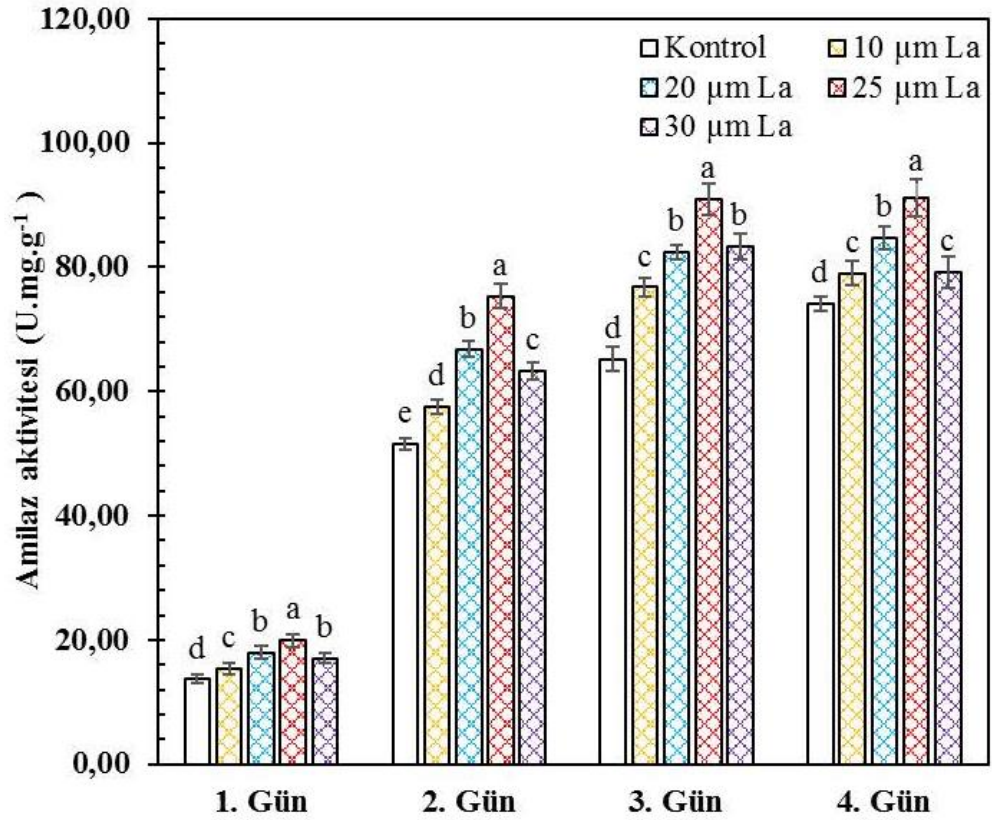
4.6.3. Amilaz aktivitesi ve izoenzimi üzerine etkisi

Mısır bitkisinin çimlenme aşamasının birinci gününde kontrol grubunun endospermelerinde amilaz aktivitesi $13,64 \text{ U.mg}^{-1}$ değerinde ölçülürken 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamaları amilaz aktivitesini sırası ile % 12,33, 31,91, 46,11 ve 24,67 oranında artırarak 15,32, 17,99, 19,93 ve 17 U.mg^{-1} değerine ulaşmasını sağladı. Çimlenme aşamasının ikinci gününde amilaz aktivitesi kontrol bitkisinin endospermelerinde $51,52 \text{ U.mg}^{-1}$ olarak bulunmuşken 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulanan endospermelerde % 11,66, 29,74, 46,18 ve 22,84 oranında artış sağlayarak 57,52, 66,84, 75,31 ve 63,29 U.mg^{-1} değerinde ölçülerek kaydedildi. Çimlenme aşamasının üçüncü gününde kontrol grubunun endospermelerinde amilaz aktivitesi $65,21 \text{ U.mg}^{-1}$ olarak belirlendi. Kontrol grubuna kıyasla 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulanan endospermelerde amilaz aktivitesi % 17,78, 26,4, 39,48 ve 27,84 oranında önemli bir artış sağladı ve sırasıyla aktivite değerleri 76,81, 82,43, 90,95 ve 83,37 U.mg^{-1} olarak

kaydedildi. Çimlenme dördüncü günü kontrol grubunun endospermelerinde amilaz aktivitesi $74,17 \text{ U.mg}^{-1}$ değerinde saptandı. 10, 20, 25 ve 30 μM LA uygulamasında kontrole kıyasla sırasıyla % 6,56, 14,19, 22,77 ve 6,75 oranında artışla aktivitenin 79,03, 84,69, 91,06 ve 79,18 U.mg^{-1} değerlerine ulaşmasını sağladı. Yapılan ölçümler sonucunda kontrole kıyasla amilaz aktivitesinin lipoik asit uygulaması ile dört gün boyunca önemli bir artış sağlayarak çimlenme üzerine önemli bir etki sergilediği ve en iyi artışın ise 25 μM LA grubunda gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.21).



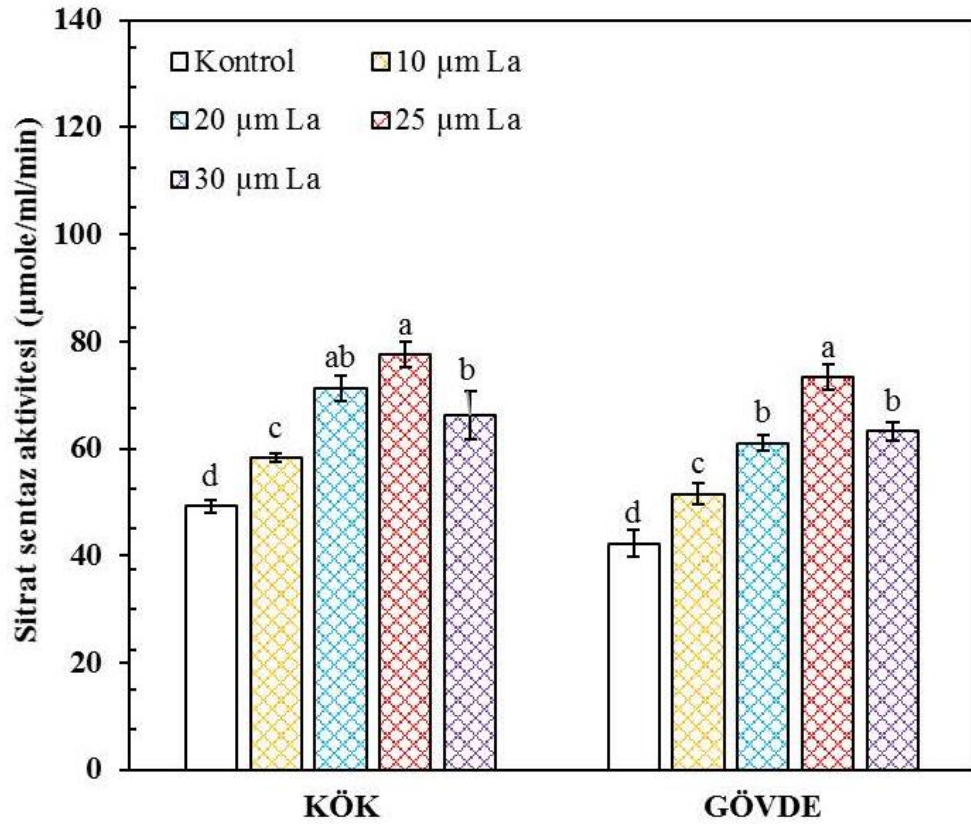
Şekil 4.21. Lipoik asitin amilaz izoenzimi üzerine etkisi



Şekil 4.22. Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının endosperm dokularında amilaz aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

4.7. Sitrat sentaz aktivitesi üzerine etkisi

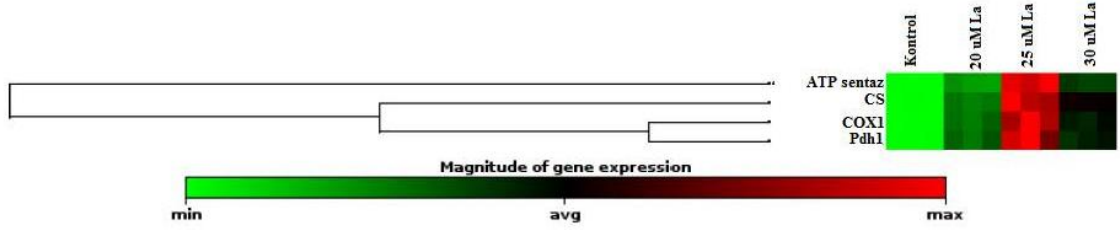
Mısır bitkisinin kontrol grubunun köklerinde CS aktivitesi $49,25 \mu\text{mole/ml/min}$ olarak ölçülürken $10, 20, 25$ ve $30 \mu\text{M}$ LA uygulamaları CS aktivitesini sırası ile % $18,27, 44,67, 57,36$ ve $34,52$ oranında artırarak $58,25, 71,25, 77,5$ ve $66,25 \mu\text{mole/ml/min}$ değerine ulaşmasını sağladı. Kontrol bitkisinin gövdelerinde CS aktivitesi $42,25 \mu\text{mole/ml/min}$ olarak kaydedilirken $10, 20, 25$ ve $30 \mu\text{M}$ LA uygulanan bitki gövdelerinde % $21,89, 44,38, 73,37$ ve $49,7$ oranında artışla $51,5, 61, 73,25$ ve $63,25 \mu\text{mole/ml/min}$ değerinde ölçülerek kaydedildi. Sitrat sentaz aktivitesinde ki artış tüm lipoik asit uygulamalarında gözlenirken en iyi artış hem kök hem gövdede $25 \mu\text{M}$ LA uygulama grubunda kaydedildi (Şekil4.23).



Şekil 4.23. Mısır bitkilerinde lipoik asit uygulamalarının kök ve gövde dokularında Sitrat sentaz enzim aktivitesi üzerine etkisi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

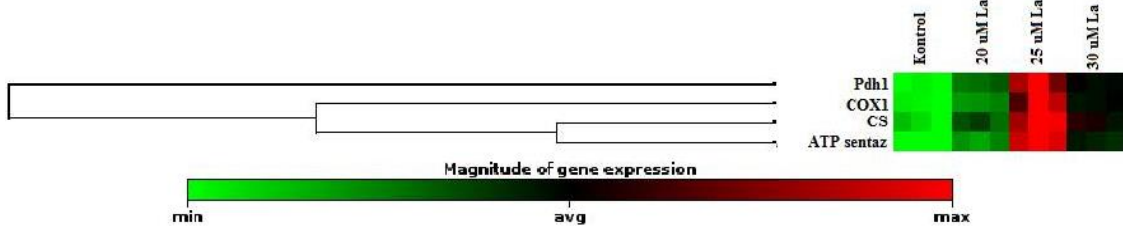
4.8. Lipoik asit uygulamalarının Gen İfadeleri Üzerine Etkileri

Kökler ve gövdede sitrat sentaz, sitokrom oksidaz, ATP sentaz, pirüvat dehidrogenaz enzimleri ile endospermelerde isositrat liyaz ve malat sentaz enzimlerini kodlayan genlerin ifade düzeyleri Real-Time PCR ile belirlendi. Tüm primerler için referans gen olarak β -actin çalışıldı. Aşağıda yer alan clustergramda görüldüğü üzere (Şekil 4.24), köklerde CS, COX, Pdh1 ve ATP sentaz gen ifadelerinde kontrol bitkilerine göre 20, 25 ve 30 μ M La uygulamalarında önemli bir artış belirlenirken, en iyi artış 25 μ M LA uygulamasında bulundu. Kontrole kıyasla CS gen ifadesinde ki artış kaydedilen enzim aktivitesi ile de benzerlik göstermektedir.



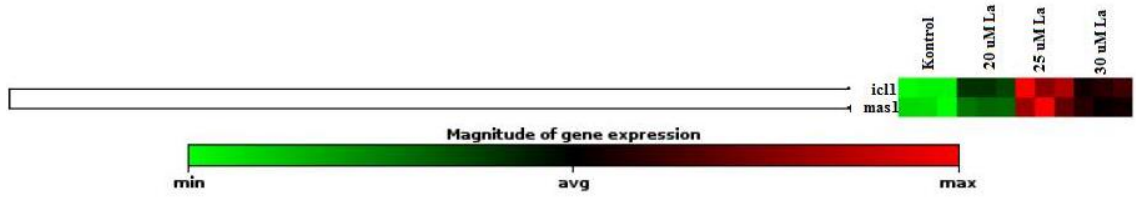
Şekil 4.24. Mısır bitkilerinde köklerde sitrat sentaz, sitokrom oksidaz, ATP sentaz ve prüvat dehidrogenaz proteinlerinin gen ekspresyonları üzerine Lipoik asit uygulamalarının etkisinin clustergram ile ifadesi

Aşağıda yer alan clustergramda görüldüğü üzere (Şekil 4.25), gövdede CS, COX, Pdh1 ve ATP sentaz gen ifadelerinde kontrol bitkilerine göre 20, 25 ve 30 μ M LA uygulamalarında önemli bir artış belirlenirken, en iyi artış 25 μ M LA uygulamasında bulundu. Kontrole kıyasla CS gen ifadesinde ki artış kaydedilen enzim aktivitesi ile de benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.25. Mısır bitkilerinde gövdede sitrat sentaz, sitokrom oksidaz, ATP sentaz ve prüvat dehidrogenaz proteinlerinin gen ekspresyonları üzerine Lipoik asit uygulamalarının etkisinin clustergram ile ifadesi

Aşağıda yer alan clustergramda görüldüğü üzere (Şekil 4.26), endospermlerde isositrat liyaz ve malat sentaz gen ifadelerinde kontrol bitkilerine göre 20, 25 ve 30 μ M LA uygulamalarında önemli bir artış belirlenirken, en iyi artış 25 μ M LA uygulamasında bulundu. Kontrole kıyasla bu iki enzimin gen ifadesindeki artış kaydedilen enzim aktivitesi ile de paralellik göstermektedir.



Şekil 4.26. Mısır bitkilerinde endospermde izositrat liyaz ve malat sentaz proteinlerinin gen ekspresyonları üzerine Lipoik asit uygulamalarının etkisinin clustergram ile ifadesi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkiler çevrelerinde sürekli var olan biyotik ve abiyotik faktörlerden olumlu ya da olumsuz yönlerde kolayca etkilenebilir (Perez-Clemente *et al.* 2013). Stres durumu olarak adlandırılan olumsuz koşullar, bitki yaşam döngüsünün çimlenmeden çiçeklenmeye kadar tüm aşamalarında kayda değer olumsuz etkiler yaratır (Ramegowda and Senthil-Kumar 2015). Küresel anlamda, ekolojik dengelerin son 50 yıldır bozulma eğilimi göstermesinden dolayı iklimsel faktörler de görülen dengesizlikler, bununla birlikte dünya nüfusunun belirli bir hızla artıyor olması, ancak artan nüfusun beslenebilmesi için gerekli olan gıda üretiminin aynı oranda artış göstermemesinden dolayı, insanoğlunun yakın gelecekte besin kıtlığı ile karşı karşıya kalabileceği öngörülmektedir. İnsan nüfusunun doğal kaynaklar üzerindeki bozucu tutumu, verimli arazilerin tarım dışı amaçlarla kullanılması, hükümetlerin izlediği yanlış tarım politikaları gibi birtakım nedenler de insanoğlunu bekleyen bu riski daha da artırmaktadır.

Nitekim, birçok araştırmacı başta hızlı gelişen endüstri ve sanayileşmenin sebep olduğu, dengesizleşen çevresel koşulların, canlıların büyüme, gelişme ve verimliliklerini önemli ölçüde sınırlandırdığını rapor etmişlerdir (Rihan *et al.* 2017; Stutts *et al.* 2018). Dünyada ilgili bilimsel disiplinlerde yürütülmekte olan çalışmaların, giderek artan insan nüfusun taleplerine cevap verebilmek amacıyla, bitkilerde strese yol açarak hasar oluşturan ve bitkilerde verim kaybına, hatta ölüme yol açabilen çevresel faktörlerin, bitki üzerinde yaptığı hasarların bertaraf edilmesi veya minimize edilmesi üzerine yoğunlaştığı gözlenmektedir.

İnsan beslenmesinde önemli bitki türlerinden bir tanesi de mısır bitkisidir. Mısır, insan tüketimi için önemli olduğu kadar, hayvansal yemler için de son derece arzu edilir özelliklere sahip olması nedeniyle, küresel olarak kritik öneme sahip bitki türlerinde biridir (Crutzen *et al.* 2008). Ülkemizde zirai olarak mısır, buğday ve arpadan sonra en çok üretilen bitki türüdür.

Mevcut çalışmada, dünya nüfusunun gıda ihtiyacını büyük ölçüde karşılayan, endüstriyel olarak da büyük öneme sahip olan mısır bitkisi kullanılmıştır. Çalışmada mısır tohumlarına vitamin benzeri bileşik olan Lipoik asit uygulaması yapılmış ve bu uygulamanın çimlenme ve erken çimlenme sonrası evresindeki enerji metabolizması üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan çalışmada kök ve gövde uzunluklarının belirlenmesi, protein tayini, antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi, total karbonhidrat içeriği, fenolik madde içeriğinin belirlenmesi, çimlenme parametrelerinin belirlenmesi gibi fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerin yanı sıra sds-page, izoenzim çalışmaları ve gen analizleri ile moleküler seviyede meydana gelen değişimler belirlenmiştir.

Öncelikli olarak belirtmek gerekir ki, eksojen olarak uygulanan Lipoik asitin bitkilerdeki enerji metabolizması üzerindeki etkilerini belirleyen herhangi bir literatür çalışması bulunmadığından araştırmamızda elde ettiğimiz bulguları diğer araştırmacıların bulgularıyla detaylı olarak kıyaslama imkanı olmamıştır.

Lipoik asit (1,2-ditiolan-3-pentanoik asit; LA) bir ditiol bileşiğidir. Bu bileşik, piruvat dehidrojenaz, a-ketoglutarat dehidrojenaz ve glisin dekarboksilaz dahil olmak üzere birçok mitokondriyal enzim kompleksinin işlevi için gerekli olan sülfürü içerir (Cakatay 2006). Enerji metabolizmasındaki temel rolüne ek olarak, LA, metal iyonlarını şelatlama, serbest radikalleri detoksifiye etme, oksidatif olarak zarar görmüş proteinleri tamir etme, lipid peroksidasyonunu inhibe etme ve diğer gen ekspresyonunu etkileyebilme gibi birçok faydalı özelliğinden dolayı "ideal bir antioksidan" olarak kabul edilir. LA'nın çeşitli metabolik yollar ve hayvanlarda hastalıkların tedavisi üzerindeki etkileri hakkında çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, bitkilerde varlığı, etkisi ve rolleri ile ilgili çalışmalar halen emekleme aşamasındadır (Yasuno and Wada 2002).

Mevcut çalışmada mısır tohumuna uygulanan Lipoik asitin çimlenme yüzdesi üzerine etkili olmadığı, ancak LA uygulamasının araştırma bulgularımızda da belirtildiği gibi kök ve gövde uzunluklarında kontrol grubuna göre istatistiki olarak bariz artışlara yol

açtığı belirlenmiştir. Bu araştırmada, LA'nın çimlenme üzerine etkisiz oluşunun, seçilen varyetenin hızlı çimlenme özelliğinde olmasına ve çimlenme yüzdesinin yüksek olmasına bağlanabilir. Ancak gerek çimlenme esnasında ve gerekse çimlenme sonrasında, çimlenme olayında çok etkili olduğu bilinen alfa Amilaz aktivitesinin, kontrole göre LA uygulanan gruplarda daha yüksek değerlerde olduğu dikkate alındığında, bu enzim aktivitesinde sağlanan artışın, tohum çimlenme hızını, belirli bir dereceye kadar hızlandırabildiği, bu noktanın üzerinde ise çimlenme hızını daha da artırmada etkisiz olduğu, oysa çimlenme sonrası aşamada, bu enzim aktivitesi artmaya devam ettikçe kök ve gövde uzamasının da o nispette artış gösterdiğini söylemek mümkün gözükmemektedir.

Bitkilerde çözünebilir protein içeriğinin ölçülmesi, hücrelerin fizyolojik durumlarının belirlenmesi için önemli bir belirteç olarak kabul edilmektedir (Cuypers *et al.* 2005). Bitkilerdeki morfolojik değişim, genelde dokulardaki protein değişimleriyle yorumlanır. Bu yüzden protein içeriği, bitki büyüme ve gelişme hızının göstergesi olarak görülmektedir (Cuypers *et al.* 2005; Eryılmaz 2007). LA uygulaması yapılan gruplarda kontrol grubuna göre protein miktarında önemli artışlar belirlenmiştir. Bu yönüyle kök gövde uzunluğunda ve total protein içeriğindeki artış ile ilgili bulgularımız literatür ile uyum içerisindedir.

Antioksidan terimi, zararlı bir forma dönüşmeksizin reaktif oksijen türleri (ROS)'ni temizleyebilen bileşikler için kullanılmaktadır. Bitki dokuları stres koşullarında hücreleri ROS etkisinden korumak için, bazı enzimler (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz, peroksidazlar) ve düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar (glutatyon, askorbat, karotenoidler, tokoferoller) sentez ederler. Antioksidan enzimler, koordineli bir şekilde ROS'ları temizlerler veya onları daha az toksik olan bileşiklere dönüştürürler. Bitkiler bütün hücre alt yapılarında antioksidan sisteme sahiptirler (Srivalli *et al.* 2003). SOD, süperoksit radikalinin ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen metal içeren bir enzimdir (Sairam and Srivastava 2000; Eyidogan *et al.* 2003; Minibaeva and Gordon 2003). SOD reaktif oksijen türlerinin enzimatik olarak bertaraf edilme sistemindeki ilk zinciri oluşturur

(Møller 2001). SOD, süperoksidin parçalanmasını sağlayarak metallerin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonuyla hidroksil radikali oluşma riskini azaltır. ROT'a karşı antioksidan savunma sisteminin ilk hattı olan ve bütün aerobik organizmalarda ve aktifleşmiş oksijen üreten bütün hücre alt yapılarında bulunan bu enzimin aktivitesinin çeşitli streslere cevap olarak arttığı ve bu artışların strese karşı dirençle bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Bowler *et al.* 1991; Van Camp *et al.* 1994; Foyer *et al.* 1997; Apel and Hirt 2004). Antioksidan enzimler ROT detoksifiye etmede çok önemlidir. ROT bitkilerde kloroplastlar ve mitokondrilerde oluşmaktadır. Bu oksidan moleküller detoksifiye edilemezlerse başta membranlar olmak üzere hücrelerin çeşitli kısımlarında, organellerinde oksidatif hasara neden olurlar. ROT'ların en tehlikelilerinden biri olan ve diğerlerinin öncülü olarak kabul edilen $O_2^{\bullet-}$ radikali SOD enzimi tarafından detoksifiye edilmezse, hem kendisi hücre kompartmanlarına özellikle membranlara saldırıp doğrudan zarar verebilecek, hem de H_2O_2 ile birleşerek canlı hücrelerin gördüğü en toksik ve zararlı radikal olan OH- radikalinin oluşumuna öncülük edecektir. Daha önce yapılan çalışmalarda LA muamesinin antioksidan sistemini olumlu yönde etkilediğini ve oksidatif hasar ve metabolik bozulmaların tepkisine açıkça katkıda bulunduğunu göstermiştir. (Erdal *et al.* ,2014; Terzi *et al.* 2018). Mevcut çalışmada antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi için CAT, GPX, SOD, POD ve APX enzim aktiviteleri analiz edilmiş ve SOD, CAT, GPX enzim aktivitelerinin kontrole kıyasla azalırken APX aktivitesinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği belirlenmiştir.

Glutasyon redüktaz, flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren flavoprotein bir enzimdir. Glutasyon redüktaz, NADPH'nin bir elektronunu okside glutasyonun (GSSG) disülfid bağlarına aktararak yeniden GSH'ye dönüştürülür (Ranieri *et al.* 2005; Yannarelli *et al.* 2007, Deponte 2013). Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarını engellemek için gereklidir ve en önemli kaynağı heksoz monofosfat (pentoz fosfat) yoludur (Karabulut vd. Gülay 2016). GR aktivitesi literatürle benzerlik göstererek kontrol grubuna göre artmıştır. Glutasyon redüktaz, dimerik disülfid oksidoredüktaz olarak işlev görür ve GSSG'nin bir molar eşdeğerini iki molar eşdeğeri olan GSH'ye dönüştürmek için bir FAD grubu ve NADPH kullanır. GSH'nin antioksidan özelliğinden dolayı, glutasyon redüktaz hücrenin antioksidan kapasitesinin devamlılığı için önemlidir (Meister 1983;

Creissen *et al.* 1994; Güler 2008). GR askorbat glutatyon döngüsünde GSH/GSSG oranını yüksek tutarak hücreleri oksidatif hasara karşı korumada görevli anahtar enzimlerden biridir (Foyer and Noctor 2005). GR diğer enzimlerle birlikte H₂O₂'nin radikal özelliğinin ortadan kaldırılmasında görev alır. Oksitlenmiş askorbik asidi (dehidroaskorbat) tekrardan askorbik aside indirgeyen dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enzimi substrat olarak GSH'ı kullanmakta ve reaksiyon sonucu GSSG oluşmaktadır. Oluşan GSSG, GR enzimiyle tekrardan GSH'a indirgenir ve böylece dehidroaskorbat redüktaz enziminin substratı yeniden oluşur. GR enzimi GSSG'yi GSH'a indirgerken, NADPH'ı kullandığından CO₂ fiksasyonu sınırlandığı durumlarda, NADPH/NADP⁺ oranının dengelenmesine yardımcı olur. Bu nedenle GSSG'nin GSH'a indirgenmesi, oksidan temizlenmesinde önemli bir basamaktır ve oksidatif strese karşı savunmada GR'nin önemini ortaya çıkarmaktadır (Aono *et al.* 1995; Creissen *et al.* 1996; Güler 2008). Mevcut çalışmada, Mısır bitkisinin köklerinde total AsA, AsA, DHA ve DHA/AsA içeriklerine bakıldı ve total AsA ve indirgen AsA içeriğinin kontrol grubu bitkilerine göre bütün uygulama gruplarında artmış olduğu, DHA içeriğinin ise kontrol grubu bitkilerine göre, 20 µM LA uygulaması hariç, diğer bütün uygulama gruplarında arttığı kaydedildi. Birçok bitkinin stres koşullarının zararlı etkilerinden korunabilmek için antioksidan özelliğe sahip küçük bileşikler sentezlediği rapor edilmiştir (Pokorny 2001). Bu bileşiklerden biri de fenolik bileşiklerdir. Fenolik bileşikler bitki hücre ve dokularını oksidasyondan koruyabilmek için radikal parçalayıcı olarak sentezlenirler (Gülçin and Küfrevioğlu 2003). Çünkü fenolik bileşikler H₂O₂ yi indirgeyebilmek için elektron donörü olarak kullanılırlar (Asada, 1999). Bununla ilgili yapılan bir çalışmada halofit birkaç bitki türünün fenolik bileşiklerinin miktarına ve antioksidan aktivitelerine bakılarak gözlenmiştir ki, bitki tuza karşı ne kadar dirençli ise sentezlediği fenolik madde içeriği de ona paralel olarak o kadar fazla olmaktadır (Ksouri *et al.* 2008). Mevcut çalışmada fenolik madde içeriği de kontrol grubuna kıyasla artmış olduğundan, sonuçlarımızın diğer araştırmacılarınkilerle uyumlu olduğunu söyleyebiliriz.

Pirüvat dehidrogenaz multienzim kompleksi (PDHC) tarafından katalizlenen pirüvatın 2 karbonlu asetil CoA' ya dönüştürülmesi reaksiyonu hayvansal organizmalar için

dönüşümsüz bir reaksiyondur. Yani hayvansal organizmalarda asetil CoA' dan karbohidratların sentezi mümkün olmadığından hayvansal organizmalarda lipidlerden şekerlerin sentezi mümkün olmamaktadır. Fakat yüksek bitkilerde, mikroorganizmalarda ve alglerde bulunan iki farklı enzim; bu organizmalarda lipidlerden şekerlerin ve diğer biyosentetik ara bileşiklerin oluşumuna olanak sağlar. Bu enzimler, glioksilat döngüsü adı verilen ve TCA döngüsünün modifiye şekli olan bir metabolik yolda yer alırlar (Kornberg and Beevers 1957). TCA döngüsünde yer alan izositrattan malata kadar ki reaksiyon basamağının yerini, izositrat liyaz (ICL) ve malat sentazın (MLS) katalizlediği iki reaksiyon alır. Bu döngüde önce bir asetil CoA (2C), izositrat (6C) oluşturmak üzere okzalasetatla (4C) reaksiyona girer. Oysa glioksilat yolunda, bu döngünün ilk enzimi olan ICL katalizörlüğünde bir aldol parçalanmasıyla izositrat, süksinat ve glioksilata ayrılır. Birkaç çalışma, glioksilat döngüsünün çimlenen yağ tohumlarında etkin olduğu zaman, TCA döngüsünün dekarboksilat aşamalarının aktivitesinin, solunum üzerindeki karbohidrat sentezi lehine bastırıldığını göstermiştir (Millhouse *et al.* 1983; Falk *et al.* 1998).Mevcut çalışmada LA uygulanan grupta İzositrat Liyaz ve Malat sentaz aktivitesinin, kontrol grubunun endospermlerine göre artış gösterdiği ve yine bu uygulamanın amilaz aktivitesinde, dört gün boyunca kontrole kıyasla önemli artışlara yol açtığı tespit edildiğinden dolayı, bu sonuçlar bir araya getirilerek, LA'nın mısır tohumunda glioksilat yolunu hızlandırarak yağların karbohidratlara dönüşümünü artırdığı, amilaz aktivitesini hızlandırarak da tohum endosperminde depo edilmiş halde olan nişastanın glukoza dönüşümü reaksiyonlarını hızlandırdığını ve böylece çimlenme periyodunda bariz bir farklılık oluşturmasa bile, çimlenme sonrasındaki büyüme aşamasında kök- gövde büyümesini önemli ölçüde artırdığı mantıksal çıkarımını yapmak mümkündür.

Mitokondriyal matrikste yer alan ve krebs döngüsünün ilk enzimi olan sitrat sentaz (CS), OAA(4C) ile asetil koenzim-A'nın (2C) asetil grubunun kondansasyonunu katalize etmek suretiyle sitrat (6C) oluşumunu katalizler (Correa *et al.* 2007). OAA, enzime bağlanan ilk substrat olup, enzimin konformasyonunu değiştirmesini sağlar ve asetil-CoA için bir bağlanma yeri oluşturur. CS'nin önemli rol oynadığı krebs döngüsü, enerji üretiminin yanı sıra, önemli metabolik yollar için prekürsör sağlayan bir kavşak

niteliğindedir. Bu nedenle, bu enzimin hızındaki değişimler, hücrelerde cereyan eden TCA'nın ve daha çok sayıda temel metabolizmanın hızını ve yönünü etkilemektedir (Wiegand and Remington 1986). Mevcut çalışmada CS enziminin hem aktivitesine hem de gen ekspresyon seviyesine bakılmak suretiyle, lipoik asitin bu enzim üzerine etkisinin biyokimyasal ve moleküler düzeyde aydınlatılması, bu enzimin aktivitesi temelinde TCA döngüsünün hızında meydana gelen değişimlerin belirlenmesi ve PDH ve ATP sentaz enzimlerinden elde edilen bulguların da birlikte ele alınması suretiyle lipoik asit-indüklü TCA siklusu hızını artırmak suretiyle ve beraberinde sitokrom oksidaz (COX) geninin ifadesi ile de ETS sistemi üzerine de etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Yaptığımız analizlerde, Sitrat sentaz aktivitesinin uygulama gruplarında kontrol grubuna kıyasla artış gösterdiği belirlenmiştir. Kök ve gövdede sitrat sentaz, sitokrom oksidaz, ATP sentaz, pirüvat dehidrogenaz enzimleri ve ayrıca endospermlerde isositrat liyaz ve malat sentaz enzimlerini kodlayan genlerin ifade düzeyleri Real-Time PCR ile belirlenmeye çalışılmış ve gen ifadelerinde kontrol grubuna göre artışların olduğu gözlemlenmiştir.

Mevcut çalışmada çimlenme parametreleri ile beraber çimlenme enzimleri olan izositrat liyaz ve malat sentaz enzimlerinin hem aktivite hem de gen ekspresyon seviyeleri üzerine lipoik asit indüklü biyokimyasal ve moleküler etkisinin yine çimlenme için önem arz eden α -amilaz enzimi aktivitesi ile beraber değerlendirilmesi ve ayrıca lipoik asit uygulamasının çimlenme üzerine olan etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır ve elde edilen bulgular ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Alscher, R. G. Erturk, N., Heath, L. S., (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1331-1341.
- Amaya-Jackson, L., Davidson, J. R., Hughes, D. C., Swartz, M., Reynolds, V., George, L. K., Blazer, D. G., (1999). Functional impairment and utilization of services associated with posttraumatic stress in the community. *Journal of Traumatic Stress*, 12(4), 709-724.
- Aono, M., Saji, H., Sakamoto, A., Tanaka, K., Kondo, N., Tanaka, K., (1995). Paraquat tolerance of transgenic *Nicotiana tabacum* with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase. *Plant and Cell Physiology*, 36(8), 1687-1691.
- Aono, M., Saji, H., Sakamoto, A., Tanaka, K., Kondo, N., Tanaka, K., (1995). Paraquat tolerance of transgenic *Nicotiana tabacum* with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase. *Plant and Cell Physiology*, 36(8), 1687-1691.
- Apel, K., Hirt, H., (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Apel, K., Hirt, H., (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Arnold, S., & Kadenbach, B., (1997). Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase. *European journal of biochemistry*, 249(1), 350-354.
- Arzamastsev, A. P., Shkarina, E. I., Maksimova, T. V., Pakhomov, V. P., Nikulina, I. N., Lozovskaya, E. L., Sapezhinskii, I. I., (1999). Evaluation of the antioxidant activity of medicinal plant preparations. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 33(11), 587-590.
- Asada, K., (1992). Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85(2), 235-241.
- Asada, K., (1992). Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85(2), 235-241.
- Atay, Z., Yesilkaya, E., Erdeve, S. S., Turan, S., Akin, L., Eren, E., Siklar, Z., (2016). The etiology and clinical features of non-CAH gonadotropin-independent precocious puberty: a multicenter study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(5), 1980-1988.
- Bakardjieva, N. T., Christova, N., Christov, K., (1996). Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from mosses (*Mnium* sp.) and ferns (*Polypodium vulgare*) to high temperature. *Canadian journal of botany*, 74(10), 1665-1670.
- Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *Journal of biotechnology*, 53(2-3), 253-263.
- Beck, E., Ziegler, P., (1989). Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annual review of plant biology*, 40(1), 95-117.

- Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J., Grabl, M., (1983). Enzymes 1: oxidoreductases, transferases. *Methods of enzymatic analysis*, 3, 274-277.
- Berköz, M., Yalın, S., Güler, V. G., Yalçın, A., (2008). Akut Lösemilerde Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktivitesi. *Erciyes Medical Journal/Erciyes Tıp Dergisi*, 30(3).
- Biewenga, G. P., Haenen, G. R., Bast, A., (1997). The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology: The Vascular System*, 29(3), 315-331.
- Biewenga, G. P., Haenen, G. R., Bast, A., (1997). The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology: The Vascular System*, 29(3), 315-331.
- Bowler, C., Slooten, L., Vandenbranden, S., De Rycke, R., Botterman, J., Sybesma, C., Inzé, D., (1991). Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *The EMBO journal*, 10(7), 1723-1732.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D., Asada, K., (1994). Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(3), 199-218.
- Bozcuk, S., (1978). Domates (*Lycopersicum esculentum* Mill.), arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) bitkilerinin büyüme ve gelişmesinde tuzkinetin etkileşimi üzerinde araştırmalar. HÜ Fen Fak., Botanik Bölümü, Ankara.
- Buettner, G. R., Jurkiewicz, B. A., (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation research*, 145(5), 532-541.
- Bullock, M. W., Brockman Jr, J. A., Patterson, E. L., Pierce, J. V., Von Saltza, M. H., Sanders, F., Stokstad, E. L. R., (1954). Syntheses in the thioctic acid series. *Journal of the American Chemical Society*, 76(7), 1828-1832.
- Burns, J. J., (1957). Missing step in man, monkey and guinea pig required for the biosynthesis of L-ascorbic acid. *Nature*, 180(4585), 553.
- Cakmak, T., Dumlupinar, R., Erdal, S., (2010). Acceleration of germination and early growth of wheat and bean seedlings grown under various magnetic field and osmotic conditions. *Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association*, 31(2), 120-129.
- Calhoun, M. W., Thomas, J. W., Gennis, R. B., (1994). The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps. *Trends in biochemical sciences*, 19(8), 325-330.
- Carreau, JP, Lapous, D. ve Raulin, J., (1977) *Biochimie*, 59, 487.
- Chaudière, J., Ferrari-Iliou, R., (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and chemical toxicology*, 37(9-10), 949-962.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C., (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(2), 192-208.
- Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli, G., Chen, J., Zeeman, S. C., Smith, A. M., (2004). A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in Arabidopsis leaves at night. *The Plant Journal*, 37(6), 853-863.
- Cioni, M., Pinzauti, G. Vanni, P., (1981). Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. *Comp Biochem Physiol B* 70B, 1-26.
- Comakli, V., Ciftci, M., Kufrevioglu, O. I., (2013). Effects of some metal ions on rainbow trout erythrocytes glutathione S-transferase enzyme: an in vitro study. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 28(6), 1261-1266.

- Considine, M., (2006). 12 Ascorbate and glutathione in fruit ripening: Is cycling important for fruit health?.
- Corrêa, C., Amboni, G., Assis, L. C., Martins, M. R., Kapczinski, F., Streck, E. L., Quevedo, J., (2007). Effects of lithium and valproate on hippocampus citrate synthase activity in an animal model of mania. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 31(4), 887-891.
- Creissen, G. P., Edwards, E. A., Mullineaux, P. M., (1994). Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants, 343, 364.
- Creissen, G. P., Edwards, E. A., Mullineaux, P. M., (1994). Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants, 343, 364.
- Crutzen P, Mosier AR, Smith KA, Winiwater W., (2008) Tarımsal biyoyakıt üretiminden elde edilen N₂ serbest bırakılması, fosil yakıtların yerini alarak küresel ısınmayı azaltmaktadır. *Atmos Chem Phys* (8): 389-395
- Cuypers, A., Smeets, K., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere, A., Vangronsveld, J., (2005). Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(5), 437-444.
- Çelik, S., Ozkaya, A., (2002). Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin E, and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stress induced by H₂O₂. *BMB Reports*, 35(6), 547-552.
- D'Amico, M. L., Izzo, R., Navari-Izzo, F., Tognoni, F., Pardossi, A., (2003, July). Sea water irrigation: antioxidants and quality of tomato berries (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In *International Symposium on Managing Greenhouse Crops in Saline Environment* 609 (pp. 59-65).
- Deponte, M., (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3217-3266.
- Dominici, S., Paolicchi, A., Lorenzini, E., Maellaro, E., Comporti, M., Pieri, L., Pompella, A., (2003). γ -Glutamyltransferase-dependent prooxidant reactions: A factor in multiple processes. *Biofactors*, 17(1-4), 187-198.
- Dron, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(18), 6738-6742.
- Durmus, M., Ender, G., Kadir, B. A., Nurcin, G., Erdogan, O., Ersoy, M. O., (2003). Remifentanil with thiopental for tracheal intubation without muscle relaxants. *Anesthesia & Analgesia*, 96(5), 1336-1339.
- Eastmond, P. J., Graham, I. A., (2001). Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends in plant science*, 6(2), 72-78.
- Emerling, B. M., Weinberg, F., Snyder, C., Burgess, Z., Mutlu, G. M., Viollet, B., Chandel, N. S., (2009). Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(10), 1386-1391.
- Envari, M., (1984). Seed physiology: from ovule to maturing seed, *The Botanical Review*, 50(2), 143-169.

- Erdal, S., Taskin, M., (2010). Production of alpha-amylase by *Penicillium expansum* MT-1 in solid-state fermentation using waste Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as substrate. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(3), 5342-5350.
- Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E., (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food chemistry*, 110(1), 76-82.
- Eryilmaz, J., Pan, P., Amaya, M. F., Allali-Hassani, A., Dong, A., Adams-Cioaba, M. A., Min, J., (2009). Structural studies of a four-MBT repeat protein MBTD1. *PLoS One*, 4(10), e7274.
- Eyidoğan, F. I., Öktem, H. A., Yücel, M., (2003). Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. *Acta physiologiae plantarum*, 25(3), 263-269.
- Eyidoğan, F. I., Öktem, H. A., Yücel, M., (2003). Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. *Acta physiologiae plantarum*, 25(3), 263-269.
- Falk, K. L., Behal, R. H., Xiang, C., Oliver, D. J., (1998). Metabolic bypass of the tricarboxylic acid cycle during lipid mobilization in germinating oilseeds: regulation of NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase versus fumarase. *Plant physiology*, 117(2), 473-481.
- Faust, A., Burkart, V., Ulrich, H., Weischer, C. H., Kolb, H., (1994). Effect of lipoic acid on cyclophosphamide-induced diabetes and insulinitis in non-obese diabetic mice. *International journal of immunopharmacology*, 16(1), 61-66.
- Fernández-Morán, H., (1962). Cell-membrane ultrastructure: low-temperature electron microscopy and X-Ray diffraction studies of lipoprotein components in lamellar systems. *Circulation*, 26(5), 1039-1065.
- Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J. A., LeBaron, F. N., (1951). Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J Biol Chem*, 191(2), 833-841.
- Forti, G., Elli, G., (1995). The function of ascorbic acid in photosynthetic phosphorylation. *Plant physiology*, 109(4), 1207-1211.
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ., (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant* 92: 696-717
- Foyer, C. H., Noctor, G., (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell Environment*, 28(8), 1056-1071.
- Foyer, C. H., Halliwell, B., (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1), 21-25.
- Foyer, C. H., Halliwell, B., (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1), 21-25.
- Foyer, C. H., Harbinson, J., (1994). Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants, 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. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 241-254.

- Foyer, C. H., Noctor, G., (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell Environment*, 28(8), 1056-1071.
- Frienzuoli, A.M., Vanni, P., Ramponi, G. and Baccari, V., (1968). Changes in enzyme levels during germination of seeds of *Triticum durum*. *PI. Phisiol., Lancaster*, 43, 260-264.
- García-Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., Gennis, R. B., (1994). The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *Journal of Bacteriology*, 176(18), 5587.
- Goodsell, D. S., (2004). *Bionanotechnology: lessons from nature*. John Wiley Sons.
- Gorcek, Z., Erdal, S., (2015). Lipoic acid mitigates oxidative stress and recovers metabolic distortions in salt-stressed wheat seedlings by modulating ion homeostasis, the osmo-regulator level and antioxidant system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(14), 2811-2817.
- Gossett, D.R., Millhollon, E.P., Lucas, M.C., 1994. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Sci.* 34, 706–714
- Gözükara E.M., (1989). *Biyokimya*. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları, Malatya; 55,56,705,845-848.
- Grandaliano, G., Gesualdo, L., Ranieri, E., Monno, R., Montinaro, V., Marra, F., Schena, F. P., (1996). Monocyte chemotactic peptide-1 expression in acute and chronic human nephritides: a pathogenetic role in interstitial monocytes recruitment. *Journal of the American Society of Nephrology*, 7(6), 906-913.
- Grebe, T. W., Stock, J. B., (1999). The histidine protein kinase superfamily. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 41, pp. 139-227). Academic Press.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E. L., Zenk, M. H., (1989). Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(18), 6838-6842.
- Grubmeyer, C., Melanson, D., Duncan, I., Spencer, M., (1979). Oxidative phosphorylation in pea cotyledon submitochondrial particles. *Plant physiology*, 64(5), 757-762.
- Gueguen, V., Macherel, D., Jaquinod, M., Douce, R., Bourguignon, J., (2000). Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 5016-5025.
- Gueguen, V., Macherel, D., Jaquinod, M., Douce, R., Bourguignon, J., (2000). Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 5016-5025.
- Güler, A. D., Ecker, J. L., Lall, G. S., Haq, S., Altimus, C. M., Liao, H. W., Hankins, M. W., (2008). Melanopsin cells are the principal conduits for rod–cone input to non-image-forming vision. *Nature*, 453(7191), 102.
- Ha *et al.*, 1999 S.B. Ha, A.P. Smith, R. Howden, W.M. Dietrich, S. Bugg, M.J. Óconnell., (1999). Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe* *Plant Cell*, 11, pp. 1153-1163
- Han *et al.*, D. Han, H.J. Tritschler, L. Packer., (1995). α -Lipoic acid increases intracellular glutathione in a human T-lymphocyte Jurkat cell line *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207 , pp. 258-264

- Han, G., Gupta, S. D., Gable, K., Niranjankumari, S., Moitra, P., Eichler, F., Dunn, T. M., (2009). Identification of small subunits of mammalian serine palmitoyltransferase that confer distinct acyl-CoA substrate specificities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(20), 8186-8191.
- He, B. Q., Yu, X. Y., Wang, P. Z., Chen, J. R., Xiao, W. J., (2018). A photoredox catalyzed iminyl radical-triggered C–C bond cleavage/addition/Kornblum oxidation cascade of oxime esters and styrenes: synthesis of ketonitriles. *Chemical communications*, 54(86), 12262-12265.
- Hebrok, M., Kim, S. K., St Jacques, B., McMahon, A. P., Melton, D. A., (2000). Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development*, 127(22), 4905-4913.
- Heidarvand, L., Millar, A. H., Taylor, N. L., (2017). Responses of the mitochondrial respiratory system to low temperature in plants. *Critical reviews in plant sciences*, 36(4), 217-240.
- Heitz, T., Geoffroy, P., Fritig, B., Legrand, M., (1991). Two apoplasmic α -amylases are induced in tobacco by virus infection. *Plant physiology*, 97(2), 651-656.
- Herschbach, C., Rennenberg, H., (1994). Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulphate and sulphate transport in tobacco plants. *Journal of Experimental Botany*, 45(8), 1069-1076.
- Hinkle, P. C., (2005). P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1706(1-2), 1-11.
- Horemans, N., Asard, H., Caubergs, R. J., (1997). The ascorbate carrier of higher plant plasma membranes preferentially translocates the fully oxidized (dehydroascorbate) molecule. *Plant Physiology*, 114(4), 1247-1253.
- Hu, C. F., Van Huystee, R. B., (1989). Role of carbohydrate moieties in peanut (*Arachis hypogaea*) peroxidases. *Biochemical journal*, 263(1), 129-135.
- Huang, T., Huang, K., (2004). The biomedical function of α -lipoic acid [J]. *Biochemistry and Medicine*, 24(1), 58-60.
- Hülya, T. Mısır fidelerinin büyüme ve gelişmesi üzerine progesteronun doğrudan etkisi. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(2), 396-405.
- Iwakami, S., Misu, H., Takeda, T., Sugimori, M., Matsugo, S., Kaneko, S., Takamura, T., (2011). Concentration-dependent dual effects of hydrogen peroxide on insulin signal transduction in H4IIEC hepatocytes. *PloS one*, 6(11), e27401.
- Karabulut, H., Gülay, M. Ş., (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76.
- Karthikeyan, B., Jaleel, C. A., Gopi, R., Deiveekasundaram, M., (2007). Alterations in seedling vigour and antioxidant enzyme activities in *Catharanthus roseus* under seed priming with native diazotrophs. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8(7), 453-457.
- Kayali, R., Çakatay, U., Akçay, T., Altuğ, T., (2006). Effect of alpha-lipoic acid supplementation on markers of protein oxidation in post-mitotic tissues of ageing rat. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 24(1), 79-85.
- Kohori, A., Chiwata, R., Hossain, M. D., Furuike, S., Shiroguchi, K., Adachi, K., Kinoshita Jr, K., (2011). Torque generation in F1-ATPase devoid of the entire amino-terminal helix of the rotor that fills half of the stator orifice. *Biophysical journal*, 101(1), 188-195.

- Kornberg, H. L., Beevers, H., (1957). A mechanism of conversion of fat to carbohydrate in castor beans. *Nature*, 180(4575), 35.
- Kornberg, H. L., Beevers, H., (1957). A mechanism of conversion of fat to carbohydrate in castor beans. *Nature*, 180(4575), 35.
- Kornberg, H. L., Krebs, E. H., (1957). Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature*, 179(4568), 988.
- Kornberg, H. L., Beevers, H., (1957). The glyoxylate cycle as a stage in the conversion of fat to carbohydrate in castor beans. *Biochimica et biophysica acta*, 26(3), 531-537.
- Krömer, S., Lernmark, U., Gardeström, P., (1994). In vivo mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity, studied by rapid fractionation of barley leaf protoplasts. *Journal of plant physiology*, 144(4-5), 485-490.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdelly, C., (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus Biologies*, 331(11), 865-873.
- Kunert, K. J., Foyer, C. H., (1993). Thiol/disulphide exchange in plants. *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants. Regulatory Agricultural and Environmental Aspects*. SPB Academic Publishers, The Hague, The Netherlands, 139-151.
- Laidman, D. L., Tavener, R. J., (1971). Triglyceride mobilization in the germinating wheat grain. *Biochemical Journal*, 124(2), 4P.
- Landolt, R., Matile, P., (1990). Glyoxisome-like microbodies in senescent spinach leaves. *Plant Science*, 72(2), 159-163.
- Lapenna D., Ciofani G., Pierdomenico S., Giamberardino M., (2003). Cuccurullo F. Dihidrolipoik asit, 15-lipoksijenaza bağımlı lipit peroksidasyonunu inhibe eder. *Ücretsiz Biol. Med* 35: 1203-1209; doi: 10.1016 / S0891-5849 (03) 00508-2.
- Law, M. Y., Charles, S. A., Halliwell, B., (1983). Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. *Biochemical Journal*, 210(3), 899-903.
- Lemaire, C., Hamel, P., Velours, J., Dujardin, G., (2000). Absence of the Mitochondrial AAA Protease Yme1p Restores F0-ATPase Subunit Accumulation in anoxal Deletion Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 23471-23475.
- Lernmark, U., Gardeström, P., (1994). Distribution of pyruvate dehydrogenase complex activities between chloroplasts and mitochondria from leaves of different species. *Plant physiology*, 106(4), 1633-1638.
- Lledías, F., Rangel, P., Hansberg, W., (1998). Oxidation of catalase by singlet oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10630-10637.
- Lodge, J. K., Packer, L., (1999). Natural sources of lipoic acid in plant and animal tissues. In *Antioxidant food supplements in human health* (pp. 121-134). Academic Press.
- Lu, S. C., (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3143-3153.
- Maheshwari, D. T., Kumar, M. Y., Verma, S. K., Singh, V. K., Singh, S. N., (2011). Antioxidant and hepatoprotective activities of phenolic rich fraction of

- Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2422-2428.
- Marco *et al.*, R. Marco, A. Pestaña, J. Sebastian, S. Alberto., (1974). Oxaloacetate metabolic crossroads in liver. Enzyme compartmentation and regulation of gluconeogenesis *Mol Cell Biochem*, 3 (1974), pp. 53-70
- McKersie, B. D., Chen, Y., de Beus, M., Bowley, S. R., Bowler, C., Inzé, D., Botterman, J., (1993). Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant physiology*, 103(4), 1155-1163.
- Meister, A., (1983). Transport and metabolism of glutathione and γ -glutamyl amino acids.
- Meister, A., (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *Journal of Biological Chemistry*, 269(13), 9397-9400.
- Meister, A., Anderson, M. E., (1983). Glutathione. *Annual review of biochemistry*, 52(1), 711-760.
- Mettler, I. J., Beevers, H., (1980). Oxidation of NADH in glyoxysomes by a malate-aspartate shuttle. *Plant Physiology*, 66(4), 555-560.
- Mijnhout, G. S., Alkhalaf, A., Kleefstra, N., Bilo, H. J., (2010). Alpha lipoic acid: a new treatment for neuropathic pain in patients with diabetes. *Neth J Med*, 68(4), 158-62.
- Miller, J. R., Busby, R. W., Jordan, S. W., Cheek, J., Henshaw, T. F., Ashley, G. W., Marletta, M. A., (2000). *Escherichia coli* LipA is a lipoyl synthase: in vitro biosynthesis of lipoylated pyruvate dehydrogenase complex from octanoyl-acyl carrier protein. *Biochemistry*, 39(49), 15166-15178.
- Millhouse, J. A., Robinson, S. P., Downton, W. J. S., (1983). Photosynthesis and ion content of leaves and isolated chloroplasts of salt-stressed spinach. *Plant Physiology*, 73(2), 238-242.
- Minibaeva, F. V., Gordon, L. K., (2003). Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russian journal of plant physiology*, 50(3), 411-416.
- Minibaeva, F. V., Gordon, L. K., (2003). Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russian journal of plant physiology*, 50(3), 411-416.
- Miyake, C., Asada, K., (1992). Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant and Cell Physiology*, 33(5), 541-553.
- Miyake, C., Suzuki, Y., Yamamoto, H., Amako, K., Makino, A., (2012). O₂-enhanced induction of photosynthesis in rice leaves: the Mehler-ascorbate peroxidase (MAP) pathway drives cyclic electron flow within PSII and cyclic electron flow around PSI. *Soil science and plant nutrition*, 58(6), 718-727.
- Møller, I. M., Sweetlove, L. J., (2010). ROS signalling-specificity is required. *Trends in plant science*, 15(7), 370-374.
- Mooney BP, Miernyk JA, Randall DD (2002) The complex fate of alpha-ketoacids. *Annu Rev Plant Biol* 53: 357-375

- Mooring, M. T., Cooper, A. W., Seneca, E. D., (1971). Seed germination response and evidence for height ecophenes in *Spartina alterniflora* from North Carolina. *American Journal of Botany*, 58(1), 48-55.
- Morikawa, T., Yasuno, R., Wada, H., (2001). Do mammalian cells synthesize lipoic acid? Identification of a mouse cDNA encoding a lipoic acid synthase located in mitochondria 1. *FEBS letters*, 498(1), 16-21.
- Nakano, Y. and K. Asada., (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radicals. *Plant Cell Physiol.* 28, 131-140.
- Nakano, Y., Asada, K., (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and cell physiology*, 28(1), 131-140.
- Navari-Izzo, F., Izzo, R., Bottazzi, F., Ranieri, A., (1988). Effects of water stress and salinity on sterols in *Zea mays* shoots. *Phytochemistry*, 27(10), 3109-3115.
- Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F., Sgherri, C., (2002). Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 463-470.
- Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F., Sgherri, C., (2002). Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 463-470.
- Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F., Sgherri, C., (2002). Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 463-470.
- Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F., Sgherri, C., (2002). Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 463-470.
- Navari-Izzo, F., Quartacci, M.F., Sgherri, C., (2002). Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol. Biochem*, 40, 463-470
- Nicholls, C. I., Altieri, M. A., (2013). Plant biodiversity enhances bees and other insect pollinators in agroecosystems. A review. *Agronomy for Sustainable development*, 33(2), 257-274.
- Niittyla, T., G. Messerli, M. Trevisan, J. Chen, A. M. Smith and S. C. Zeeman.,(2004). "Apreviously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves." *Science* 303(5654): 87-89.
- Nijs D., Kelley P., (1991). C ve E vitaminleri in vivo olarak tek hidrojen atomunu bağışlar. *FEBS Lett.* 284: 147-151.
- Noctor, G., Foyer, C. H., (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249-279.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S. O., Driscoll, S., Novitskaya, L., FOYER, C. H., (2002). Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration?. *Annals of Botany*, 89(7), 841-850.
- O'Rourke, J.,mWilson, S. B., (1987). A Plant Mitochondrial ATPase/Synthase. In *Plant Mitochondria* (pp. 147-150). Springer, Boston, MA.
- Ogawa, K. I., Kanematsu, S., Asada, K., (1997). Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach

- hypocotyls: their association with lignification. *Plant and cell physiology*, 38(10), 1118-1126.
- Oktaç, M., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö. İ., (2003). Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 36(2), 263-271.
- Ovecka, M., Takac, T., (2014). Managing heavy metal toxicity stress in plants: Biological and biotechnological tools. *Biotechnol. Adv.* 32:73–86.. Mercury toxicity and antioxidants: Part 1: role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. *Altern. Med. Rev.* 7:456–471.
- Packer, L. Reznick, A. Z., (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. In *Methods in enzymology* (Vol. 233, pp. 357-363). Academic Press.
- Packer, L., Cadenas, E., (2010). Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 48(1), 26-32.
- Packer, L., Kraemer, K., Rimbach, G., (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, 17(10), 888-895.
- Packer, L., Roy, S., Sen, C. K., (1996). α -Lipoic acid: a metabolic antioxidant and potential redox modulator of transcription. In *Advances in pharmacology* (Vol. 38, pp. 79-101). Academic Press.
- Packer, L., Tritschler, H. J., Wessel, K., (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant α -lipoic acid. *Free radical biology and medicine*, 22(1-2), 359-378.
- Packer, L., Witt, E. H., Tritschler, H. J., (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free radical biology and medicine*, 19(2), 227-250.
- Padh, H., (1990). Cellular functions of ascorbic acid. *Biochemistry and Cell Biology*, 68(10), 1166-1173.
- Parry, R. J., Trainor, D. A., (1978). Biosynthesis of lipoic acid. 2. Stereochemistry of sulfur introduction at C-6 of octanoic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 100(16), 5243-5244.
- Parry, R., (1983) *Tetrahedron* 39, 1215-1238
- Pastore, A., Piemonte, F., Locatelli, M., Russo, A. L., Gaeta, L. M., Tozzi, G., Federici, G., (2001). Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clinical chemistry*, 47(8), 1467-1469.
- Patrick, L., 2002, *Biochem. Pharmacol.* 50:123–126.
- Patykowski, J., Urbanek, H., (2003). Activity of enzymes related to H₂O₂ generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, 151(3), 153-161.
- Pekyardımcı, Ş; (2018). Anaplerotik Reaksiyonlar. Ankara, https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/4358/mod_resource/content/0/5.%20Ohafta.pdf. 26.09.2019.
- Pérez-Clemente, R. M., Vives, V., Zandalinas, S. I., López-Climent, M. F., Muñoz, V., Gómez-Cadenas, A., (2013). Biotechnological approaches to study plant responses to stress. *BioMed research international*, 2013.
- Pérez-López, U., Robredo, A., Lacuesta, M., Sgherri, C., Mena-Petite, A., Navari-Izzo, F., Muñoz-Rueda, A., (2010). Lipoic acid and redox status in barley plants subjected to salinity and elevated CO₂. *Physiologia plantarum*, 139(3), 256-268.

- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. H. (Eds.), (2001). Antioxidants in food: practical applications. CRC press.
- Racker, E., (1963). A reconstituted system of oxidative phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications*, 14(1), 75-78.
- Ramegowda, V., Senthil-Kumar, M., (2015). The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *Journal of plant physiology*, 176, 47-54.
- Ranieri A, Castagna A, Scebba F, Careri M, Zagnoni I, Predieri G, Pagliari M, Sanita di Toppi L., (2005) Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. *Plant Physiol Biochem* 43:45–54
- Rauser, W. E., Ackerley, C. A., (1987). Localization of cadmium in granules within differentiating and mature root cells. *Canadian Journal of Botany*, 65(4), 643-646.
- Raven, J. A., Allen, J. F., (2003). Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants?. *Genome biology*, 4(3), 209.
- Reed, L. J., (1974). Multienzyme complexes. *Accounts of Chemical Research*, 7(2), 40-46.
- Reed, L. J., DeBusk, B. G., Gunsalus, I. C., Hornberger, C. S., (1951). Crystalline α -lipoic acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science*, 114(2952), 93-94.
- Rennenberg, H., Lamoureux, G. L., (1990). Physiological processes that modulate the concentration of glutathione in plant cells. *Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants*, 53-65.
- Rihan, H. Z., Al-Issawi, M., Fuller, M. P., (2017). Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 143-157.
- Ristic, Z., Ashworth, E. N., (1993). Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in *Arabidopsis thaliana* L.(Heyn) cv. Columbia during rapid cold acclimation. *Protoplasma*, 172(2-4), 111-123.
- Robinson, S. P., Downton, W. J. S., Millhouse, J. A., (1983). Photosynthesis and ion content of leaves and isolated chloroplasts of salt-stressed spinach. *Plant Physiology*, 73(2), 238-242.
- Rosegrant, M. W., Cline, S. A., (2003). Global food security: challenges and policies. *Science*, 302(5652), 1917-1919.
- Rosegrant, M. W., Paisner, M. S., Meijer, S., Witcover, J., (2001). Global food projections to 2020: emerging trends and alternative futures. International Food Policy Research Institute.
- Sairam, R. K., Srivastava, G. C., Saxena, D. C., (2000). Increased antioxidant activity under elevated temperatures: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 43(2), 245-251.
- Sairam, R. K., Srivastava, G. C., Saxena, D. C., (2000). Increased antioxidant activity under elevated temperatures: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 43(2), 245-251.
- Sanchez-Fernandez, R., Fricker, M., Corben, L. B., White, N. S., Sheard, N., Leaver, C. J., May, M. J., (1997). Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(6), 2745-2750.

- Santos, M., Gousseau, H., Lister, C., Foyer, C., Creissen, G., Mullineaux, P., (1996). Cytosolic ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana* L. is encoded by a small multigene family. *Planta*, 198(1), 64-69.
- Santos, M., Gousseau, H., Lister, C., Foyer, C., Creissen, G., Mullineaux, P., (1996). Cytosolic ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana* L. is encoded by a small multigene family. *Planta*, 198(1), 64-69.
- Scandalios, J. G., (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*, 101(1), 7.
- Scheller, F., Kirstein, D., Kirstein, L., Schubert, F., Wollenberger, U., Ollson, B., Johansson, G., (1987). Enzyme electrodes and their application. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 316(1176), 85-94.
- Seelert, H., Dencher, N. A., Müller, D. J., (2003). Fourteen protomers compose the oligomer III of the proton-rotor in spinach chloroplast ATP synthase. *Journal of molecular biology*, 333(2), 337-344.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., Schuh, A. C., (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376(6535), 62.
- Shaul O, Mironov V, Burssens S, Van Montagu MV, Inze' D., (1996). Two *Arabidopsis* cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation in synchronised tobacco 3Y-2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93, 4868-72.
- Shedlofsky, S. I., Israel, B. C., McClain, C. J., Hill, D. B., Blouin, R. A., (1994). Endotoxin administration to humans inhibits hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. *The Journal of clinical investigation*, 94(6), 2209-2214.
- Sheffield, V. C., Stone, E. M., Alward, W. L., Drack, A. V., Johnson, A. T., Streb, L. M., Nichols, B. E., (1993). Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31. *Nature genetics*, 4(1), 47.
- Singh, R. P., Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K., (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(1), 81-86.
- Snell, E. E., Strong, F. M., Peterson, W. H., (1937). Growth factors for bacteria: Fractionation and properties of an accessory factor for lactic acid bacterial. *Biochemical Journal*, 31(10), 1789.
- Srivalli, B., Sharma, G., Khanna-Chopra, R., (2003). Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Physiologia Plantarum*, 119(4), 503-512.
- Stasch JP, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Haerter M., (2002) NO-and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Brit J Pharmacol*;136:773-83.
- Storm, J., Muller, S., (2012). Lipoic acid metabolism of Plasmodium-a suitable drug target. *Current pharmaceutical design*, 18(24), 3480-3489.
- Strohm, M., Jouanin, L., Kunert, K. J., Pruvost, C., Polle, A., Foyer, C. H., Rennenberg, H., (1995). Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase. *The Plant Journal*, 7(1), 141-145.

- Stutts, L., Wang, Y., Stapleton, A. E., (2018). Plant growth regulators ameliorate or exacerbate abiotic, biotic and combined stress interaction effects on *Zea mays* kernel weight with inbred-specific patterns. *Environmental and experimental botany*, 147, 179-188.
- Szeląg, M., Mikulski, D., Molski, M., (2012). Quantum-chemical investigation of the structure and the antioxidant properties of α -lipoic acid and its metabolites. *Journal of molecular modeling*, 18(7), 2907-2916.
- Taşdan, K., Çetin, F., Gürer, B., 2011. Durum ve Tahmin Mısır 2011/2012. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Ekonomi ve Politikalar Geliştirme Enst. Yayın No: 193, Ankara.
- Taşgın, E., Atıcı, Ö., Nalbantoğlu, B., Popova, L. P., (2006). Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry*, 67(7), 710-715.
- Taylor, R. W., Boon, A. K., Dantzer, B., Réale, D., Humphries, M. M., Boutin, S., McADAM, A. G., (2012). Low heritabilities, but genetic and maternal correlations between red squirrel behaviours. *Journal of Evolutionary Biology*, 25(4), 614-624.
- Tetikçok, R., Özçetin, M., Çeltek, N. Y., Oktay, G., Ünlü, U., Şengül, M., (2015). LIPOIC ACID. *Çağdaş Tıp Dergisi*, 5(3), 206-209.
- Tomashek, J. J., Brusilow, W. S., (2000). Stoichiometry of energy coupling by proton-translocating ATPases: a history of variability. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 32(5), 493-500.
- Tripathi, V., Ellis, J. D., Shen, Z., Song, D. Y., Pan, Q., Watt, A. T., Blencowe, B. J., (2010). The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Molecular cell*, 39(6), 925-938.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., (1995). Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 269(5227), 1069-1074.
- Turk, H., Erdal, S., (2015). Melatonin alleviates cold-induced oxidative damage in maize seedlings by up-regulating mineral elements and enhancing antioxidant activity. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 178(3), 433-439.
- Turk, H., Erdal, S., Genisel, M., Atıcı, O., Demir, Y., & Yanmis, D., (2014). The regulatory effect of melatonin on physiological, biochemical and molecular parameters in cold-stressed wheat seedlings. *Plant growth regulation*, 74(2), 139-152.
- TÜİK, 2018a. Tarım İstatistikleri (Bitkisel Üretim İstatistikleri, Bitkisel Ürünler Denge Tabloları), http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001
- Vambutas, V. K., Racker, E., (1965). Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation I. Stimulation of photophosphorylation by a preparation of a latent, Ca⁺⁺-dependent adenosine triphosphatase from chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 240(6), 2660-2667.
- Van Camp, W. , Bowler, C., Van Montagu, M., Inzé, D., Asada, K., (1994). Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(3), 199-218.
- Vanden Boom, T., and J. E. Cronan, Jr. 1990. A physical-genetic map of the lipid-containing bacteriophage PR4. *Virology* 177:23-32.

- VISE, A. B., Lascelles, J., (1967). Some properties of a mutant strain of *Escherichia coli* which requires lysine and methionine or lipoic acid for growth. *Microbiology*, 48(1), 87-93.
- Wada, H., Shintani, D., Ohlrogge, J., (1997). Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(4), 1591-1596.
- Wada, M., Yasuno, R., Jordan, S. W., Cronan Jr, J. E., Wada, H., (2001). Lipoic acid metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cloning and characterization of a cDNA encoding lipoyltransferase. *Plant and Cell Physiology*, 42(6), 650-656.
- Wang, X., Yu, Y., Ji, L., Liang, X., Zhang, T., Hai, C. X., (2011). Alpha-lipoic acid protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via multiple target effects. *Food and chemical toxicology*, 49(11), 2750-2757.
- Welinder, K. G., (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2(3), 388-393.
- Whetten, R. W., MacKay, J. J., Sederoff, R. R., (1998). Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 49(1), 585-609.
- Wiegand G, Remington SJ., (1986) Sitrat sentaz: yapı, kontrol ve mekanizma. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 15: 97-117
- Wingate, V. P., Lawton, M. A., Lamb, C. J., (1988). Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiology*, 87(1), 206-210.
- Yang, Y., Steup, M., (1990). Polysaccharide fraction from higher plants which strongly interacts with the cytosolic phosphorylase isozyme: I. Isolation and characterization. *Plant physiology*, 94(3), 960-969.
- Yannarelli, G. G., Fernández-Alvarez, A. J., Santa-Cruz, D. M., Tomaro, M. L., (2007). Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry*, 68(4), 505-512.
- Yasuno, R., Wada, H., (1998). Biosynthesis of lipoic acid in *Arabidopsis*: cloning and characterization of the cDNA for lipoic acid synthase. *Plant physiology*, 118(3), 935-943.
- Yasuno, R., Wada, H., (2002). The biosynthetic pathway for lipoic acid is present in plastids and mitochondria in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 517(1-3), 110-114.
- Yokota, A., Tamura, T., Takeuchi, M., Weiss, N., Stackebrandt, E., (1994). Transfer of *Propionibacterium innocuum* Pitcher and Collins 1991 to *Propioniferax* gen. nov. as *Propioniferax innocua* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(3), 579-582.

ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Ordu'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ordu'da tamamladı. 2011 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2016 yılında mezun oldu. Aynı yıl başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.

