

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**OSMOTİK STRES KOŞULLARINDA ALFA LİPOİK ASİT SİNYALİZASYONU İLE
ANTİOKSİDAN MEKANİZMA ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sebahat Duygu GÜMRÜKÇÜ

**TEMMUZ 2021
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**OSMOTİK STRES KOŞULLARINDA ALFA LİPOİK ASİT SİNYALİZASYONU İLE
ANTİOKSİDAN MEKANİZMA ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sebahat Duygu GÜMRÜKÇÜ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 23 / 06 / 2021

Tezin Savunma Tarihi : 12 / 07 / 2021

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Rabiye TERZİ

Trabzon 2021

ÖNSÖZ

“Osmotik Stres Koşullarında Alfa Lipoik Asit Sinyalizasyonu İle Antioksidan Mekanizma Arasındaki İlişkinin Araştırılması” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim süresince çalışmalarımı yönlendiren, deneyim, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli danışmanım Prof. Dr. Rabiye TERZİ’ye, çalışmam boyunca değerli fikirlerini ve yardımlarını benden esirgemeyen ve imkânları doğrultusunda her konuda yanımda bulunan sayın Prof. Dr. Asim KADIOĞLU, Prof. Dr. Neslihan SARUHAN GÜLER ve Doç. Dr. Aykut SAĞLAM’a teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımını ve desteğini esirgemeyen, her zaman sabırla bana yardımcı olan Öğr. Gör. Dr. Cansu ALTUNTAŞ ve Arş. Gör. Selda DURMUŞOĞLU’na teşekkür ederim. Ayrıca manevi desteklerinden dolayı Ali ŞİMŞEK’e çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde üzerimde emekleri büyük olan ve desteklerini her zaman hissettiğim sevgili annem Serpil GÜMRÜKÇÜ ve babam Adnan GÜMRÜKÇÜ’ye, kardeşlerim Nurşah, Ezgi ve Çağın’a en içten duygularıyla teşekkür ederim. Bu çalışma 119Z699 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

Sebahat Duygu GÜMRÜKÇÜ

Trabzon, 2021

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Osmotik Stres Koşullarında Alfa Lipoik Asit Sinyalizasyonu İle Antioksidan Mekanizma Arasındaki İlişkinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Rabiye TERZİ’nin sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 12/07/2021

Sebahat Duygu GÜMRÜKÇÜ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Çevresel Stres Faktörleri.....	3
1.2.1. Osmotik Stres.....	4
1.2.2. Bitkilerin Osmotik Strese Cevapları	5
1.2.3. Osmotik Stresin Reaktif Oksijen Türleri Üzerine Etkileri.....	6
1.3. Reaktif Oksijen Türleri	7
1.3.1. Süperoksit Radikali (O_2^-).....	7
1.3.2. Singlet Oksijen (1O_2).....	8
1.3.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	8
1.3.4. Hidroksil Radikali ($OH\bullet$)	9
1.4. Antioksidan Sistem	10
1.4.1. Enzimatik Antioksidanlar	11
1.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	11
1.4.1.2. Katalaz (CAT).....	11
1.4.1.3. Askorbat Peroksidaz (APX).....	12
1.4.1.4. Monodehidroaskorbat Redüktaz (MDHAR).....	13
1.4.1.5. Dehidroaskorbat Redüktaz (DHAR).....	13
1.4.1.6. Glutasyon Redüktaz (GR)	14
1.4.1.7. Glutasyon Peroksidaz (GPX)	14
1.4.1.8. Abiyotik Streslerin Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisi.....	15
1.4.2. Enzimatik Olmayan Bazı Antioksidanlar	16
1.4.2.1. Askorbat (L-Askorbik Asit, ASC)	16

1.4.2.2.	Tokoferoller	17
1.4.2.3.	Glutasyon (GSH).....	18
1.4.2.4.	Karotenoidler	19
1.4.2.5.	Fenolik Bileşikler.....	19
1.5.	Çevresel Streslerin Antioksidan Maddeler Üzerine Etkisi	20
1.6.	Çevresel Stres Sinyal Bileşikleri.....	20
1.7.	Alfa Lipoik Asit	24
1.8.	Mısır (<i>Zea mays L.</i>) Kökeni, Tarihçesi ve Coğrafi Dağılımı.....	25
1.8.1.	Sınıflandırılması.....	25
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	27
2.1.	Deney Materyali ve Hoagland Besin Çözeltisinin Hazırlanması	27
2.2.	Bitkilerin Büyütülmesi, Deney Dizaynı ve ALA Uygulaması	28
2.3.	ALA Uygulamasının Reaktif Oksijen Türleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	31
2.3.1.	Hidrojen Peroksit Seviyesinin Belirlenmesi	31
2.3.2.	Süperoksit Radikalinin Belirlenmesi	31
2.3.3.	Alfa Lipoik Asit Tayini.....	32
2.4.	ALA Uygulamasının Antioksidan Bileşikler Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	32
2.4.1.	Antioksidan Bileşiklerin Tayini.....	32
2.4.1.1.	Glutasyon Tayini	32
2.4.1.2.	Askorbat Tayini	32
2.5.	ALA Uygulamasının Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	33
2.5.1.	Antioksidan Enzim Analizleri.....	33
2.5.1.1.	Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	33
2.5.1.2.	Katalaz Aktivitesi.....	33
2.5.1.3.	Askorbat Peroksidaz Aktivitesi.....	34
2.5.1.4.	Glutasyon Redüktaz Aktivitesi	34
2.5.1.5.	Monodehidroaskorbat Redüktaz Aktivitesi	34
2.5.1.6.	Dehidroaskorbat Redüktaz Aktivitesi	34
2.6.	Protein Tayini.....	35
2.7.	RNA İzolasyonu.....	35
2.8.	cDNA (Komplementer DNA) Sentezi	36
2.9.	Real Time PCR Reaksiyonu	36

2.10.	İstatistiki Analizler.....	37
3.	BULGULAR.....	38
3.1.	Reaktif Oksijen Türlerindeki Değişimler	40
3.1.1.	Hidrojen Peroksit Seviyesi.....	40
3.1.2.	Süperoksit İçeriği	41
3.1.3.	Alfa Lipoik Asit Miktarı	42
3.2.	Antioksidan Bileşiklerdeki Değişimler.....	43
3.2.1.	Glutasyon İçeriği	43
3.2.2.	Askorbat İçeriği	44
3.3.	Antioksidan Enzim Aktivitelerindeki Değişimler	45
3.3.1.	Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	45
3.3.2.	Katalaz Aktivitesi	46
3.3.3.	Askorbat Peroksidaz Aktivitesi.....	47
3.3.4.	Glutasyon Redüktaz Aktivitesi.....	48
3.3.5.	Monodehidroaskorbat Redüktaz Aktivitesi	49
3.3.6.	Dehidroaskorbat Redüktaz Aktivitesi	50
3.4.	Antioksidan Gen İfadelerindeki Değişimler	51
3.4.1.	<i>SOD</i> Gen İfadesi	51
3.4.2.	<i>APX1</i> Gen İfadesi.....	52
3.4.3.	<i>CAT1</i> Gen İfadesi.....	53
4.	TARTIŞMA	54
5.	SONUÇLAR.....	59
6.	ÖNERİLER.....	61
7.	KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ		

ÖZET

OSMOTİK STRES KOŞULLARINDA ALFA LİPOİK ASİT SİNYALİZASYONU İLE
ANTIÖKSİDAN MEKANİZMA ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Sebahat Duygu GÜMRÜKÇÜ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Rabiye TERZİ
2021, 78 Sayfa

Bu çalışmada, osmotik strese maruz bırakılan mısır fidelerinde alfa lipoik asit (ALA) sinyalizasyonu ile reaktif oksijen türleri (ROT) ve antioksidan bileşikler arasındaki etkileşimlerin belirlenmesi amaçlandı. Strese maruz kalan fidelerde, ALA muamelesinin içsel ALA içeriğini, glutatyon (GSH) ve askorbat (ASC) miktarlarını ve antioksidan enzim aktiviteleri ile antioksidan enzimleri kodlayan bazı genlerin ifade seviyelerini artırdığı, ROT seviyesini ise azalttığı bulundu. Ayrıca oksijen radikal temizleyicisi DMTU, GSH biyosentez inhibitörü BSO ve ASC biyosentez inhibitörü AF aracılığıyla sırasıyla ROT, GSH ve ASC seviyeleri azaltıldığında ALA içeriğinin azaldığı belirlendi. Radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulanmış fideler ALA ile muamele edildiğinde içsel ALA seviyesi artarken, GSH ve ASC miktarı, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve ASC-GSH döngüsü enzimlerinin aktivitelerinin arttığı, ROT seviyesinin azaldığı görüldü. Enzim aktivitelerindeki değişimler ile *SOD* ve *ASKORBAT PEROKSİDAZI* gen ifadesindeki değişimlerin benzer olduğu saptandı. Radikal temizleyicisi veya inhibitörler aracılığıyla ROT ve GSH azaltıldığında ALA'nın *CAT1* gen ifadesinin nispi seviyesini azalttığı belirlendi.

Elde edilen veriler ışığında, ALA'nın sinyal rol oynayan ROT'lar ya da GSH ve ASC gibi antioksidan bileşikler ile etkileşerek antioksidan sistemi uyarabileceği ve böylece ASC-GSH döngüsüne dahil olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Alfa lipoik asit, Osmotik stres, Antioksidan sistem, Askorbat, Glutatyon, Reaktif oksijen türleri, Sinyal iletimi

Master Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF INTERACTION BETWEEN ALPHA LIPOIC ACID SIGNALIZATION AND ANTIOXIDANT MECHANISM UNDER OSMOTIC STRESS CONDITIONS

Sebahat Duygu GÜMRÜKÇÜ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Rabiye TERZİ
2021, 78 Pages

In the current study, it has been aimed to determine the interactions between alpha lipoic acid (ALA) signaling and reactive oxygen species (ROS) and antioxidant compounds in maize seedlings exposed to osmotic stress. In the seedlings exposed to the stress, ALA treatment was found to increase the endogenous ALA content, glutathione (GSH) and ascorbate (ASC) amounts and antioxidant enzyme activities and the expression levels of some genes coding the enzymes, while decreasing the ROS level. Also, it was observed that ALA content decreased when ROS, GSH and ASC levels were decreased by oxygen radical scavenger DMTU, GSH biyosynthesis inhibitör BSO and ASC biyosynthesis inhibitör AF, respectively. However, GSH and ASC amounts, activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ASC-GSH cycle enzymes increased but ROS level decreased when endogenous ALA content enhanced by exogenous ALA treatment in radical scavenger or inhibitör applied seedlings. Changes in enzyme activities were found to be compatible with findings of *SOD* and *ASCORBATE PEROXIDASE1* gene expression. It was determined that ALA decreased the *CAT1* gene expression level when ROS and GSH were reduced by inhibitors.

In the light of the findings, it was concluded that ALA can stimulate the antioxidant system by ROS signaling or by interacting with antioxidant compounds such as GSH and ASC and thus it may be involved in the ASC-GSH cycle.

Key Words: Alpha lipoic acid, Osmotic stress, Antioxidant system, Ascorbate, Glutathione, Reactive oxygen species, Signal transduction

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Bitkilerin osmotik strese cevapları	5
Şekil 2. ROT'un çift yönlü etkisi.....	7
Şekil 3. Dioksijendeki ardışık indirgenme reaktif oksijen türlerini verir	9
Şekil 4. Reaktif oksijen türleri antioksidan savunma sistemlerinin üretimine neden olur ve böylece hücre ölümü engellenir.....	10
Şekil 5. Askorbat-Glutatyon döngüsü	12
Şekil 6. ALA'nın kimyasal yapısı.....	24
Şekil 7. Hoagland besin çözeltisi büyütülen mısır fideleri.....	38
Şekil 8. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulaması yapılan fideler.....	39
Şekil 9. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının H ₂ O ₂ içeriği üzerine etkisi.....	40
Şekil 10. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının süperoksit içeriği üzerine etkisi.	41
Şekil 11. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının ALA içeriği üzerine etkisi.....	42
Şekil 12. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının glutatyon içeriği üzerine etkisi	43
Şekil 13. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının askorbat içeriği üzerine etkisi.....	44
Şekil 14. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının SOD aktivitesi üzerine etkisi	45
Şekil 15. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının CAT aktivitesi üzerine etkisi.	46
Şekil 16. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının APX aktivitesi üzerine etkisi.	47
Şekil 17. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının GR aktivitesi üzerine etkisi.	48
Şekil 18. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının MDHAR aktivitesi üzerine etkisi.....	49
Şekil 19. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının DHAR aktivitesi üzerine etkisi.....	50
Şekil 20. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının SOD gen ifadesinin nispi seviyesi üzerine etkisi.	51
Şekil 21. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının APX1 gen ifadesinin nispi seviyesi üzerine etkisi.....	52
Şekil 22. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının CAT1 gen ifadesinin nispi seviyesi üzerine etkisi.....	53

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Reaktif oksijen türleri.....	6
Tablo 2. Mısırın sistematik sınıflandırılması.....	25
Tablo 3. Hoagland besin çözeltisinde (10X) kullanılan kimyasallar ve miktarları	27
Tablo 4. Hoagland besin çözeltisinde (10X) kullanılan Solüsyon A içeriği	27
Tablo 5. Hoagland besin çözeltisinde (1X) kullanılan Solüsyon C içeriği	28
Tablo 6. Real Time PCR reaksiyonunda kullanılan primer sekansları, ürün boyu ve Oligo ID.....	37

KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	: Absisik Asit
ACT	: Aktin
AF	: Akriflavin
ALA	: Alfa Lipoik Asit
AO	: Askorbat Oksidaz
APX	: Askorbat Peroksidaz
ASC	: Askorbat
BSA	: Bovin Serum Albumin
BSO	: Bütiyonin Sülfoksiminin
CAT	: Katalaz
CK	: Sitokinin
CO ₂	: Karbondioksit
Cr	: Krom
Cu ⁺	: Bakır
DHA	: Dehidroaskorbat
DHAR	: Dehidroaskorbat Redüktaz
DHLA	: Dihidrolipoik asit
DMTU	: Dimetiltiyüre
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Fe ²⁺	: Ferroz
GA	: Giberellik Asit
GPX	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
HO ₂ ⁻	: Hidroperoksil
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
H ₂ SO ₄	: Sülfirik Asit
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	: Potasyum Fosfat
KI	: Potasyum Iyodür
JA	: Jasmonik Asit

MBTH	: 3-metil-2-benzotiyozolinon
MDHAR	: Monodehidroaskorbat Redüktaz
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
NaCl	: Sodyum Klorür
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NaH ₂ PO ₄	: Mono Sodyum Fosfat
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum Fosfat
NBT	: Nitrotetrazolium Blue Chloride
OH [·]	: Hidroksil Radikali
O ₂	: Oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit Radikali
¹ O ₂	: Singlet Oksijen
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	: Polietilen Glikol
PS I	: Fotosistem I
PS II	: Fotosistem II
PVPP	: Polyvinilprolidon
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SA	: Salisilik Asit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
Zn	: Çinko

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Bitki verimliliğini ciddi şekilde sınırlayan faktörlerden biri kuraklıktır. Bu nedenle, tarımı yapılan bitkilerde kuraklık toleransının artırılması için başarılı stratejilere gereksinim duyulmaktadır. Strese toleranslı tarımsal bitkilerin üretilmesi geleneksel seleksiyon ve ıslah yöntemleri, modern moleküler biyoloji yaklaşımları veya kimyasal muamelelerle gerçekleştirilebilir. Bitki büyümesini uyaran antioksidanların, osmoprotektanların ve sinyal rol oynadığı bilinen bazı bileşiklerin kuraklık koşullarındaki bitkilere uygulanması stres hasarlarını iyileştirmek için etkili ve teknik olarak uygulanabilir yaklaşımlardır (Ashraf ve Foolad, 2007; He ve Gao, 2009).

Bitkiler abiyotik streslere karşı savunma mekanizmalarına sahiptirler. Redoks metabolizması ve bununla ilişkili sinyalleşme, abiyotik stres esnasındaki en önemli savunma mekanizmasıdır ve bitkilerin hayatta kalabilmesi için kararlı redoks durumu gereklidir. Bununla birlikte, redoks durumu reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı üretimi ve birikmesi sonucu oluşan oksidatif stres nedeniyle bozulabilir (Demidchic, 2015). Oksidatif stresin derecesi ROT seviyesi tarafından belirlenir ve ROT ile antioksidanlar arasındaki denge redoks durumunu korumak için esastır (You ve Chan, 2015).

ROT üzerine yapılan çalışmalarda, ROT'ların metabolik öneme sahip sinyallerin iletilmesinde rol oynayan önemli haberciler olduğu gösterilmiştir. Bitki gelişiminin düzenlenmesi ve bitkilerin olumsuz koşullarda hayatta kalması için önemli olan genlerin ROT aracılığıyla ifade edildiği kaydedilmiştir (You ve Chan, 2015). Bitkiler, ROT üretimini sınırlayan ve onları hücre ortamından uzaklaştıran karmaşık antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmiştir. ROT detoksifikasyonunda kritik rol oynayan başlıca enzimatik antioksidanlar askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) olup, oksidatif stresle mücadele etmek ve hücrel homeostazı korumak için birçok antioksidan enzimin aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Blokhina vd., 2003; Almeselmani vd., 2006). Ayrıca, ROT'u temizlemek için yüksek antioksidan kapasitenin korunması, bitkilerin çevresel strese toleransının artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Suzuki vd., 2011). Bitkiler antioksidan enzimlerin yanı sıra antioksidan aktiviteye sahip birçok düşük molekül ağırlıklı bileşik bakımından da zengindir. Antioksidan bileşikler, askorbat (ASC),

glutasyon (GSH), bazı amino asitler ve sakkaroz gibi bileşikleri, karotenoidler gibi fotosentezin düzenlenmesinde önemli rol oynayan pigmentleri ve flavonoidler gibi sekonder metabolitleri içerir. ASC ve GSH, peroksidazların H_2O_2 ile hızla reaksiyona girmelerini sağladığı ve oksitlenmiş formları yüksek kapasiteli indirgemelerle yeniden üretildiği için bitkilerde bulunan antioksidan moleküller arasında kilit aktörlerdir. Bu özellikler ASC ve GSH'ı diğer antioksidanlardan ayırır, çünkü tekrarlanan redoks döngüsünün ve genel hücre redoks durumunun etkili bir şekilde düzenlenmesini sağlarlar (Soares vd., 2019). İlave olarak, antioksidanların indirgenmiş ve oksitlenmiş formlarının dengesindeki değişiklikler, ortamdaki değişiklikler için bir sensör olarak kullanılabilir. Abiyotik stres koşullarında, bazı antioksidanların aktiviteleri bozulur. Bu gibi koşullarda, diğer antioksidanların aktivitesi düzenlenir. Bu nedenle, ROT üretimi ve antioksidan aktivite arasındaki denge önemlidir (Choudhury vd., 2013). Ayrıca, ROT ve antioksidanların redoks durumunu sürdürmedeki rolü yoğun bir şekilde çalışılmıştır ancak yine de bu alanda açık sorular bulunmaktadır. Bu nedenle, hücre büyümesi, farklılaşması ve bölünmesi sırasındaki redoks değişikliklerinin ve ayrıca ROT ve antioksidanların stres koşullarında sinyal bileşiklerle etkileşimlerinin detaylı olarak incelenmesi strese maruz kalan bitkilerin redoks mekanizmasının anlaşılması için oldukça önemlidir. Strese karşı toleransı artırmak için antioksidan savunma sisteminin uyarılmasının ve düzenlenmesinin gerekli olduğu fikrini destekleyen çok sayıda araştırma sonucu vardır (Mittler, 2002; Das ve Roychoudhury, 2014; Caverzan vd., 2016).

Bitkilerin redoks durumunun düzenlenmesinde rolü olduğu ileri sürülen antioksidan bileşiklerden biri alfa lipoik asittir (ALA, tioktik asit, 1,2 ditiyolan-3 pentanoik asit) (Terzi vd., 2018). Sinyal bir bileşik olan ALA'nın diğer antioksidan maddelerden farklı olarak hem indirgenmiş (dihidrolipoik asit, DHLA) hem de yükseltgenmiş formda (alfa lipoik asit) güçlü antioksidan özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Navarı-Izzo ve Quartacci, 2001). Bitkisel materyaller üzerinde yapılan çalışmalarda yükseltgenmiş ve indirgenmiş ALA formlarının abiyotik stresler altındaki buğday ve arpa sürgünlerinde azaldığı bildirilmiştir (D'Amico vd., 2004; Perez-Lopez vd., 2010). Strese maruz kalan bitkilerde ALA'nın diğer antioksidanların yenilenmesindeki rolü bazı çalışmalarla belirlenmiştir (Sgherri vd., 2002; D'Amico vd., 2004). Dıştan uygulanan ALA'nın bitki büyümesi üzerine etkileri konusunda yapılan çalışmalar ise oldukça sınırlıdır. Örneğin, ALA muamelesinin protein profilini etkilediği (Yıldız vd., 2015), fotosentezi ve içsel ALA miktarını uyardığı (Sezgin vd., 2019), tuz stresi koşullarındaki buğday fidelerinde iyon dengesini, osmo-regülatör seviyesini ve antioksidan sistemi uyararak oksidatif hasarı hafiflettiği (Görcek ve Erdal, 2015) rapor edilmiştir.

Osmotik koşullarda dıştan uygulanan ALA'nın bazı antioksidan enzim aktivitelerini uyardığı belirlenmiş ve ALA'nın antioksidan enzimler üzerine etkisinin H_2O_2 sinyalizasyonu ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Terzi vd., 2018). Aynı çalışmada ALA'nın ROT seviyesini azalttığı, membran hasarı ve kuru ağırlık gibi stres tolerans parametrelerinde iyileşme sağladığı ve strese karşı potansiyel sinyal molekül olabileceği ifade edilmiştir. Bununla beraber “antioksidan özelliğe sahip sinyal bileşik olan ALA'nın antioksidan sistemi uyarması ASC ve GSH gibi antioksidan sinyal bileşiklerle mi yoksa H_2O_2 veya süperoksit gibi ROT'lar aracılığıyla mı gerçekleşmektedir?” sorusuna cevap bulunamamıştır. Hücrel redoks sinyalizasyonunda ALA'nın ROT'ları nasıl etkilediği ve ALA ile ROT'lar arasındaki olası karşılıklı etkileşimin nasıl gerçekleştiği araştırılmamıştır. Ayrıca, ALA sinyalizasyonu ile ROT ve antioksidan maddeler arasındaki etkileşim de bilinmemektedir.

Bu çalışmada, ALA sinyalizasyonu ile ROT ve antioksidan bileşikler (ASC ve GSH) arasındaki etkileşimin belirlenmesi ve bu etkileşimin antioksidan sistemin bileşenleri üzerine etkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Mevcut çalışmada, ALA'nın sinyal rol oynayan ROT'lar ile etkileşerek ya da ASC ve GSH gibi yine sinyal özelliğe sahip antioksidan bileşikler aracılığıyla antioksidan sistemi uyarabileceği ve böylece ASC-GSH döngüsüne dahil olabileceği hipotez olarak düşünülmektedir. Çalışmada belirtilen amaca ulaşmak ve hipotezi test etmek için H_2O_2 ve süperoksit temizleyicisi (DMTU, dimetiltiyoüre) ile ASC ve GSH biyosentez inhibitörleri (AF; akriflavin ve BSO; bütiyonin sülfoksiminin) kullanılmıştır. Ayrıca SOD, CAT, APX, GR, DHAR ve MDHAR enzim aktivitelerindeki değişimler ile ASC ve GSH miktarları, H_2O_2 ve süperoksit içerikleri belirlenmiştir.

1.2. Çevresel Stres Faktörleri

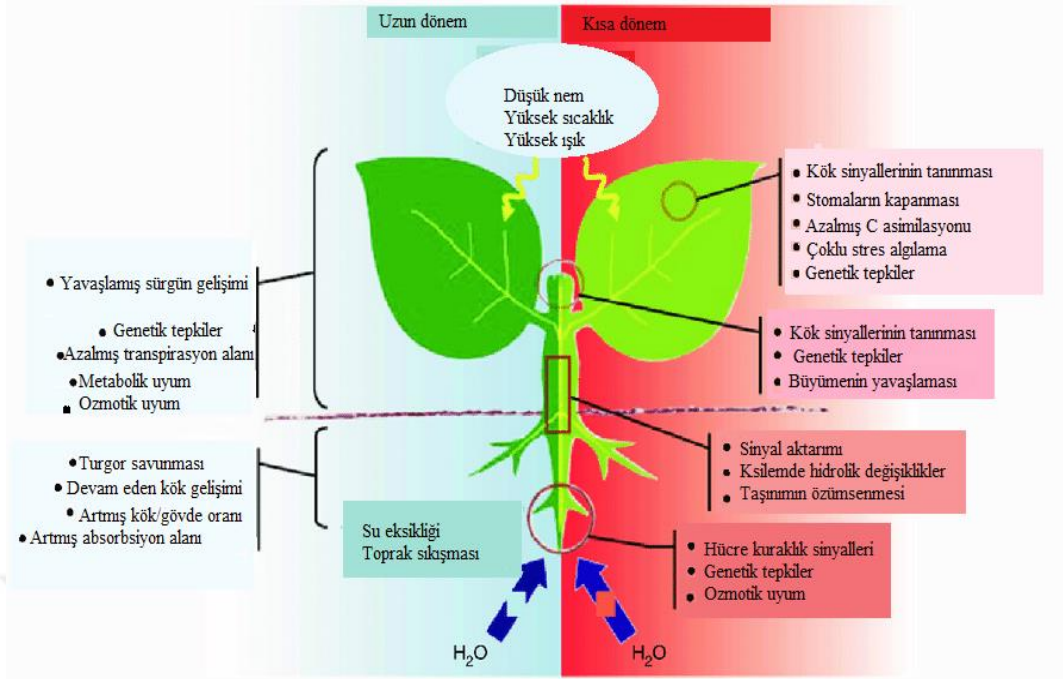
Bitkiler aktif hareket edebilen canlılar olmadığından çevreden gelebilecek negatif etkilere direkt olarak maruz kalmaktadır (Levitt, 1980). Bir bitkinin bütün kalıtsal potansiyelini başarılı bir şekilde kullanabilmesini önleyen herhangi bir çevre koşulu stres olarak tanımlanmaktadır (Taiz vd., 2015). Bitkilerin yaşamlarını olumsuz yönde etkileyen stres faktörleri biyotik (bakteri, virüs vb.) ve abiyotik (kuraklık, tuzluluk, ışık, radyasyon vb.) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Levitt, 1980).

Dünya genelinde abiyotik streslerin bitkilerde büyüme ve gelişmeyi inhibe ettiği bilinmektedir. Tarımsal üretimde verimliliği kısıtlayıcı faktörlerin başında su eksikliği gelmektedir (Farooq vd., 2009). Tuzluluk, radyasyon, ağır metal stresi gibi stres faktörleri de ürünlerin verimini kısıtlamaktadır (Lawlor, 2002).

1.2.1. Osmotik Stres

Kuraklık genel olarak yağışın az olmasından kaynaklanmaktadır. Yağış miktarı yeterli olsa bile düzensiz dağılımı bitkilerin büyüme ve gelişmesini olumsuz olarak etkilemektedir (Özer vd., 1997). Su eksikliği bazen birkaç saatte giderilebilir fakat bazı durumlarda günlerce hatta aylarca sürebilir. Bu durumda osmotik strese verilen cevaplar da farklılık göstermektedir (Şekil 1). Bütün bitkiler su kıtlığına aynı şekilde tepki göstermemektedir. Bitkiler arasındaki bu farklılıklar metabolik değişikliklerle ilgilidir (Kayabaşı, 2011). Su eksikliği ile karşılaşan bitkiler öncelikli olarak stomalarını kapatabilmektedir (Cornic ve Massacci, 1996). Kuruma, çok daha ciddi hasarlara yol açan, geri dönüşümü olmayan yüksek oranda su kaybı olarak bilinmektedir (Smirnoff, 1993; Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005). Osmotik stres hücre büyümesini ciddi şekilde engellemektedir. Hücrelerde büyüme olayının meydana gelmesi için turgora ihtiyaç vardır. Su eksikliğunun etkisiyle hücrelerdeki turgor azalmakta ve hücre büyümesi yavaşlamaktadır. Bitkinin kökleri, büyüme engellemelerine karşı daha fazla duyarlıdır ve dolayısıyla su miktarının sınırlı olduğu yerlerde kök:sürgün oranının artması muhtemeldir (Wu ve Cosgrove, 2000). Su eksikliğine bağlı olarak ABA ve prolin birikimi artar, transpirasyon ve fotosentez azalır. Fotosentezin azalması ürünlerde verim kaybına sebep olmaktadır (Komatsu vd., 2011). Osmotik strese verilen en belirgin tepkilerden biri de yaprak kıvrılmasıdır (Begg, 1980).

Bitkilerin osmotik strese hassasiyeti stresin şiddetine ve süresine, diğer abiyotik streslerle olan ilişkisine göre değişebilir (Demirevska vd., 2009). Kuraklık ve tuzluluk yakın ilişkili abiyotik streslerdir ve bu stres faktörleri topraktaki su potansiyelinin ciddi derecede azalmasına neden olmaktadır (Jones, 1986).



Şekil 1. Bitkilerin osmotik strese cevapları (Chaves vd., 2003'den düzenlenerek)

1.2.2. Bitkilerin Osmotik Strese Cevapları

Bitkiler su eksikliğine maruz kalmaları durumunda anatomik, fizyolojik, morfolojik ve moleküler tepki vermektedirler. Kuraklıktan kaçınma ve tolerans gibi stratejiler geliştirerek hayatta kalmaya çalışmaktadırlar. Kuraklıktan kaçınan bitkiler mevcut suyu dokularında saklama yeteneğine sahiptirler. Sukkulent bitkiler stresten kaçınan bitkilere örnek olarak verilmektedir. Kuraklığa karşı toleransı olan bitkiler ise ortamda su yeterli olmasa dahi normal işlevlerine devam edebilmektedir (Levitt, 1980). Ek olarak, fotosentez reaksiyonları da düzenlenmektedir (Ludlow ve Muchow, 1990).

Su kıtlığına maruz kalan bitkilerin hayatta kalabilmek için başvurdukları bilinen en iyi adaptasyon mekanizmalarından biri osmolit bileşiklerinin üretimidir. Osmoprotektanlar (Koruyucu moleküller) olarak bilinen osmolitler, düşük moleküler ağırlığa sahip, kolayca çözünebilen bileşiklerdir (Farooq vd., 2009). Osmoprotektanlar membranların ve proteinlerin dengelenmesini sağlayarak hücrelerin osmotik potansiyellerinin düzenlenmesine yani osmotik ayarlamaya yardımcı olmaktadır. Osmotik ayarlama ile birlikte büyüme ve gelişme düzenlenir, organeller normal fonksiyonlarında çalışır (Wani vd., 2013). Prolin ve glisin gibi osmolitlerin konsantrasyonlarının artması osmotik strese verilen fizyolojik tepkilerden bazılarıdır (Matysik vd., 2002). Olumsuz koşullar altında

prolinin artması hücrenin yapısının korunmasına katkı sağlamaktadır (Mani vd., 2002). Stres esnasında biriken osmolitler aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin temizlenmesine de karışabilmektedir (Smirnov ve Cumbes, 1989).

Su kıtlığı koşullarında hücrelerde üretilen ROT'ları da içeren serbest radikaller bitki hücrelerinde çeşitli hasarlar meydana getirebilmektedir (Nair vd., 2008). Serbest radikallerden oksijen türevli olanlar reaktif oksijen türleri olarak adlandırılmaktadır (Tablo 1) (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Valko vd., 2007).

Tablo 1. Reaktif oksijen türleri (Karabulut ve Gülay, 2016).

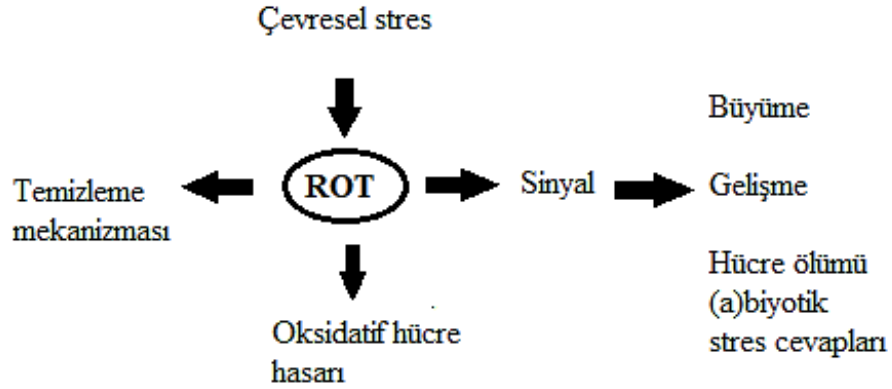
Radikaller	Nonradikaller
Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil ($OH\cdot$)	Hipokloröz asit ($HOCl$)
Peroksil ($ROO\cdot$)	Hipobromöz asit ($HOBr$)
Alkoksil ($RO\cdot$)	Singlet oksijen (1O_2)
Hidroperoksil ($HO_2\cdot$)	Ozon (O_3)
Lipid peroksil ($LOO\cdot$)	

Serbest radikallerin kısa ömürlü oldukları bilinmektedir. Serbest radikaller son yörüngelerinde eşlenmemiş atom veya molekül bulundurduklarından dolayı son derece kararsızdırlar. Kararlı yapıya sahip olmak için diğer moleküllerle etkileşime geçerler (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Valko vd., 2007).

1.2.3. Osmotik Stresin Reaktif Oksijen Türleri Üzerine Etkileri

Oksijen canlı organizmalar için en temel elementlerden biridir. Hücreler yaşamsal fonksiyonlarını yerine getirebilmek için enerji üretirken oksijen tüketmektedir. Tüketilen bu oksijenin yaklaşık olarak % 2'si reaktif oksijen türlerine dönüşmektedir (Muller vd., 2004). ROT'ların aşırı miktarda birikmesi bitkilerde ciddi zararlara neden olmaktadır (Breusegem vd., 2001). Ancak strese karşı sinyal molekül olarak davranarak bitkiye yarar sağladığı durumlar da bulunmaktadır (Şekil 2) (Lombardi ve Sebastiani, 2005). Su eksikliğine bağlı

olarak çeşitli ROT'lar üretilmektedir (Parida ve Das, 2005). Bitkilerde, mitokondri ve kloroplast ROT'ların esas üretim yerleridir. Bitkiler osmotik stres koşullarında ROT'ları bulundukları ortamdan uzaklaştırmak için antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmiştir (Gill vd., 2011).



Şekil 2. ROT'un çift yönlü etkisi (Lombardi ve Sebastiani, 2005).

Kuraklık, yüksek sıcaklık ve tuzluluk gibi pek çok abiyotik stres faktörleri ROT'ların üretilmesine neden olmaktadır. Buna bağlı olarak hücredeki birçok makromoleküller hasar görebilmektedir (Wang vd., 2014). Örneğin yüksek sıcaklık stresine maruz kalan bitkiler üzerine yapılan çalışmalarda ROT seviyesinin ve membran hasarının arttığı ve böylece bitkide geri dönüşü olmayan hasarlar meydana geldiği rapor edilmiştir (Sinsawat vd., 2004; Savicka ve Škute 2010)

1.3. Reaktif Oksijen Türleri

1.3.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)

Moleküler oksijenin bir elektron transferi sonucu indirgenmesiyle süperoksit radikali oluşur. O_2^- genellikle mitokondride üretilir. pH değeri düşük olduğunda O_2^- ya da hidroperoksil radikali (HO_2^-) şeklinde bulunabilir (Bielski vd., 1966). HO_2^- , hücre zarında bulunan fosfolipid tabakaya kolay bir şekilde girebildiğinden dolayı önemlidir (Phaniendra vd., 2015).

Süperoksit radikali ciddi hasarlara neden olacak kadar reaktif değildir (Valko vd., 2004). $O_2^{\cdot-}$ 'nin yarı ömrü 1-1000 μs arasındadır (Kavdia, 2006).

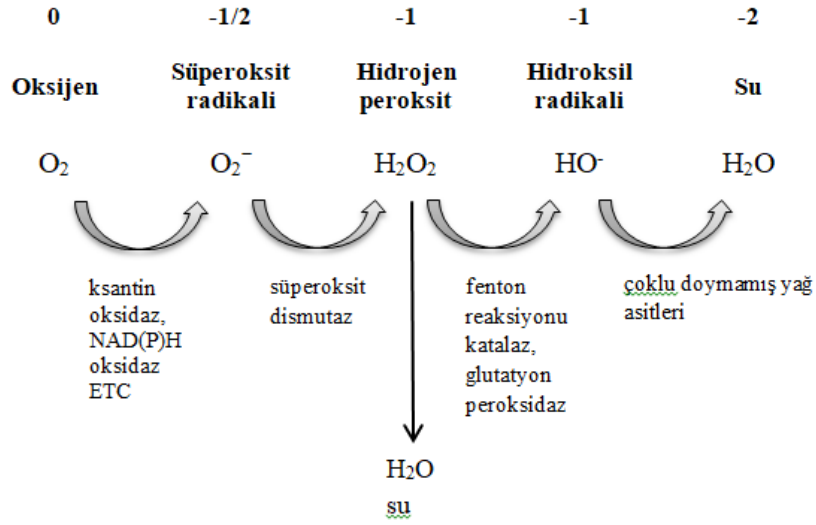
1.3.2. Singlet Oksijen (1O_2)

Singlet oksijen (1O_2), O_2 'ye elektron transferi sonucu meydana gelmediğinden dolayı ayırt edici bir reaktif oksijen türüdür (Clo vd., 2007). Singlet oksijen anten sisteminde klorofilin üçlü uyarılmış halleri ($^3Chl^*$) ile kloroplastlarda sentezlenir (Krieger Liskay vd., 2008).

Klorofiller ışığı yakalayarak fotosentezi gerçekleştirirken aynı zamanda hücre için zararlı olan singlet oksijen üretilir (Gorman ve Rodgers, 1992). Singlet oksijen, fotosistem I (PSI) ve fotosistem II (P II)'de hasarlara neden olmaktadır. Ayrıca, proteinler, nükleik asitler, lipitler gibi moleküllere de zarar vermektedir. Bitkiler karotenoidler ve tokoferoller gibi antioksidan maddeler ile singlet oksijene karşı kendilerini korumaktadırlar (Krieger Liskay vd., 2008).

1.3.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit (H_2O_2) hem indirgenme hem de yükseltgenme özelliğine sahip bir reaktif oksijen türüdür. Mitokondri ve kloroplastlarda devamlı olarak üretildiği için bitkilerde en çok bulunan ROT'lardan biridir ve diğer türlere göre daha karardır. Bununla beraber Fenton reaksiyonu aracılığıyla çok daha toksik olan hidroksil radikaline dönüştürülebilir (Şekil 3) (Bienert vd., 2006).

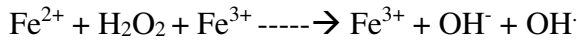
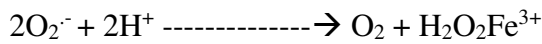
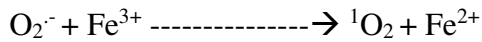


Şekil 3. Dioksijendeki ardışık indirgenme reaktif oksijen türlerini verir (Bienert vd., 2006)

H_2O_2 'in yarı ömrü 1 ms'dir (Reth, 2002). H_2O_2 stomaların kapanması, fotosentetik reaksiyonlar, fitoaleksinin üretimi gibi çeşitli fizyolojik olaylarda düzenleyici olarak görev almaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda ise bitkiler için oldukça tehlikelidir ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Gechev ve Hille, 2005).

1.3.4. Hidroksil Radikali ($OH^\bullet$)

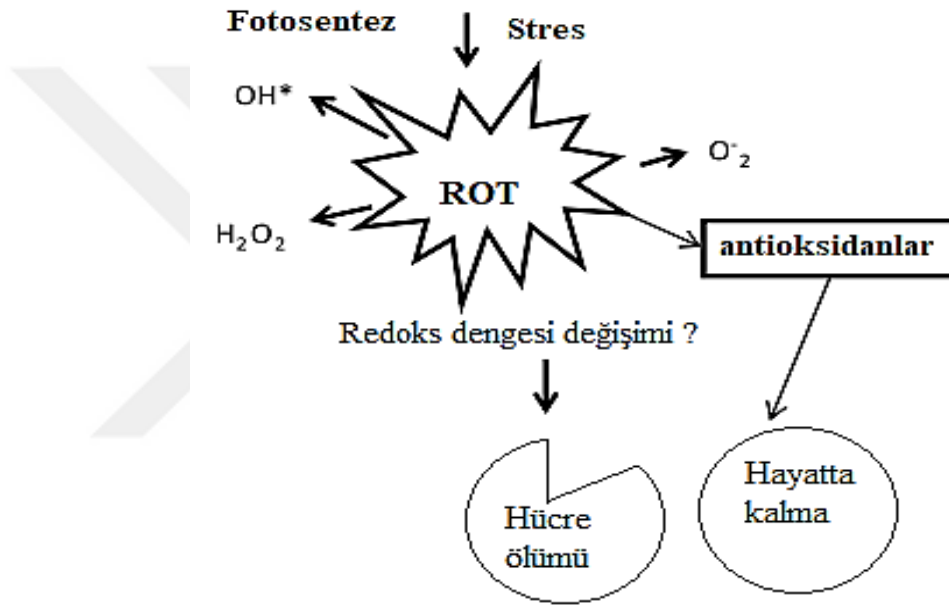
Hidrojen peroksidin indirgenmesi ile hidroksil radikali üretilir. Bu reaksiyon Fenton reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Reaksiyonda Fe^{2+} , Cu^+ , Zn , Cr gibi geçiş elementleri rol oynamaktadır (Fenton, 1894).



Hidroksil radikali reaktif oksijen türleri içerisinde en reaktif olanıdır ve son derece toksiktir ve hücrelerin ölümüne neden olmaktadır. Yarılma ömrü yaklaşık 9-10 saniyedir (Ayala vd., 2014).

1.4. Antioksidan Sistem

Oksidatif stres, ROT birikimi ile meydana gelen bir stres çeşididir. Bu stres faktörünün, yüksek konsantrasyonlarda hücresel bileşenler için zararlı etkileri bulunmaktadır (McCord, 2000). Bitkiler hem ROT oluşumunu kısıtlayan hem de ROT'ların temizlenmesini sağlayan antioksidan sistemlere sahiptir ve bu şekilde hücre ölümü de engellenmektedir (Şekil 4) (Mittler vd., 2004).



Şekil 4. Reaktif oksijen türleri antioksidan savunma sistemlerinin üretimine neden olur ve böylece hücre ölümü engellenir (Jaspers ve Kangasjärvi, 2010).

1.4.1. Enzimatik Antioksidanlar

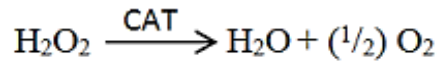
1.4.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz enzimi, süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve oksijene dönüşmesini sağlayan bir metaloenzimdir (Scandalios, 1993). SOD enziminin üç farklı formu bulunmaktadır. Bu formlar merkezde bulunan metallere göre Fe-SOD, Mn-SOD ve Cu/ZnSOD olarak isimlendirilmektedir (Mittler, 2002). SOD'un yukarı düzenlenmesi (up-regüle) ile bitkilerin oksidatif strese karşı korunması sağlanmaktadır (Boguszevska vd., 2010).



1.4.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz peroksizomlarda bulunan enzimatik antioksidanlardan biridir. CAT molekülü, çok kısa sürede yaklaşık olarak 6 milyon H_2O_2 'i su ve oksijene dönüştürebilir (Lee ve An, 2005). Böylece H_2O_2 'nin hücrelerdeki olumsuz etkileri azaltılmış olur (Shim vd., 2003).

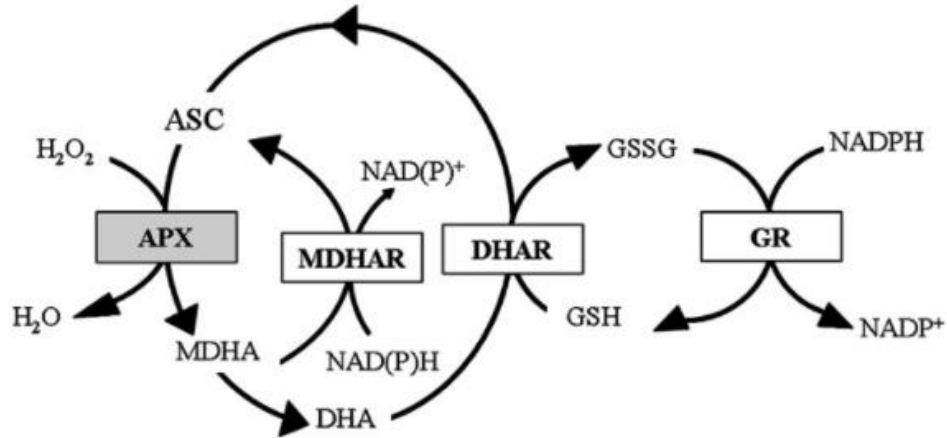
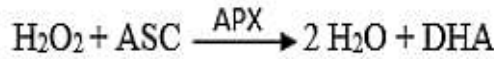


Bitkiler çoklu katalaz izoenzim formlarına sahiptir. Örneğin hint fasulyesinde iki, *Arabidopsis*'te ise altı tane katalaz izoenzimi rapor edilmiştir. Katalaz, H_2O_2 'yi doğrudan değiştirebilir veya metanol, etanol, formamid ve formik asit gibi substratları okside eder (Ahmad vd., 2010). Bitki katalazları üç sınıfa ayrılabilir. Birinci sınıf katalazlar fotosentetik dokularda fazla bulunur ve fotorespirasyon esnasında üretilen H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasına

dahil olurlar. İkinci sınıf katalazlar vasküler dokularda fazlaca üretilir ve lignifikasyonda önemli bir rol oynayabilirler. Bunların gerçek biyolojik rolleri tam olarak bilinmemektedir. İkinci sınıf katalazlar hastalıktaki gelişim ve dirençle ilgili olarak çokça çalışılmış ve salisilik asit ile ilgili olduğu belirlenmiştir. Üçüncü sınıf katalazlar ise tohum ve genç bitkilerde bolca bulunur ve aktiviteleri gliksizomlardaki gliksilat döngüsünde yağ asitlerinin degradasyonu esnasında üretilen aşırı H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasıyla bağlantılıdır. Katalaz aktivitesindeki artışın muhtemelen H_2O_2 'nin toksik seviyesini azaltarak doku metabolizması ile ilgili hasarların üstesinden gelmeye yardımcı olan adaptif bir özellik olduğu düşünülmektedir (Ahmad vd., 2010).

1.4.1.3. Askorbat Peroksidaz (APX)

Bitkilerde H_2O_2 'nin süpürülmesinde en etkili enzimlerden biri askorbat peroksidaz (APX)'dir. APX, su-su ve askorbat-glutatyon döngülerinde (Şekil 5) H_2O_2 'nin temizlenmesinde yer alır ve elektron vericisi olarak askorbatı kullanır (Ahmad vd., 2010). APX'in farklı izoformları kloroplast, sitozol ve mikrozomlarda aktiftir (Jaleel vd., 2009). CAT ile karşılaştırıldığında bağlanma gücünün daha yüksek olduğu görülmektedir (Noctor ve Foyer, 1998).



Şekil 5. Askorbat-Glutatyon döngüsü

Askorbat-glutasyon döngüsünde APX, askorbatı monodehidroaskorbata (MDHA) oksitleyerek H_2O_2 'yi suya indirger. Bu daha sonra MDHA redüktaz enzimi aracılığıyla askorbata dönüştürülür. Böylece iki MDHA molekülü, enzimatik olmayan bir yan ürün olarak eşit olmayan miktarlarda MDHA ve dehidroaskorbat (DHA)'ya dönüşür. Daha sonra DHA'nın indirgenmesi meydana gelir ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve GR'nin etkisiyle askorbat üretilir. DHAR GSH'yi glutasyon disülfide (GSSG) dönüştürebilir ve daha sonra GR tarafından tekrar GSH'ye indirgenir (Kusvuran vd., 2013; Shalata vd., 2001). Askorbik asit rejenerasyonu ihtiyacı ile sonuçlanan APX aktivitesi nedeniyle, bitkilerin koruyucu mekanizmalarının gerektiği gibi artabilmesi için aynı anda oksidatif savunma sisteminin diğer çeşitli bileşenlerinde bir artışa ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir (Jaleel vd., 2009).

1.4.1.4. Monodehidroaskorbat Redüktaz (MDHAR)

Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), NADPH aracılığıyla monodehidroaskorbattan (MDHA) askorbat (ASC)'ın yeniden üretilmesini sağlayan enzimdir. Hücrelerin mitokondri ve peroksizomlarında APX ile beraber bulunur. APX, H_2O_2 'i ortamdan uzaklaştırırken ASC'yi yükseltger (Mittler, 2002).



1.4.1.5. Dehidroaskorbat Redüktaz (DHAR)

Dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), dehidroaskorbatın (DHA) askorbata dönüşümünden sorumlu olan enzimdir. Bu dönüşümü sağlarken indirgenmiş glutasyonu (GSH) elektron vericisi olarak kullanır (Deutsch, 2000). Bitkilerin çeşitli dokularında, özellikle tohum ve köklerde bol miktarda bulunur (Anjum vd., 2014).



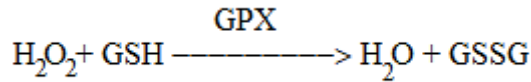
1.4.1.6. Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz (GR) birçok bitki dokularından saflaştırılmıştır ve oldukça korunmuş bir enzimdir (Ahmad vd., 2010). GR hücreler için en önemli enzimatik antioksidanlardan biridir. Bitkilerde genellikle kloroplastlarda bulunmakla beraber düşük miktarda mitokondri, sitozol ve peroksizomlarda da bulunduğu bilinmektedir (Edwards vd., 1990; Jimenez vd., 1997). İndirgenmiş formda GSH reaktif oksijen türlerinin ortamdaki uzaklaştırılmasına yardımcı olur. İki glutasyon molekülünün disülfid bağı oluşturmasıyla GSSG meydana gelir. GR elektron verici olarak NADPH'ı kullanır ve GSSG'yi GSH'a indirger (Das ve Roychoudhury, 2014). Transgenik bitkiler ile yapılan çalışmalara göre GR'nin oksidatif strese karşı savunmada önemli bir rolünün olduğu keşfedilmiştir (Yousuf vd., 2012).



1.4.1.7. Glutasyon Peroksidaz (GPX)

Glutasyon peroksidaz (GPX), oksidatif strese karşı bitkileri korumaktadır (Cnubben vd., 2001). GPX, hidrojen peroksidi suya parçalar. Esas olarak mitokondride bulunmasına rağmen az miktarda sitozolde de bulunduğu bilinmektedir (Fattman vd., 2003).



Glutasyon peroksidaz H_2O_2 'nin ve sitotoksik hidroperoksidlerin alkollere indirgenmesini katalizleyen çoklu izoenzimlerin ailesidir. Böylece H_2O_2 'yi temizlemesinin yanı sıra ROT aktivitesi yüzünden oluşan lipid peroksidasyon ürünlerinin temizlenmesine katkıda bulunurlar. Bitkilerdeki GPX selenyuma bağlı GPX (EC 1.11.1.19), selenyuma bağlı olmayan fosfolipid hidroperoksid GPX ve GPX aktivitesi sergileyen glutasyon transferaz olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır (Ahmad vd., 2010).

1.4.1.8. Abiyotik Streslerin Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisi

Bitkiler kuraklık, tuzluluk, aşırı sıcaklıklar, herbisit muamelesi ve mineral eksikliği gibi çevresel streslere maruz kaldıklarında, reaktif oksijen türlerinin üretimi ile antioksidanların söndürme aktivitesi arasındaki denge bozulur ve genellikle oksidatif hasara neden olur. Aktif oksijen türleri lipitlere, proteinlere ve nükleik asitlere oksidatif hasar vererek normal metabolizmayı bozabildiğinden, bitkiler onları bu sitotoksik etkilerden koruyan bir dizi antioksidan enzim bulundururlar. ROT seviyesini kontrol etmek ve stres koşullarında hücreleri korumak için bitki dokuları ROT süpürücü çeşitli enzimler içerir. ROT detoksifikasyonunda yer alan anahtar enzimler, yani SOD, CAT, POD ve Halliwell ve Asada döngüsünde (askorbat-glutasyon yolu) yer alan diğer enzimlerdir. Stres koşullarında, antioksidanlar bu enzimlerin neredeyse tamamının aktivitesini artırır (Ahmad vd., 2010).

Çevresel streslere maruz kalan birçok bitki türünde antioksidan enzim aktivitelerinin arttığı bildirilmiştir. Örneğin, tuz stresi altında bezelye, mısır ve çaydaki deneysel sonuçlar SOD aktivitesinde artışın olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde su altında kalmaya cevap olarak SOD aktivitesinin *Carrizo citrange*'de *Cleoptra mandarin*'den daha fazla olduğu ortaya konulmuştur. Tuz stresi koşullarındaki *Morus alba*, *Brassica napus* ve *Oryza sativa*'da SOD aktivitesinde belirgin artışlar görülmüştür. Kuraklık ve yüksek ışık koşullarının kombine etkilerinin SOD aktivitesini *Picea asperata*'da önemli derecede artırdığı gösterilmiştir. Yüksek tuzluluk koşulları altında kloroplast SOD, tilakoid bağlı SOD ve stroma SOD arttığı ve kloroplast SOD'daki artışın daha fazla olduğu kaydedilmiştir. Diğer taraftan, metil violojen, H₂O₂ ve ağır metal bakır, kadmiyum ve arsenik koşullarındaki transgenik uzun çayır bitkilerindeki yüksek seviyede *Cu/ZnSOD* ve *APX* gen transkriptlerinin stres toleransını artırdığı belirlenmiştir (Ahmad vd., 2010).

Cu/Zn-SOD'nin sitosolde aşırı ifadesinin ozona duyarlı tütün bitkisi çeşitlerinde ozon kaynaklı nekrozu 1,5 ila 6 kat aralığında azalttığı kaydedilmiştir (Ahmad vd., 2010). Sung vd. (2009), *Ulva fasciata*'da *Mn-SOD/Fe-SOD* gen ifadesinin oksidatif stres koşullarında arttığını rapor etmiştir. Abiyotik stres toleransı çok genli bir özellik olduğundan, *SOD* geninin ifade edilmesi stres direnci ile ilişkili diğer enzimleri kodlayan genlerin ifade zincirine yol açabilir (Ahmad vd., 2010). Abiyotik stresler yonca nodülleri, çay, pamuk ve tütünde katalaz enziminin ifadesinden sorumlu genlerin upregülasyonunu başlatabilir (Sekmen vd., 2007).

Sekmen vd. (2007) tuz stresine toleranslı *Plantago maritime*'nin tuza duyarlı *Plantago media* ile karşılaştırıldığında tuz konsantrasyonunun artmasıyla CAT aktivitesinin arttığını göstermiştir. Benzer şekilde, Ashraf ve Ali (2008) *B. napus*'ta tuz konsantrasyonunun artmasıyla CAT aktivitesinin arttığını belirlemiştir. Bazı bitkilerde CAT aktivitesindeki azalışlar ROT temizleme sistemleri olarak SOD ve askorbat-glutasyon döngüsündeki enzimlerin yanı sıra peroksidazın önemini yansıtır. Yine, yapılan bir çalışmada transgenik tütün bitkilerinin sitozolünde *Cu/Znsod* ve *apx* veya en azından *apx*'in eş zamanlı aşırı ifadesinin, su stresi koşullarının ürettiği hasarı bir dereceye kadar hafiflettiğini göstermiştir. Sitoplazmik *apx*'in aşırı ifadesinin tütün membranlarını su stresinden koruduğu rapor edilmiştir (Faize vd., 2011). *Arabidopsis*'te yapılan bir çalışmada APX'i kodlayan bir gen olan *AgAPX1* geninin aşırı ifade edilmesinin kuraklık direncini artırması, askorbat birikimini artırma, çeşitli antioksidan enzimlerin aktivitesini yükseltme ve stomatal kapanmanın uyarılmasıyla başarıldığı ileri sürülmüştür (Liu vd., 2019). Ayrıca askorbat-glutasyon döngüsündeki enzimlerin, CAT ve SOD aktivitelerindeki artışların *Amaranthus tricolor* tolerant varyetesinde ROT detoksifikasyonunda önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Sarker ve Oba, 2018). SOD izoenzimlerinde ve askorbat-glutasyon döngüsünün enzimlerindeki artışlar kuraklığa toleranslı *Cerasus humulis* fidelerinin kuraklıktan daha az hasar görmesine neden olduğu kaydedilmiştir. Enzim aktiviteleri ile uyumlu olarak sitosolik APX, DHAR'ın ifadelerindeki önemli artışlar su stresine maruz kalan toleranslı bitkilerde bu enzimlerin transkripsiyonel seviyede bir regülasyonun olduğuna işaret ettiği ileri sürülmüştür (Ren vd., 2016).

1.4.2. Enzimatik Olmayan Bazı Antioksidanlar

1.4.2.1. Askorbat (L-Askorbik Asit, ASC)

Askorbat (ASC) üzerinde en fazla çalışılan antioksidan maddelerden biridir ve bitki hücre tiplerinin çoğunda, organellerde ve apoplastta oluşmaktadır (Ahmad vd., 2010). Fotosentetik dokularda yüksek miktarda (Smirnoff, 2005), vakuolde düşük konsantrasyonlarda bulunur (Davey vd., 2000). ASC normalde indirgenmiş formda (askorbat havuzunun %90'ı) meydana gelir ve onun hücre içi konsantrasyonu sitosolde 20 mM'dan kloroplast stromasında 20-300 mM arasında değişebilmektedir. Mitokondride

sentezlenir ve buradan proton elektrokimyasal gradiyenti ile veya kolaylaştırılmış difüzyonla diğer bölümlere taşınır. L-askorbik asitin prekürsörü D-glukozdur ve ASC büyüme, farklılaşma ve bitki metabolizmasını içeren birçok fizyolojik prosesleri etkiler. ASC'nin bitki savunma sistemindeki temel rolü H_2O_2 'ye ve diğer toksik oksijen türevlerine karşı metabolik prosesleri korumaktır (Ahmad vd., 2010). ASC hem ROT'ları temizler hem de fotosentez reaksiyonlarının düzenlenmesine katkıda bulunur (Chen ve Gallie, 2004). ASC esasen indirgeyici görevi görür ve birçok serbest radikal türünü temizler (Ahmad vd., 2010). Böylece, ASC indirgeme veya oksitlendirme gücü yüksek bir antioksidandır. Özellikle tokoferoksil radikalının α -tokoferole indirgenmesinde önemli bir fonksiyonu vardır (Sies vd., 1992; Bisby ve Parker, 1995). ASC, α -tokoferolü rejenere ederek veya ksantofil döngüsünde zeaksantin sentezinde dolaylı olarak reaksiyona girebilir (Ahmad vd., 2010). ASC birçok enzim aktivitesini etkiler ve diğer antioksidanlarla sinergistik fonksiyonu aracılığıyla oksidatif işlemlerin neden olduğu hasarları azaltır (Pourcel vd., 2007).

1.4.2.2. Tokoferoller

Tokoferoller bitkilerin tüm kısımlarında bulunan antioksidanların bir ailesidir (Srivalle vd., 2003). Dört izoformundan (α , β , γ , δ) biri olan, α -tokoferol biyolojik olarak en aktif ve kloroplast membranlarında en baskın antioksidandır ve fotooksidatif hasara karşı korumada esas olarak sorumludur. Antioksidan özellikleri bir yük transfer mekanizmasıyla singlet oksijeni söndürme yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Çok sayıda singlet oksijen moleküllerinin tek bir α -tokoferol molekülü ile giderilebildiği gösterilmiştir. α -tokoferoller lipid peroksi radikalleri temizler ve askorbat ve diğer antioksidanlarla reaksiyona girerek α -tokoferol geri dönüştürülebilen bir tokoferoksil radikali verir. α -tokoferollerin en önemli işlevi çoklu doymamış yağ asitlerini oksidasyondan korumak için çeşitli mekanizmalara katılmalarıdır (Ahmad vd., 2010). Fotosentez ve metabolizmanın yan ürünleri olarak oluşan ROT'lar bitki hücrelerindeki lipid peroksidasyonunun önemli kaynaklarıdır. α -tokoferol seviyeleri çok çeşitli abiyotik streslere cevapta bitki dokularında artarlar. α -tokoferoller çeşitli ROT'ları ve lipid peroksidasyon ürünlerini temizlerler, membranları stabilize ederler ve sinyal iletimini düzenlerler (Kruk vd., 2005; Noctor, 2006).

α -tokoferoller lipid oto-oksidasyonunda zincir yayılma adımını engeller ve bu etkili bir serbest radikal tuzağı yapar. Askorbat ile bağlantılı olarak tokoferollerdeki artış su

eksikliği koşullarındaki çeltikte birincil tepkilerden biri olarak gösterilmiştir. Oksidatif stres yüksek bitkilerde tokoferollerden sorumlu genlerin ifadesini aktifleştirir (Ahmad vd., 2010). Su stresi koşullarında tokoferollerdeki artış birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Örneğin Pourcel vd. (2007) bazı çim türlerinde α -tokoferol konsantrasyonunda osmotik stres koşullarında 1 ile 3 katlık bir artış olduğunu rapor etmiştir. α -tokoferoller abiyotik stresten bitkileri korurlar. Örneğin oksidatif stres, fotoinhibisyon ve fotoooksidatif stresin *Arabidopsis*'te yüksek ışığa cevapta arttığı rapor edilmiştir (Ahmad vd., 2010).

1.4.2.3. Glutasyon (GSH)

Glutasyon (GSH) sitosol, kloroplast, endoplazmik retikulum, vakuol ve mitokondri gibi hemen hemen tüm hücre kompartmanlarında bulunan bir tripeptid (γ -glutamylcysteinylglycine)'dir. GSH çoğu bitki hücrelerinde protein olmayan tiollerin ana kaynağıdır. GSH'daki tiol gruplarının kimyasal reaktivitesi onu tüm organizmalarda geniş bir biyokimyasal işlev yelpazesine hizmet etmesi için özellikle kararlı yapar. Tiol gruplarının nukleofilik yapısı metallerle merkaptid bağlarının oluşumunda ve seçilen elektrofiller ile reaksiyona girmesinde önemlidir (Ahmad vd., 2010)

Ayrıca ağırlıklı olarak indirgenmiş formda (GSH) oluşur ve konsantrasyonu kloroplastlarda 1-4 mM olmak üzere en yüksektir. GSH'ın biyosentetik yolu iyi tespit edilmiştir ve bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda benzerdir. γ -glutamilsistein sentetaz ve glutasyon sentetaz tarafından kataliz edilen iki ATP'ye bağlı adımda, kurucu amino asitler tam tripeptid oluşturmak üzere bağlanır (Ahmad vd., 2010). Bu adımlar hem kloroplast hem de kloroplasttan başka kompartmanlarda meydana gelir ve GSH konsantrasyonundaki değişim ve redoks durumu sinyal iletiminde çok önemlidir (Noctor vd., 2002).

GSH yüksek indirgeme potansiyeline sahip olmasından dolayı ASC ve α -tokoferol gibi antioksidan moleküllerin korunması gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol almaktadır. Ayrıca oksidatif hasarın meydana getireceği zararları etkisizleştirmektedir (Mullineaux ve Rausch, 2005). Bitkilerde GSH'ın iki önemli fizyolojik önemi vardır. Bunlardan biri ROT'lara karşı savunma diğeri ise kükürt metabolizmasının düzenlenmesidir (Herschbach ve Rennenberg, 1994; Lappartient ve Touraine, 1996). Abiyotik stres toleransı, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, redoks hücre dengesi, tiol gruplarının korunması, stres

savunma genlerinin ifadesinin düzenlenmesi, kükürt metabolizması için sinyal verme glutatyonun bitki metabolizması üzerine bilinen etkilerindendir (Mullineaux ve Rausch, 2005).

1.4.2.4. Karotenoidler

Karotenoidler bitki ve mikroorganizmalarda bulunan pigmentlerdir. Doğada meydana gelen 600'den fazla karotenoid bulunmaktadır. Çeşitli çalışmalar karotenoidlerin belirli tip kanserleri, yaşa bağlı kas hastalıklarını ve diğer hastalıkları engellediğini göstermiştir. Karotenoidlerin antioksidan aktivitesi esas olarak konjuge çift bağlı yapının eşleşmemiş elektronları delokalize etme yeteneğinin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Bu β -karotenin singlet oksijeni parçalamaksızın söndürmedeki mükemmel yeteneğinden ve β -karotenin peroksil ($\text{ROO}\cdot$), hidroksil ($\cdot\text{OH}$) ve süperoksit radikalleri ($\text{O}_2\cdot^-$) gibi serbest radikallerle kimyasal reaktivitesinden sorumludur. Karotenoidler yeterince yüksek konsantrasyonlarda lipidleri peroksidatif hasardan koruyabilir (Ahmad vd., 2010).

1.4.2.5. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bitki dokularında bol bulunan çeşitli sekonder metabolitler (flavanoidler, taninler, hidroksisinnamat esterler ve lignin)'dir. Polifenoller ROT'ları temizlemek için ideal bir kimyasal yapıya sahiptir ve in vivo'da tokoferol ve askorbattan daha etkili antioksidanlar olduğu gösterilmiştir. Polifenollerin antioksidan özellikleri, hidrojen veya elektron vericileri olarak yüksek reaktivitelerinden ve polifenolden türetilen radikalın stabilize etme ve eşleşmemiş elektronun yerinin değiştirilmesinden (zincir kırma işlevi), ve geçiş metal iyonlarını şelatlama yeteneklerinden (Fenton reaksiyonunun sonlandırılması) kaynaklanmaktadır (Rice-Evans vd., 1997). Fenoliklerin antioksidan özelliklerinin altında yatan başka bir mekanizma flavanoidlerin lipid paketlenme sırasını düzenleyerek peroksidasyon kinetiklerini değiştirebilmeleri ve membranların akışkanlığını azaltmalarıdır. Antioksidan olarak rol oynayan fenolik bileşikler serbest radikal zincirlerinin terminatörü olarak ve lipid peroksidasyonu katalizleyebilen redoks-aktif metal iyonlarının şelatörleri olarak işlev yapabilirler (Schroeter vd., 2002). Fenolik antioksidanlar hidrojen atomlarının hızlı bir şekilde radikallere verilmesiyle lipid ve diğer moleküllerin

oksidasyonuna müdahale ederler. Fenoksi radikal ara ürünleri nispeten kararlıdır ve böylece daha fazla radikal reaksiyonlarını oluşturmazlar. Diğer serbest radikallerle etkileşerek zincir reaksiyonlarının terminatörleri olarak bile rol oynayabilirler. Bununla beraber, yüksek bir fenolik antioksidan konsantrasyonu, redoks-aktif metallerin varlığı (bakır, demir) ve yüksek pH gibi belirli koşullarda, pro-oksidan olarak davranabilirler. Dahası fenolik bileşiklerin bitki hücrelerinde H_2O_2 'nin süpürülmesi kaskatına dahil olduğu gösterilmiştir (Ahmad vd., 2010).

1.5. Çevresel Streslerin Antioksidan Maddeler Üzerine Etkisi

Tuzluluk ve ağır metal stresi ROT'ların üretimini arttırarak oksidatif strese neden olmaktadır (Rizhsky vd., 2002). Glutasyon, tokoferoller, askorbik asit gibi enzimatik olmayan antioksidanlar ROT'ların temizlenmesinde görev alırlar (Mittler vd., 2004). Çevresel streslerin antioksidan madde miktarını nasıl etkilediği konusunda birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Örneğin, Sarker ve Oba (2018) askorbat içeriğindeki artışların *Amaranthus tricolor* varyetesinde oksidatif strese toleransı artırdığını belirlemiştir. Ren vd. (2016) osmotik strese toleranslı *Cerasus humulis* fidelerinin yüksek askorbat içerisine sahip olduğunu rapor etmiştir. Osmotik stres koşullarında yosun özü ile işlem görmüş patates bitkilerinde glutasyon, askorbat, karotenoidler, toplam fenol, flavanoidler ve tokoferollerde önemli artışların olduğu ve savunma sistemlerini uyardığı tespit edilmiştir (Abd El Baky vd., 2016). Ayrıca, yazlık buğdayda GSH biyosentezi ve GSH birikiminden ziyade GSH/GSSG oranı ne kadar yüksekse redoks döngüsünün kapasitesi bitkilerin kuraklığa dayanıklılığı için gerekli olduğu ileri sürülmüştür (Chen vd., 2004).

1.6. Çevresel Stres Sinyal Bileşikleri

Strese maruz kalan bitkilerde seviyeleri değişen bazı fitohormonlar stres cevabını başlatarak sinyal rol oynayabilirler. Jasmonik asit (JA), salisilik asit (SA) ve etilen hormonları bitkilerde sinyal özelliği bilinen fitohormonlardır. Bu sinyal bileşikler bitkileri hem zararlı organizmalara hem de abiyotik streslere karşı korumaktadır (Creelman ve Muller, 1997). Dokularda salisilik asit miktarı arttıkça bitkiler daha dayanıklı hale gelmektedir (Ryals vd., 1996). JA, SA ve etilen birbirleriyle etkileşebilmektedir. Bu

etkileşim pozitif veya negatif olabilir. *Arabidopsis thaliana* sinyal bileşikler için model organizma olarak bilimsel çalışmalarda kullanılmaktadır (Kunkel ve Brooks, 2002).

Diğer taraftan, bir izoprenoid fitohormon olan absisik asitin (ABA) çeşitli organizmalarda çeşitli biyolojik süreçleri düzenleyen kritik bir aracı sinyal olduğu bildirilmiştir (Kumar vd., 2019). ABA'nın kökler ve sürgünler arasındaki uzun mesafeli stres sinyali olduğu kaydedilmiştir (Ko vd., 2017). Tüm bitki seviyesinde ABA'nın su ve tuzla ilgili stres sırasında kökler ve sürgünler arasındaki iletişim ve diğer bazı bitki kaynaklı sinyallerle etkileşim için potansiyel bir aday olduğu rapor edilmiştir. ABA aynı zamanda organlar arası iletişimle ilgili diğer bitki sinyalleri ile de etkileşime girebilmektedir (Vishwakarma vd., 2017). Ayrıca antioksidan enzim genlerinin ve enzimatik olmayan savunma sistemi genlerinin ifade edilmesi de ABA sinyal uyarılma mekanizması ile aktive edilmektedir (Jiang ve Zhang, 2002). ABA sinyal algılamanın yanı sıra karmaşık düzenleyici mekanizmalar, üretim, bozulma ve iletim içeren belirli türde eylemler gerçekleştirmektedir (Vishwakarma vd., 2017).

Çözünebilir şekerler, antioksidan maddeler, prolin ve poliaminler gibi çeşitli metabolitlerin de çevresel streslere toleransta sinyal bileşik olarak işlev gördüğü rapor edilmiştir (Gupta, 2005; Lastdrager vd., 2014; Altuntaş vd., 2019). Bitki büyümesi için karbon ihtiyacını ve enerjiyi karşılamanın yanı sıra çözünür şekerler primer mesajcı olarak rol oynayabilirler ve stres toleransı ile ilgili genlerin transkripsiyonunu kontrol eden sinyalleri düzenlerler (Lastdrager vd., 2014). Çözünebilir şekerler, osmotik düzenlemeyi sağlayarak çeşitli streslere maruz kalan bitkilerde ROT'ların temizlenmesine yardımcı olmaktadır (Murakeozy vd., 2003; Ahmad vd., 2008; Livingston vd., 2009; Van den Ende ve Valluru 2009; Koyro vd., 2012). Sukroz su eksikliğine adaptasyonda son derece önemli çözünebilir şekerlerden biridir (Williams, 1992; Housley ve Pollock, 1993; McKersie ve Leshem, 1994). Stres durumunda proteinlerin stabilizasyonu, membran bütünlüğünün korunması gibi görevleri bulunmaktadır (Zhou ve Yu, 2010). Sukroz, prolin ve poliaminler strese maruz kalan bitkilerin dokularında biriken ve hücrel osmolariteyi artıran uyumlu çözünen maddelerdir. Bitkilerdeki bu uyumlu çözünenler sinyal molekül olarak işlev görebilir ve hücrel stres cevabını tetikleyebilirler (Altuntaş vd., 2019).

Prolin birikimi osmotik strese karşı yaygın bir bitki tepkisidir. Stres durumunda miktarı en çok artan aminoasitlerden biri olarak bilinmektedir (Ghaderi ve Siosemardeh, 2011). Serbest radikallerin temizlenmesinde, enzimlerin ve protein yapılarının korunmasında prolin önemli rollere sahiptir (Szabados ve Savoure', 2010; Islam vd., 2009;

Anjum vd., 2011). Hücrede redoks dengesinin sağlanmasında görevli olan prolinin (Hare ve Cress, 1997) proteinlerin yapısını stabilize eden moleküler şaperonlar olarak rol oynadığı ve strese cevap genlerini regüle eden sinyal iletiminin bir elemanı olduğu çeşitli çalışmalarla rapor edilmiştir (Maggio vd., 2002; Szabados ve Savouré, 2010; Altuntaş vd., 2019). Gerçekten prolin sadece bir osmolit değil abiyotik stres koşullarında bir antioksidan ve sinyal moleküldür (Hayat vd., 2012).

Poliaminlerin karmaşık sinyalizasyon sistemlerine dahil oldukları ve osmotik toleransının düzenlenmesinde anahtar bir role sahip oldukları bildirilmiştir (Pál vd., 2015). Bitkilerdeki birçok fizyolojik sürece etki eden büyüme düzenleyicileri olan poliaminler çevresel streslerde bitkinin kendini korumasına yardımcı olmaktadır. Bitkilerde en bol bulunan poliaminler bir diamin olan putresin, triamin spermidin ve tetramin spermindir (Paschalidis ve Roubelakis-Angelakis, 2005; Alcazar vd., 2006; Tomosugi vd., 2006; Kusano vd., 2007; Yang vd., 2008). Poliaminler tohumların çimlenmesi için gereklidir (Dias vd., 2009). Poliaminlerin osmotik strese toleransta önemli bir bileşik olduğu, çeltik bitkisine dışarıdan poliamin uygulaması yapıldığında fotosentez aktivitesi, su durumu ve osmotik stres toleransının arttığı belirtilmiştir (Yamaguchi vd., 2007).

Bitki hücrelerinde abiyotik stres sinyali esnasında ikinci haberci olarak görev yapan mineral elementlerden biri kalsiyumdur. Kalsiyum hücre içerisindeki çeşitli bileşiklerle konuşma sinyalinin önemli bir noktasında bulunur. Spesifik Ca^{2+} salınımları, stomaların kapanmasını başlatan sitosolik Ca^{2+} 'daki salınımlarla stoma düzenlenmesi gibi sayısız fizyolojik süreçle ilişkilendirilmiştir. Kalsiyuma özel değişimler özel streslere, stres gelişim oranına, daha önce maruz kalınan stres koşullarına ve doku tipine bağlıdır. Kalsiyum sinyalindeki özel bileşenler ve çapraz etkileşim Ca^{2+} sensör çeşitliliği kadar Ca^{2+} salınımlarının subselüler lokalizasyonu, büyüklüğü ve süresine bağlıdır (Ahmad vd., 2010).

Lipid yapıdaki sinyal molekülleri de hücredeki çeşitli metabolik olayları düzenlemek için ikincil uyarıcılar olarak görev yapabilirler. Fosfogliserolipidler ve sfingolipidler bitkilerdeki plazma zarlarının başlıca lipid bileşenleridir. Bazı fosfolipazlar lipid yapıda sinyal iletim molekülleri oluşturmak için fosfogliserolipidlerin özel bağlarını parçalayabilirler. Bitki hücrelerinde fosfolipazlar tarafından kataliz edilen reaksiyonlar sonucunda meydana gelen diaçilgliserol ve inositol 1,4,5 trifosfat çok sayıda fizyolojik olay için kalsiyum akışının düzenlenmesinde yer almaktadırlar. Yine bir fosfolipaz olan fosfolipaz D aktivitesiyle fosfolipid molekülünün fosfat baş kısmının ayrılması sonucunda oluşan fosfatidik asit çevresel streslere yanıt olarak hızla artan bir sinyal moleküldür. Bekçi

hücrelerindeki fosfatidik asitin stoma kapanmasını teşvik etmek için ABA sinyalini ileten proteinlerle etkileşebildiği belirlenmiştir (Türkan, 2019).

Bitkilerde sinyal molekül olarak işlev görebilen maddelerden biri de hidrojen peroksit ve süperoksit gibi reaktif oksijen türleridir. Stres koşullarında ılımlı seviyede artan ROT'lar hücrel stres cevabını tetikleyebilirler (Foyer ve Noctor, 2005; Altuntaş vd., 2019). Yüksek ROT seviyeleri redoks dengesizliği ve oksidatif strese neden olurken, bitki dokularına serbestçe yayılabilen ve nispeten uzun ömürlü H_2O_2 sinyal iletiminde merkezi bir oyuncu olarak hareket edebilir (Hossain vd., 2015). Ayrıca sinyal role sahip olan hidrojen peroksitin bitkilerde fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler cevapları uyardığı sinyal yollar arasındaki çapraz etkileşime aracılık ettiği kaydedilmiştir (Neill vd., 2002).

Antioksidan özelliğe sahip birçok madde bitkilerde stres sinyalinin iletimine aracılık edebilmektedir. Yüksek bitkilerdeki askorbat, glutatyon, tokoferol, prolin, betain ve benzeri ana antioksidanlar biyomembranlarla ilgili bölümlerle etkileşime giren önemli redoks sinyal bileşenleridir (Shao vd., 2008). Askorbat sitosolik kalsiyum yükselmesini tetikleyebilir, bitki dokusunda ROT/ Ca^{2+} sinyallerinin yayılmasına katkıda bulunabilir ve bu nedenle askorbat kalsiyum sinyalleşmesine bağlanabilir. Bitkilerde önemli bir antioksidan olan askorbatın bir dizi fizyolojik fonksiyon için yüksek öneme sahip hücre dışı bir sinyal ve düzenleyici molekül olarak hareket ettiği varsayılmaktadır (Makavitskaya vd., 2018). Bir anahtar redoks sinyal bileşeni olarak glutatyonun rolü olumsuz stres faktörlerine karşı çeşitli savunma mekanizmalarının aktivasyonunda da kurulmuştur. Bu sinyal yolunda GSH ROT'lar dahil olmak üzere diğer bilinen sinyal molekülleri ile etkileşime girebilir (Ghanta ve Chattopadhyay, 2011). Tokoferoller çeşitli ROT ve lipid oksidasyon ürünleri süpürür ve söndürür, membranları stabilize eder ve sinyal iletimini modüle eder. Böylece hem oksidanlar hem de antioksidanlar, tiyol durumu tarafından modüle edilen redoks duyarlı reseptörler tarafından başlatılan kinaza bağımlı ve bağımsız yollar kullanarak, özellikle savunma için sağlamlık açısından daha yüksek bitki sağlığı hakkında bilgi sağlamak için sinyal rollerini yerine getirirler. Antioksidanlar bu fizyolojik olaylarda pasif bir izleyici değil, daha ziyade yüksek bitki hücresi stres algısı ve fizyolojik tepkiler arasında dinamik bir ara yüz oluşturan anahtar sinyal bileşenleri olarak işlev görürler (Shao vd., 2008).

1.7. Alfa Lipoik Asit

α -lipoik asit ilk olarak Snell vd. (1937) tarafından bazı bakterilerin büyümesi için patates özünden elde edilen bir bileşiğe ihtiyaç duyulması ile keşfedildi. Bununla birlikte, "Patates büyüme faktörünün" izole edilmesi ve karakterize edilmesi 1951 yılına kadar gerçekleşmedi. Başlangıçta, ALA bir vitamin olarak sınıflandırıldı ancak daha ileri çalışmalar, bitkilerin ve hayvanların bu bileşiği endojen olarak sentezleyebileceğini ortaya çıkardı (Zicker vd., 2002).

İki kükürt atomuna sahip benzersiz bir kısa zincirli yağ asidi olan ALA diğer antioksidan maddelerden farklı olarak hem indirgenmiş (dihidrolipoik asit, DHLA) hem de yükseltgenmiş formda (ALA) güçlü antioksidan özelliğe sahiptir (Navari-Izzo ve Quartacci, 2001; Sudesh vd., 2002). ALA, enerji üretimiyle ilgili çeşitli mitokondriyal çoklu enzim komplekslerinde kofaktör olarak işlev gören, hayvanların ve insanların vücudunda sentezlenebilen doğal olarak oluşan 1,2 dithiolan 3-pentanoik asit adıyla da bilinen bir bileşiktir (Gurer vd., 1999). Dihidro lipoik asit yükseltgenmiş lipoik aside göre daha etkili bir antioksidandır ve süperoksit, hidroperoksil ve hidroksil radikalleri gibi ROT'ları direkt olarak temizlemede rol oynar (Navari-Izzo vd., 2002). Bitkilerde solunum ve dolaylı olarak karbon fiksasyonu ve azot asimilasyonunda rol oynayan ALA'nın in vivo ve in vitro olarak suda çözünebilen en önemli antioksidan olan glutatyon seviyesini artırdığı belirlenmiştir (Podda vd., 1994; Sen vd., 1997; Taylor vd., 2004). ALA'nın kimyasal yapısı Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. ALA'nın kimyasal yapısı (Perricone vd., 1999).

ALA'nın bu iki formu, yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları ile birbirine dönüşebilmektedir. ALA birçok bitki ve hayvan dokularının yanı sıra prokaryotik ve

ökaryotik mikroorganizmalarda da meydana gelir. ALA'nın biyosentez yolu net olmamakla birlikte hayvanlarda mitokondride bitkilerde ise plastidlerde sentezlendiği ileri sürülmüştür (Yasuno ve Wada, 2002; Xiao vd., 2007). ALA günümüzde bitki doku kültürü ve *Agrobacterium* aracılı bitki genetik dönüşümü için kültür ortamına katkı maddesi olarak, eksplantların kahverengileşme oranını azaltmak, *Agrobacterium* aracılı genetik transformasyon verimliliğini geliştirmek için kullanılmaktadır (Xiao vd., 2007).

1.8. Mısır (*Zea mays L.*) Kökeni, Tarihçesi ve Coğrafi Dağılımı

Dünya genelinde buğday ve arpadan sonra en fazla tarımı yapılan bitkilerden biri mısırdır. Kökeninin Amerika kıtası olduğu bilinmektedir. Mısır üretimi yapılan başlıca ülkeler ABD, Çin, Brezilya ve Arjantin'dir (FAOSTAT, 2014). Ülkemize Suriye ve Mısır yoluyla geldiğine inanılmaktadır. Karadeniz ve Marmara Bölgeleri'nde iklim elverişli olduğundan mısır tarımı yapılmaktadır. Üründen elde edilmesi beklenen verim bölgeden bölgeye çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir.

1.8.1. Sınıflandırılması

Mısır (*Zea mays L.*) Poaceae (Buğdaygiller) familyası, *Zea* cinsine ait tek yıllık bir bitkidir. C4 bitkisi olmasından dolayı fotosentez hızı da oldukça yüksektir (Benson ve Pearce, 1987; Brenner, 1991). Meyveleri genellikle sarı veya kırmızı renklidir (Bennetzen ve Hake, 2009). Mısır bitkisinin sistematik sınıflandırılması Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 2. Mısırın sistematik sınıflandırılması

Alem: Plantae
Bölüm: Angiospermae
Sınıf: Monocotyledonae
Takım: Poales
Aile: Poaceae
Altaile: Ponicoidae
Oymak: Andropogoneae
Cins: Zea

Mısır sıcak ve ılıman iklimlerde yetişen bir bitkidir. C4 bitkisi olması güneş enerjisinden en iyi şekilde faydalanmasını sağlamaktadır. Antarktika hariç hemen hemen her yerde yetiştirilmektedir. Yaklaşık olara 10 ° C'de çimlenmeye başlamaktadır. 25 ° C büyümesi için uygun bir sıcaklıktır, yüksek sıcaklık (38 ° C) bitkinin hasar görmesine neden olmaktadır. Mısır drenajı iyi yapılmış, pH değeri 6-7 olan verimli topraklarda yetişir. Vejetatif gelişme süresince toprak şartlarına bağlı olarak sulama ya da hafif yağış ister (Benson ve Pearce, 1987; Brenner, 1991; Elçi vd., 1994; K n, 1997; K rtok, 1998).



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Deney Materyali ve Hoagland Besin Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmada, deney materyali olarak mısır (*Zea mays* L.) tohumları kullanıldı. Tohumlar “Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (Samsun)’ndan” temin edildi.

Hoagland stok besin çözeltisinin (10X) hazırlanması için Tablo 3’te belirtilen kimyasallar kullanıldı. Solüsyon A’yı hazırlamak için Tablo 4’de belirtilen kimyasal maddeler belirtilen miktarlarda tartıldıktan sonra saf su ile 100 ml’e tamamlandı ve solüsyon +4 ° C’de muhafaza edildi. Solüsyon B için 0,5 ml H₂SO₄ alınarak 100 ml’e tamamlandı ve +4 ° C’de muhafaza edildi.

Tablo 3. Hoagland besin çözeltisinde (10X) kullanılan kimyasallar ve miktarları

Elementler	1 litre için gerekli miktar
1 M Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	9,4 g
1 M MgSO ₄ .7H ₂ O	5,2 g
1 M KNO ₃	6,6 g
1 M NH ₄ H ₂ PO ₄	1,1 g
Sol A	20 ml
Sol B	2 ml

Tablo 4. Hoagland besin çözeltisinde (10X) kullanılan Solüsyon A içeriği

Elementler	100 ml için gerekli miktar
H ₃ BO ₃	280 mg
MnSO ₄ .7H ₂ O	340 mg
CuSO ₄ .7H ₂ O	10 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22 mg
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂ .4H ₂ O	10 mg

Hoagland besin çözeltisi (1X) hazırlanması için Hoagland stok çözeltisinden (10X) 100 ml alınarak üzerine saf su ile 5 ml Solüsyon C ilave edildi. Çözeltinin pH'sı 5,8'e ayarlanarak 1000 ml'ye saf su ile tamamlandı.

Tablo 5. Hoagland besin çözeltisinde (1X) kullanılan Solüsyon C içeriği

Elementler	500 ml için gerekli miktar
EDTA (Etilendiamin Tetra Asetik Asit)	3,36 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,79 g

Tablo 5'te belirtilen kimyasal maddeler belirtilen miktarlarda tartıldı ve şişeye yaklaşık 400 ml saf su ilave edildi. Solüsyon 70 ° C'ye kadar ısıtıldı. Çözündükten sonra soğumaya bırakıldı ve son hacim saf su ile 500 ml'e tamamlandı. Solüsyon +4 ° C'de muhafaza edildi.

2.2. Bitkilerin Büyütülmesi, Deney Dizaynı ve ALA Uygulaması

Mısır tohumları yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra, 3'er adet tohum vermikulit içeren saksılara (5,5 cm x 6,0 x 6,0 cm) yerleştirildi. Saksılar, daha büyük plastik kaplar (17,0 cm x 24,5 cm x 8,0 cm) içine konuldu ve büyük saksılara 0,1X Hoagland besin çözeltisi (1500 ml) ilave edilerek tohumlara su ve besin temin edildi. Tohumlar çimlenene kadar 0,1X Hoagland besin çözeltisiyle sulandı. Tohumlar çimlenip fideler görülmeye başladığında 1X Hoagland solüsyonu kullanılarak fideler büyütüldü. Fideler ışık yoğunluğu 400 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sıcaklık 25/22 ° C gündüz/gece ve nem % 60 $\pm$ 2 olacak şekilde kontrollü koşullardaki bitki büyütme odasında büyütüldü. 21 günlük fideler 3 tam yapraklı aşamaya gelince 13 deney grubu oluşturuldu. Bu deney grupları aşağıda maddeler halinde yazılmış ve açıklanmıştır.

1. KONTROL
2. ALA
3. PEG
4. ALA+PEG
5. DMTU+ALA
6. DMTU+PEG

7. DMTU+ALA+PEG
8. BSO+ALA
9. BSO+PEG
10. BSO+ALA+PEG
11. AF+ALA
12. AF+PEG
13. AF+ALA+PEG

Birinci gruptaki fideler deney süresince Hoagland besin çözeltisi içerisinde bekletildi ve böylece “Kontrol” grubu oluşturuldu.

İkinci grubu oluşturan “ALA” muamele grubundaki fideler, 12 μ M ALA (Hoagland besin çözeltisi içerisinde hazırlanmış) muamelesine 24 saat Sezgin vd. (2019)’e benzer şekilde maruz bırakıldı ve ardından 7 gün Hoagland besin çözeltisinde bekletildi.

Üçüncü gruptaki fideler ALA muamelesi yapılmaksızın Hoagland besin çözeltisinde tutuldu ve ardından %10’luk polietilen glikol₆₀₀₀ (PEG) içeren -0.45 MPa’lık osmotik strese kademeli olarak maruz bırakıldı ve “PEG” grubu olarak adlandırıldı (Jacomini vd., 1987). Kademeli PEG uygulaması, % 3 PEG’de 3 gün, % 6 PEG’de 1 gün ve % 10 PEG’de 3 gün olacak şekilde gerçekleştirildi. Böylece fideler toplam 7 gün PEG’e maruz bırakıldı.

Dördüncü gruptaki fideler, 12 μ M ALA muamelesine 24 saat, ardından yukarıda belirtildiği şekilde kademeli olarak PEG’e 7 gün maruz bırakıldı. Böylece “ALA+PEG” grubu oluşturuldu.

ALA tarafından antioksidan sistemin uyarılmasının ROT’lar aracılığıyla olup olmadığını test etmek için beşinci, altıncı ve yedinci gruptaki fideler H₂O₂ ve süperoksit temizleyicisi, 5 mM dimetiltiyoüre (DMTU) (Li vd., 2016; Xia vd., 2011) (Hoagland besin çözeltisi içerisinde hazırlanmış) ile 8 saat muamele edildi. ROT’ları temizlemek için DMTU uygulamalarının ardından fideler 24 saat 12 μ M ALA muamelesine maruz bırakıldı. Beşinci grubu oluşturan fideler daha sonra Hoagland besin çözeltisi içerisinde 7 gün bekletildi ve bu uygulamalar “DMTU+ALA” olarak adlandırıldı.

Altıncı gruptaki fideler 5 mM DMTU ile 8 saat ön muameleden sonra ALA muamelesi yapılmaksızın 24 saat Hoagland besin çözeltisi içerisinde bekletildi. Daha sonra

kademeli PEG muamelesine 7 gün maruz bırakıldı. Bu uygulamalar “DMTU+PEG” olarak adlandırıldı.

Yedinci gruptaki fideler 5 mM DMTU ön muamelesinin ardından 24 saat 12 µM ALA muamelesine maruz bırakıldı. Daha sonra fidelere gittikçe artan konsantrasyondaki PEG, toplam 7 gün uygulandı. Bu muamele grubu “DMTU+ALA+PEG” olarak adlandırıldı. Böylece H₂O₂ ve süperoksit seviyeleri azaldığında ALA’nın antioksidan sistemi uyarıp uyarmadığı belirlenmeye çalışıldı.

ALA tarafından antioksidan sistemin uyarılmasının glutatyon aracılığıyla olup olmadığını test etmek için, sekizinci, dokuzuncu ve onuncu gruptaki fideler, 1 mM bütiyonin sülfoksiminin (BSO; GSH biyosentez inhibitörü) (Liu vd., 2018) ile 8 saat ön muamele edildi. BSO uygulamalarından sonra fidelerin bir kısmı 24 saat 12 µM ALA muamelesine maruz bırakıldı. Sekizinci grubu oluşturan fideler daha sonra 7 gün Hoagland besin çözeltisi içerisinde bekletildi ve bu uygulama “BSO+ALA” olarak adlandırıldı.

Dokuzuncu gruptaki fideler 1 mM BSO ile 8 saat ön muameleden sonra ALA muamelesi yapılmaksızın Hoagland besin çözeltisi içerisinde 24 saat bekletildi. Daha sonra fideler kademeli PEG muamelesine 7 gün maruz bırakıldı. Bu uygulama “BSO+PEG” olarak adlandırıldı.

Onuncu gruptaki fideler 1 mM BSO ön muamelenin ardından 24 saat 12 µM ALA ile muamele edildi. Daha sonra fideler kademeli PEG muamelesine toplam 7 gün maruz bırakıldı. Bu muamele grubu “BSO+ALA+PEG” olarak adlandırıldı. Böylece ortamda GSH miktarı azaltıldığında ALA’nın antioksidan sistemi uyarıp uyarmadığı belirlenmeye çalışıldı.

ALA sinyalizasyonuna askorbatın karışıp karışmadığını belirlemek için ise on birinci, on ikinci ve on üçüncü gruptaki fidelere Hoagland besin çözeltisi içerisinde hazırlanmış askorbat biyosentez inhibitörü, 1 mM akriflavin (AF) (Liu vd., 2018; Jin vd., 2019) 8 saat uygulandı. AF uygulamalarından sonra fidelerin bir kısmı 24 saat 12 µM ALA muamelesine maruz bırakıldı. On birinci grubu oluşturan bu fideler daha sonra Hoagland besin solüsyonu içerisinde 7 gün bekletildi ve bu uygulama “AF+ALA” olarak adlandırıldı.

On ikinci gruptaki fideler 1 mM AF ile 8 saat ön muameleden sonra ALA muamelesi yapılmaksızın Hoagland besin çözeltisi içerisinde 24 saat bekletildi. Daha sonra kademeli PEG muamelesine 7 gün maruz bırakıldı. Bu uygulamalar “AF+PEG” olarak adlandırıldı.

On üçüncü gruptaki fidelere 1 mM AF ön muamelesinin ardından 24 saat 12 μ M ALA uygulandı. Daha sonra fideler PEG'e kademeli olarak 7 gün maruz bırakıldı. Bu muamele grubu "AF+ALA+PEG" olarak adlandırıldı. Böylece ortamda askorbat miktarı azaltıldığında ALA'nın antioksidan sistemi uyarıp uyarmadığı belirlendi.

Uygulamalardan sonra hasat edilen fidelerde antioksidan enzim aktiviteleri, antioksidan bileşikler ile H_2O_2 ve süperoksit içerikleri ölçüldü. Her bir uygulama için en az dört saksı, dört tekrarlı olacak şekilde düzenlendi.

2.3. ALA Uygulamasının Reaktif Oksijen Türleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

2.3.1. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Seviyesinin Belirlenmesi

Hidrojen peroksit içeriği Velikova vd. (2000)'in geliştirdikleri metoda göre belirlendi. Yapraklar (0,25 g), 0,1 g aktifleşmiş kömür ile 3 ml %5 trikloroasetik asit içerisinde 0 ° C'de ekstre edildi. Süpernatant'a (0,5 ml) aynı miktarda 10 mM potasyum fosfat (pH 7,0) ve 0,75 ml 1 M KI ilave edildi. Absorbans 390 nm'de ölçüldü ve H_2O_2 içeriği μ mol g-1 taze ağırlık olarak ifade edildi.

2.3.2. Süperoksit Radikalinin Belirlenmesi

Süperoksit oluşumu spektrofotometrik olarak Frahry ve Schopfer (2001)'e göre gerçekleştirildi. Bu metotta Tetrazolyum tuzu XTT'nin NADPH ya da NADH tarafından indirgemesi 470 nm'de 25 dakika boyunca takip edilerek süperoksit radikali belirlendi.

2.3.3. Alfa Lipoik Asit Tayini

Yapraklar (0,1 g) sıvı azottan geçirildikten sonra 5 dakika homojenizatörde parçalandı. Sonra her bir ependorfun içine 1800 μ l ekstraksiyon tamponu (% 70'lik etanol+ % 0,5'lik aktif karbon) eklendi ve 5 dakika daha homojenize edildi. Daha sonra 10 dakika 15 000 g'de santrifüj edildi. Süpernatanttan 125 μ l alınarak üzerine 1,5 ml MBTH solüsyonu

ve 2 ml FeCl_3 solüsyonu eklendi. 10 dakika bekledikten sonra karışım 10 ml'e saf su ile tamamlandı. Absorbans 450 nm'de ölçüldü.

2.4. ALA Uygulamasının Antioksidan Bileşikler Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

2.4.1. Antioksidan Bileşiklerin Tayini

2.4.1.1. Glutasyon Tayini

Glutasyon içeriğini belirlemek için, 0,5 g yaprak tartılarak, 5 ml 1 mM EDTA içeren %5'lik metafosforik asit içerisinde ekstrakte edildi. Ekstrakt +4 °C'de 10 000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Glutasyon içeriği "Total Glutasyon Assay Kit" (Northwest Life Sci. Spec) ile Tietze (1969)'a göre belirlendi. Glutasyon 250 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,5), 200 μM NADPH, 600 μM DTNB, 25 μl ekstrakt ve 0,3 U GR içeren reaksiyon karışımının kullanılmasıyla ölçüldü. 412 nm'de absorbanstaki değişim 3 dakika boyunca gözlemlendi. Glutasyon içeriği 0-5 μM konsantrasyonlarda GSH standart grafiği üzerinden hesaplandı.

2.4.1.2. Askorbat Tayini

Askorbat içeriği Foyer vd. (1983)'e göre belirlendi. Bunun için 0,1 g yaprak sıvı azotta parçalandı ve üzerine 1 ml 2,5 M perklorik asit ilave edildi. Ekstre 2 ° C de 10 000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant Na_2CO_3 ile nötralize edildi. İndirgenmiş askorbat 265 nm'de 1 M NaH_2PO_4 tamponu, pH 5,6, 1 U askorbat oksidaz (AO) ile belirlendi. Toplam askorbat ise 30 mM DTT varlığında inkübasyon sonrası ölçüldü.

2.5. ALA Uygulamasının Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

2.5.1. Antioksidan Enzim Analizleri

Enzim ekstraksiyonu için 0,5 g yaprak tartıldı ve sıvı azot içerisinde toz haline getirildi. Daha sonra 5 ml ekstraksiyon tamponu (50 mM K_2HPO_4 , 1 mM EDTA pH 7,0, %1 PVPP) içerisinde ekstrakte edildi. APX aktivitesi için ekstraksiyon tamponuna ilave olarak 5 mM askorbik asit eklendi. Ekstrakt +4 °C’de 20 000 g’de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant enzim aktivitelerinin tayini için kullanıldı.

2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

SOD aktivitesi Beauchamp ve Fridovich (1971) metoduna göre gerçekleştirildi. Aktivite tayini için 50 mM fosfat tamponu (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 13 mM metionin, 75 mM NBT ve 2 mM ribofilavin içeren karışıma 50 µl enzim ekstraktı ilave edildi. Ribofilavin en son konuldu ve tüplerin beyaz ışık kaynağı altına yerleştirilmesiyle reaksiyon başlatıldı. Işık kaynağının 10 dakika sonra uzaklaştırılmasıyla reaksiyon sonlandırıldı ve oluşan reaksiyon ürünü 560 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

2.5.1.2. Katalaz Aktivitesi

CAT aktivitesi Aebi (1983)’e göre gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı (3 ml), 10,6 mM H_2O_2 içermektedir. Reaksiyon 25 µl ekstraktın ilave edilmesi ile başlatıldı. Absorbansdaki azalış 240 nm’de ve 25 ° C de 3 dakika boyunca gözlemlendi. CAT aktivitesi, $39,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı.

2.5.1.3. Askorbat Peroksidaz Aktivitesi

APX aktivitesi Nakano ve Asada (1987)'a göre belirlendi. Reaksiyon karışımı 2,7 ml 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, 0,5 mM askorbat, 0,1 ml, 0,1 mM H₂O₂ ve 50 µl enzim ekstresi içermektedir. Absorbansdaki azalma 290 nm'de okundu ve aktivite 2,8 mM⁻¹cm⁻¹ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı.

2.5.1.4. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi

GR aktivitesi Foyer ve Halliwell (1976)'e göre belirlendi. Aktivite tayini için 200 µl 0,5 mM EDTA içerisinde hazırlanmış 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 250 µl GSSG ve 500 µl NADPH ihtiva eden karışıma 50 µl enzim ekstraktı ilave edildi. NADPH'nin oksidasyonu 340 nm'de 5 dakika boyunca azalmanın ölçülmesiyle belirlendi. GR aktivitesi, NADPH için 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı.

2.5.1.5. Monodehidroaskorbat Redüktaz Aktivitesi

MDHAR aktivitesi, Hossain vd. (1984)'nin tanımladığı gibi ölçüldü. Enzim aktivitesi, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,8), 150 µM NADH, 500 µM ASC ve 100 µl enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlendi. Ölçülen değerler askorbat oksidazın (AO) yokluğunda elde edilen verilerden çıkarıldı. MDHAR aktivitesi, 340 nm'de NADH için 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı.

2.5.1.6. Dehidroaskorbat Redüktaz Aktivitesi

Bitki örneklerinden alınan 0,5 g numune, 50 mM Tris-HCl, (pH 7,4), 100 mM NaCl, 2 mM EDTA ve 1 mM MgCl₂ içeren ekstraksiyon tamponunda homojenize edildi. Ekstrakt +4 °C'de 20 000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant enzim aktivitesinin tayini için kullanıldı. DHAR aktivitesi, Hossain ve Asada (1984)'nin tanımladığı gibi ölçüldü. Enzim aktivitesi, 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 6,5), 0,5 mM DHA, 1 mM GSH ve 100 µl enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlendi. DHAR

aktivitesi, 265 nm’de absorbandsaki artışa bağı olarak ölçüldü ve $7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplandı.

2.6. Protein Tayini

Protein tayini Bradford (1976)‘ a göre spektrofotometrik olarak yapıldı. Bovin serum albumin (BSA) standartları hazırlanarak, Coomassie Brilliant Blue G250 boyar maddesi ile proteinlerin oluşturduğu kompleks 595 nm’de ölçüldü. Protein konsantrasyonu mg cinsinden hesaplanarak, enzim aktivitelerinin ifade edilmesinde kullanıldı.

2.7. RNA İzolasyonu

On üç deney grubuna ait yaprak numunelerinden alınan örneklerden toplam RNA izolasyonu ‘RNeasy Plant Mini Kit’ kullanılarak üretici firmanın kullanım kılavuzundaki yönergelere göre yapılmıştır.

RNA izolasyonu basamakları aşağıda maddeler halinde ifade edilmiştir.

1. 0,1 gram yaprak örnekleri steril ependorf tüplere alınıp sıvı azot ile çalkalandıktan sonra 2 dakika 5000 rpm’de homojenizatörde karıştırıldı. Her bir ependorfa 450 μl RLT karışımı eklendi ve 10 saniye vortekslendi.
2. Tüpler 56°C ’de 1 dakika inkübe edildi ve 20 000 g’de 2 dakika santrifüj edildi.
3. Tüplerdeki 450-550 μl ’lik süpernatant kısım, temiz tüplere aktarıldı ve 250 μL % 99’luk etanol ilave edilerek pipet yardımıyla karışım sağlandı. Sonrasında karışımlar, saflaştırma kolonu takılı toplama tüplerine aktarıldı.
4. Tüpler 10 000 rpm’de 20 saniye santrifüj edildi.
5. Santrifüjden sonra toplama tüplerindeki süzüntü dökülerek saflaştırma kolonları yeniden takıldı.
6. Saflaştırma kolonlarına 700 μl RW 1 yıkama tamponu ilave edildi, 10 000 rpm’de 15 saniye santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonunda saflaştırma kolonlarının takılı olduğu toplama tüpleri atıldı, saflaştırma kolonları yeni toplama tüplerine yerleştirildi.
8. Saflaştırma kolonlarına 500 μl RPE buffer ilave edildi, 10 000 rpm’de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki süzüntü dökülüp kolonlar tekrar takıldı.

9. Saflaştırma kolonlarına tekrar 500 µl RPE eklendi, 10 000 rpm’de 2 dk santrifüj edilerek kolonların son yıkaması gerçekleştirildi. Toplama tüpleri atıldı.
10. Son basamakta RNA eldesi için saflaştırma kolonları RNaz içermeyen 1.5 ml’lik ependorflara yerleştirildi ve saflaştırma kolon membranlarının merkezine 50 µL nükleaz içermeyen saf su eklenip 10 000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Örnekler -80 °C’de saklandı.

2.8. cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

İzole edilmiş olan RNA’ların, kalitesi ve miktarını belirlemek için nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop 2000) cihazında 260/280 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Bu ölçümün temel amacı, bir sonraki basamak olan cDNA sentezinde eşit konsantrasyonlarda DNA elde etmektir. RNA örneklerinden cDNA sentezi, ‘High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit’ kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi.

cDNA sentez basamakları aşağıda maddeler halinde ifade edilmiştir.

1. Steril tüplere nanodropta ölçülen RNA miktarları ve son hacim 25 µL olacak şekilde su eklendi.
2. Sonrasında tüplere sırasıyla; 4,2 µL Nuclease free H₂O, 2 µL 10X RT Buffer, 0,8 µL 25X dNTP mix, 2 µL 10X Random Primers, 1 µL Multiscribe Reverse Transkriptaz son hacim 10 µL olacak şekilde eklendi.
3. Toplamda tüplere 50 µL hacim için 25 µL RNA+ su + 25 µL reaksiyon mix eklendi.
4. Yavaşça karıştırılıp kısa bir süre santrifüjlendi.
5. Ters transkripsiyon reaksiyonu, ısı döngü cihazında 42 ° C’de 140 dakikalık bir sürede gerçekleştirildi.

2.9. Real Time PCR Reaksiyonu

Real time PCR reaksiyonu için 1 µL forward, 1 µL reverse ve 1 µL cDNA örneği 10 µL Ssofast Evrene mix ile karıştırıldı. Nükleaz-free su ile son konsantrasyon 20 µL’ye tamamlanarak reaksiyon başlatıldı. Kontrol primer (house-keeping gen) olarak aktin (ACT) kullanıldı. Real Time PCR işlemi sonrasında *ACT*, *SOD*, *APX1* ve *CAT1* genleri için stres uygulaması yapılan yapraklardan alınan örneklerde polimeraz zincir reaksiyonu eş zamanlı

olarak izlendi. Çalışmada kullanılan primer sekansları, ürün boyu ve Oligo ID numaraları Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Real Time PCR reaksiyonunda kullanılan primer sekansları, ürün boyu ve Oligo ID

Gen	Primer adı	Sekans 5’-3’	PCR ürün boyu	Oligo ID
Süperoksit dismutaz	ZmSOD_F	TTGTTGCAAATGCTGAGGGC	20	210310B074G03
	ZmSOD_R	AGGCAAGGATGTAACAGCGT		210310B074H03
Katalaz	ZmCAT_F	TGCTTTCTGCCCAGCGATTA	20	210310B074A04
	ZmCAT_R	CACTTCTCACGACAGCCTGT		210310B074B04
Askorbat peroksidaz	ZmAPX_F	GCCTTCTTCAGCTCCCAAGT	20	210310B074C04
	ZmAPX_R	TGCAAAAGACCACATGCAGC		210310B074D04
Aktin	ZmACT_F	ACCAGTTGTTCGCCCCTAG	20	5116A2772_1
	ZmACT_R	GAAGATCACCTGTGCTGCT		5116A2772_2

F: Forward/İleri, R: Reverse/Geri)

2.10. İstatistiki Analizler

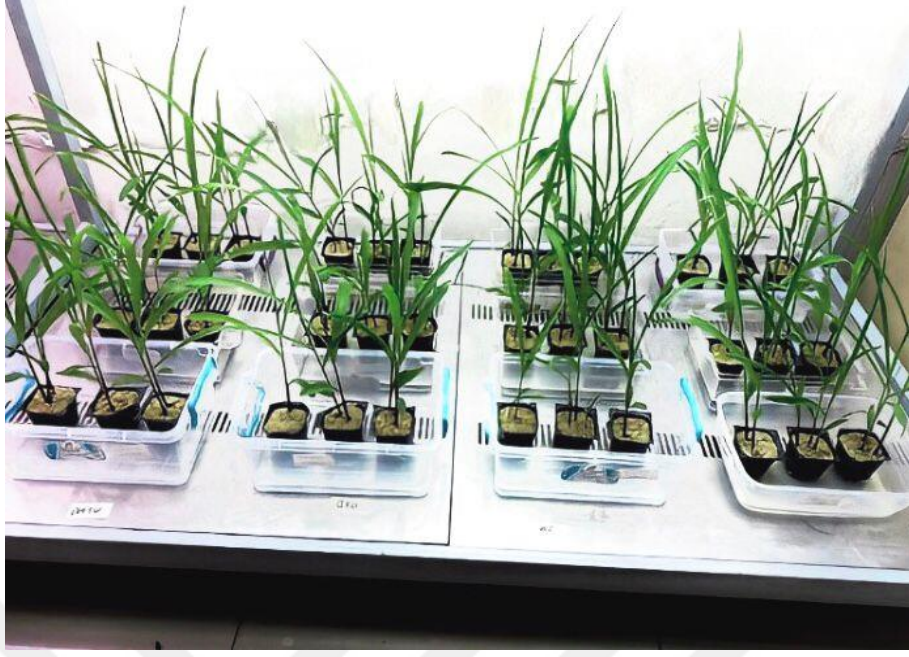
Denemeler, tesadüf parseller deneme deseni planında kurularak, 3 biyolojik numuneden en az 4 tekrarlı olarak şekilde gerçekleştirildi. Muamelelere bağlı olarak yapılan örneklemeler ve ekstraksiyonlar sonucu elde edilen sayısal ve oransal değerler, Windows tabanlı, lisanslı bir paket program olan Statistic Package for Social Sciences (SPSS) ile bilgisayar ortamında ANOVA varyans analiz testleri ile değerlendirildi.

3. BULGULAR

Hoagland besin çözeltisinden oluşan hidroponik ortamda büyütölen mısır fideleri Şekil 7’de görölmektedir. Üç yapraklı aşamaya kadar büyütölerek, ROT temizleyicisi DMTU, glutasyon biyosentez inhibitörü BSO ve askorbat biyosentez inhibitörü AF ön uygulaması ile ALA muamelesi yapılmış ve osmotik strese maruz bırakılmış fidelerde oksijen radikal temizleyicisi ve inhibitör muamelelerinden kaynaklı belirgin bir morfolojik farklılık gözlenmemiştir. DMTU, BSO ve AF uygulaması yapılan fideler Şekil 8’de görölmektedir.



Şekil 7. Hoagland besin çözeltisi büyütölen mısır fideleri



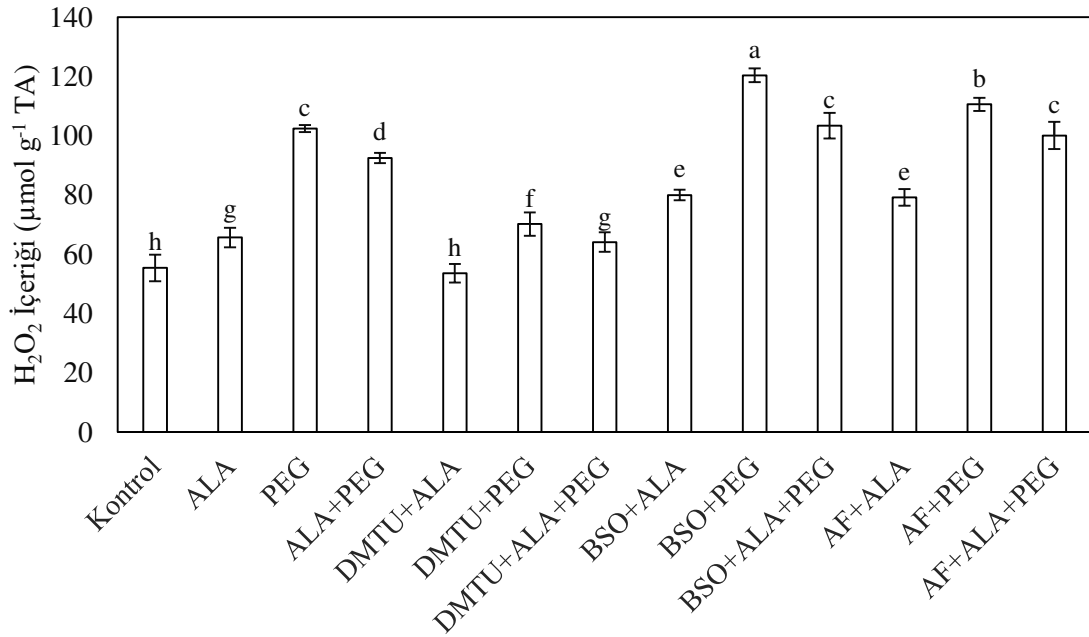
Şekil 8. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulaması yapılan mısır fideleri

3.1. Reaktif Oksijen Türlerindeki Değişimler

3.1.1. Hidrojen Peroksit Seviyesi

Hidrojen peroksit içeriğinin ALA uygulanan fidelerde kontrole göre arttığı bulundu. PEG fidelerindeki H_2O_2 içeriğinin ALA muamelesinden daha fazla olduğu gözlenirken, ALA+PEG fidelerinde PEG'e göre bir azalış görüldü (Şekil 9).

Osmotik stresli ve stressiz koşullarda DMTU muameleleri H_2O_2 içeriklerini azaltırken BSO ve AF muameleleri H_2O_2 içeriğini inhibitör uygulaması yapılmamış fidelere göre arttırdı. DMTU+PEG fideleri ile karşılaştırıldığında, DMTU+ALA+PEG fidelerinde H_2O_2 içeriğinin önemli ölçüde azaldığı bulundu. BSO+PEG fideleri ile kıyaslandığında, BSO+ALA+PEG fidelerinde H_2O_2 içeriğinin daha az olduğu görüldü. Benzer şekilde, osmotik stres koşullarında ASC biyosentez inhibitörü AF ile birlikte ALA uygulanmış fidelerde, AF+PEG fidelerine göre H_2O_2 içeriğinin daha düşük olduğu bulundu (Şekil 9).

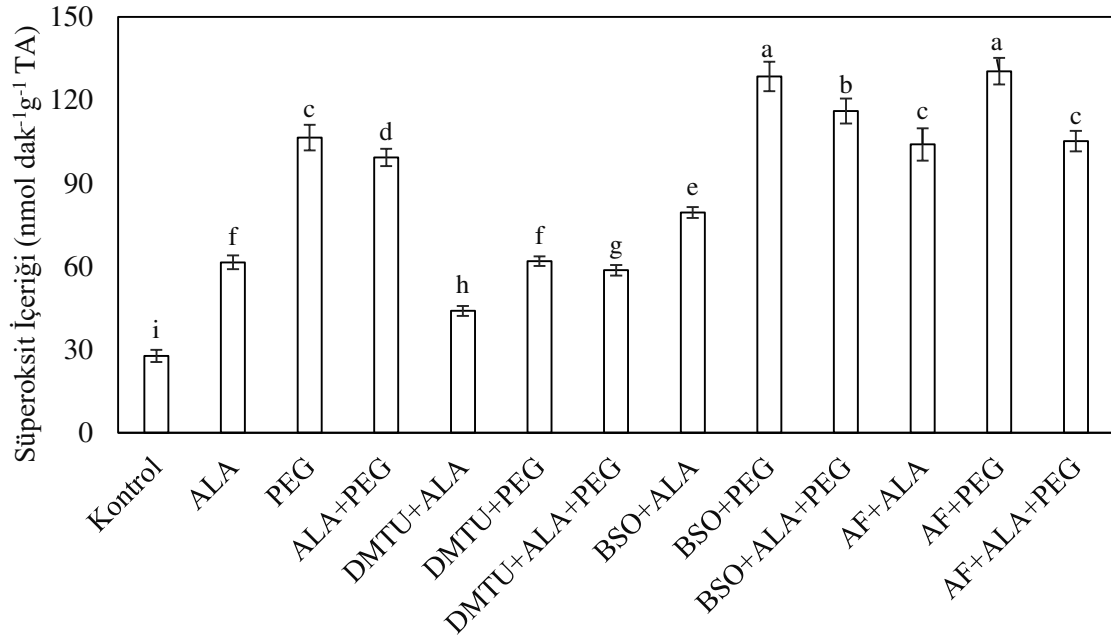


Şekil 9. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının H_2O_2 içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.1.2. Süperoksit İçeriği

ALA uygulanmış fidelerin süperoksit içeriğinin kontrole göre önemli derecede arttığı tespit edildi. PEG uygulaması yapılan fidelerin süperoksit içeriği ALA muamelesine göre artarken ALA+PEG fidelerinin süperoksit içeriği PEG'e göre azaldı (Şekil 10).

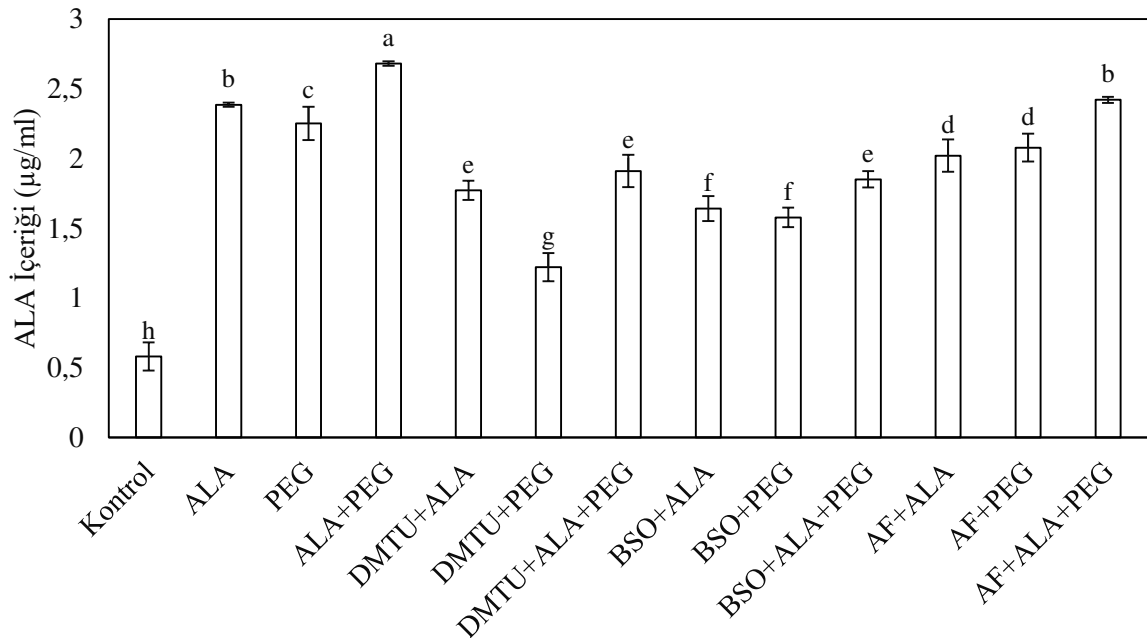
DMTU uygulamalarının süperoksit içeriğini hem stresli hem de stressiz koşullarda oksijen radikal temizleyicisi ve inhibitör uygulaması yapılmamış fidelere göre azalttığı görüldü. DMTU+PEG fideleri ile karşılaştırıldığında, DMTU+ALA+PEG fidelerinde süperoksit içeriğinin azaldığı tespit edildi. BSO+PEG fideleri ile karşılaştırıldığında, BSO+ALA+PEG fidelerinde süperoksit içeriğinin daha düşük olduğu belirlendi. Ayrıca, AF+PEG ile kıyaslandığında AF+ALA+PEG uygulanmış fidelerin süperoksit içeriğinin daha az olduğu bulundu (Şekil 10).



Şekil 10. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının süperoksit içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.1.3. Alfa Lipoik Asit Miktarı

ALA içeriğinin ALA uygulanan fidelerde kontrole göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Benzer şekilde, ALA+PEG fidelerinde PEG fidelerine göre daha fazla ALA içeriği tespit edildi (Şekil 11). ROT temizleyicisi DMTU ile birlikte ALA uygulanmış fidelerin içsel ALA içeriğinin ALA fidelerine göre daha az olduğu görüldü. DMTU+PEG fidelerinin ALA içeriğinin PEG fidelerinden daha düşük olduğu belirlendi. Benzer şekilde, DMTU+ALA+PEG fidelerinin ALA içeriğinin de ALA+PEG fidelerinden daha düşük olduğu gözlemlendi. Glutasyon inhibitörü BSO ile birlikte ALA uygulanmış fideler, ALA fideleri ile kıyaslandığında, içsel ALA içeriğinin daha az olduğu bulundu. BSO+PEG fidelerinin ALA içeriğinin PEG fidelerine daha az olduğu belirlendi. BSO+ALA+PEG fidelerinin ALA içeriğinin de ALA+PEG fidelerinden daha düşük olduğu tespit edildi. Askorbat biyosentez inhibitörü AF ile birlikte ALA uygulanmış fideler, ALA fideleri ile karşılaştırıldığında içsel ALA içeriğinin azaldığı görüldü. AF+PEG fidelerinin ALA içeriği PEG'e göre azalırken, AF+ALA+PEG fidelerinin ALA içeriğinin de ALA+PEG fidelerinden daha az olduğu belirlendi (Şekil 11).



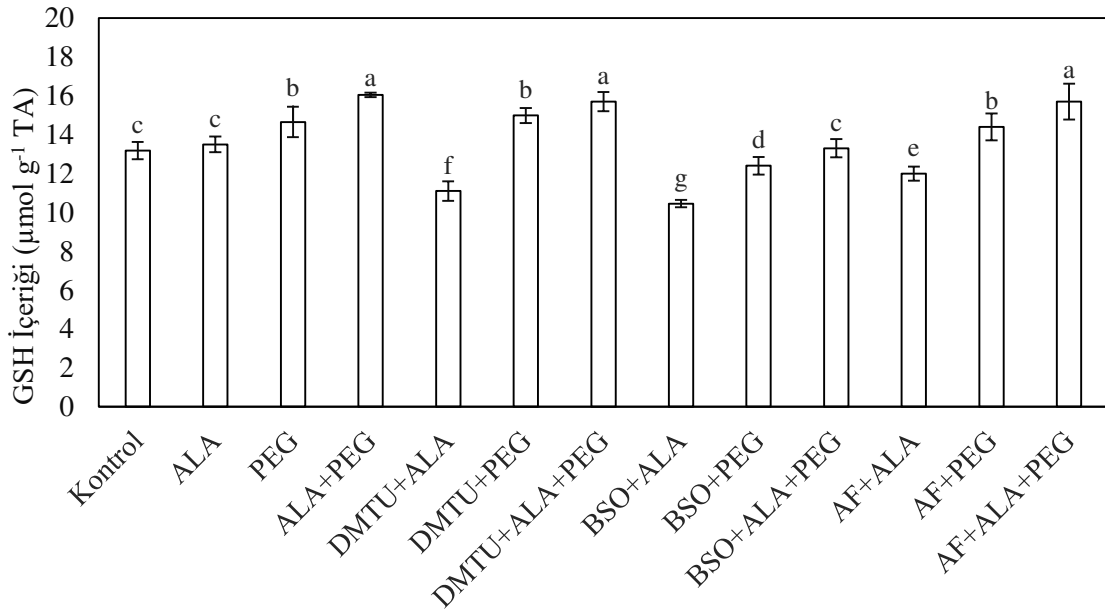
Şekil 11. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının ALA içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.2. Antioksidan Bileşiklerdeki Değişimler

3.2.1. Glutasyon İçeriği

ALA fidelerinin GSH içeriği kontrol fidelerine göre değişmezken, ALA+PEG fidelerinin GSH içeriği PEG fidelerine göre önemli derecede arttı (Şekil 12).

DMTU+ALA, BSO+ALA ve AF+ALA muameleleri ALA fideleri ile kıyaslandığında GSH içeriğinin azaldığı görüldü. DMTU+PEG fideleri ile karşılaştırıldığında, DMTU+ALA+PEG fidelerinde GSH içeriğinin daha yüksek olduğu belirlendi. BSO+PEG fideleri ile kıyaslandığında, BSO+ALA+PEG fidelerinde GSH içeriğinin önemli ölçüde arttığı bulundu. Ayrıca, AF+ALA+PEG uygulanmış fidelerde, AF+PEG fidelerine göre glutasyon içeriğinin daha yüksek olduğu bulundu. Ek olarak osmotik stres koşullarında DMTU muamelesi (DMTU+PEG) ile ROT ve AF muamelesi ile (AF+PEG) ASC inhibe edildiğinde, GSH içeriğinde inhibitör uygulanmamış gruba (PEG) göre önemli bir değişim gözlenmezken, BSO+PEG fidelerinin GSH içeriği PEG fidelerine göre azaldı (Şekil 12).



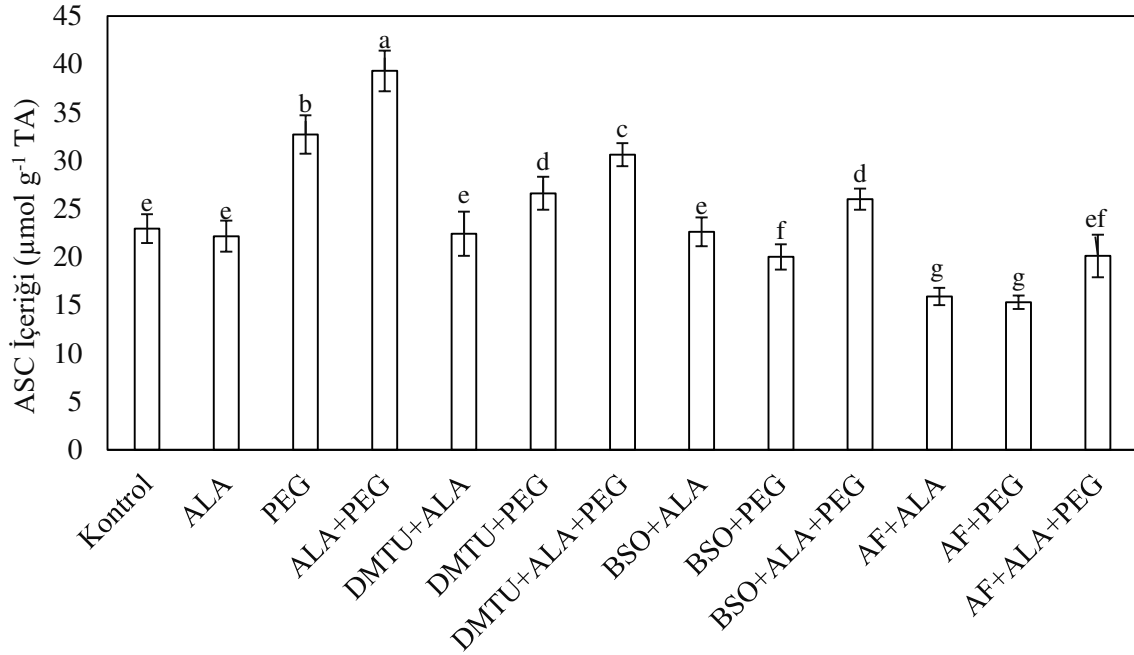
Şekil 12. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının glutasyon içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.2.2. Askorbat İçeriği

ALA fidelerinin ASC içeriğinde kontrole göre önemli bir değişim gözlenmedi. ALA+PEG fidelerinin ASC içeriği ise PEG'e göre önemli derecede arttı (Şekil 13).

Osmotik strese maruz bırakılan fidelerde DMTU, BSO ve AF uygulamalarının ASC içeriklerini radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulaması yapılmamış fidelere (PEG) göre azalttığı görüldü. ALA grubu fidelerle kıyaslandığında DMTU+ALA ile BSO+ALA fidelerinin ASC içeriğinde önemli bir değişim gözlenmezken AF+ALA fidelerinde azalış görüldü.

DMTU+PEG fidelerine göre DMTU+ALA+PEG fidelerinin, BSO+PEG fidelerine göre BSO+ALA+PEG fidelerinin, AF+PEG fidelerine göre ise AF+ALA+PEG fidelerinin ASC içeriklerinin daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 13).



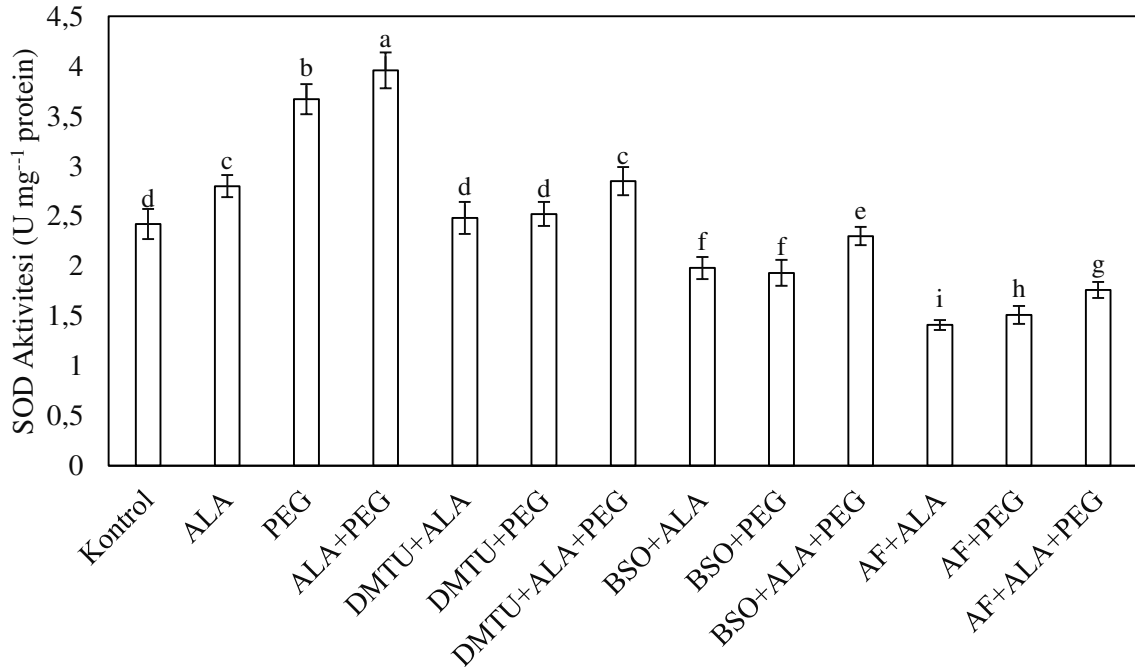
Şekil 13. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının askorbat içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.3. Antioksidan Enzim Aktivitelerindeki Değişimler

3.3.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

SOD aktivitesinin ALA uygulanan fidelerde kontrole göre arttığı belirlendi. Osmotik stres koşullarında (PEG), SOD aktivitesi kontrole göre artarken, bu artışın ALA+PEG fidelerinde daha fazla olduğu tespit edildi (Şekil 14).

Diğer taraftan, osmotik stresli ve stressiz koşullarda H_2O_2 ve süperoksit temizleyicisi DMTU, glutatyon inhibitörü BSO ve askorbat inhibitörü AF uygulamalarının SOD aktivitelerini radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulaması yapılmamış fidelere göre azalttığı görüldü. Ayrıca, AF uygulamalarında SOD aktivitesindeki azalışların diğer inhibitör uygulamalarına göre daha fazla olduğu belirlendi. DMTU+PEG fideleri ile karşılaştırıldığında, DMTU+ALA+PEG fidelerinde enzim aktivitesinin önemli ölçüde arttığı bulundu. BSO+PEG fideleri ile kıyaslandığında, BSO+ALA+PEG fidelerinde SOD aktivitesinin daha yüksek olduğu görüldü. Benzer şekilde, osmotik stres koşullarında ASC biyosentez inhibitörü AF ile birlikte ALA uygulanmış fidelerde, AF+PEG fidelerine göre SOD aktivitesinin daha fazla olduğu bulundu (Şekil 14).

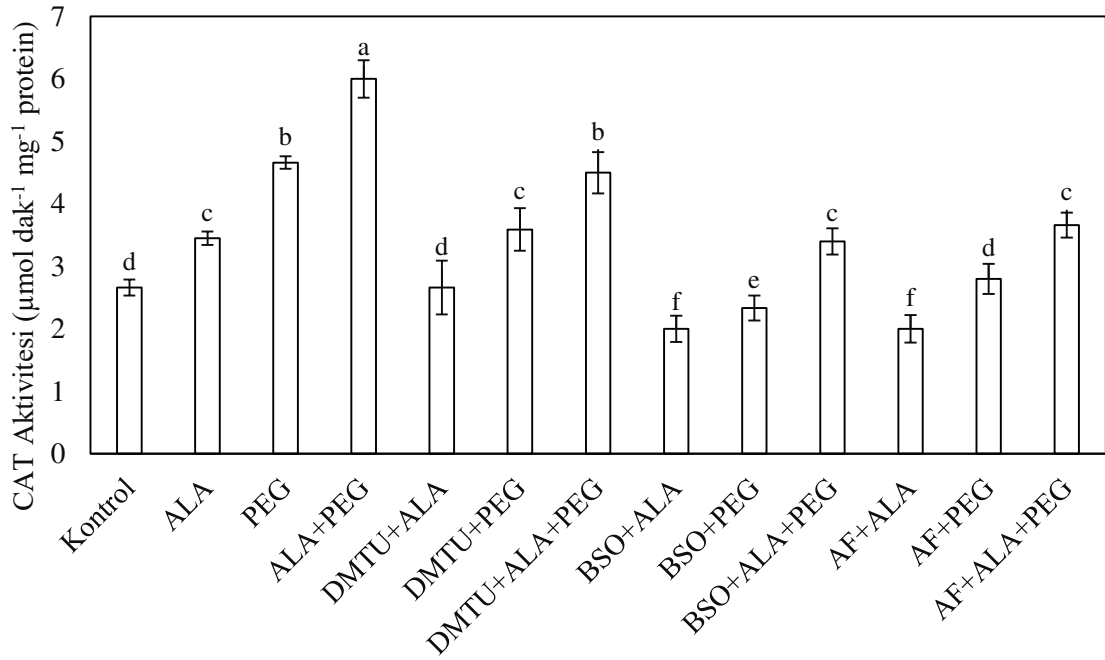


Şekil 14. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının SOD aktivitesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.3.2. Katalaz Aktivitesi

Osmotik stresli ve stressiz koşullarda ALA uygulamalarının CAT aktivitesini uygulama yapılmamış fidelere göre önemli derecede artırdığı tespit edildi (Şekil 15).

DMTU, BSO ve AF uygulamalarının CAT aktivitelerini radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulaması yapılmamış fidelere göre azalttığı görüldü. DMTU+PEG fiderleri ile karşılaştırıldığında, DMTU+ALA+PEG fiderlerinde CAT aktivitesinin önemli ölçüde arttığı bulundu. BSO+PEG fiderleri ile karşılaştırıldığında, BSO+ALA+PEG fiderlerinde enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca, osmotik stres koşullarında AF ile birlikte ALA uygulanmış fiderlerde, AF+PEG fiderlerine göre CAT aktivitesinin daha fazla olduğu bulundu (Şekil 15).

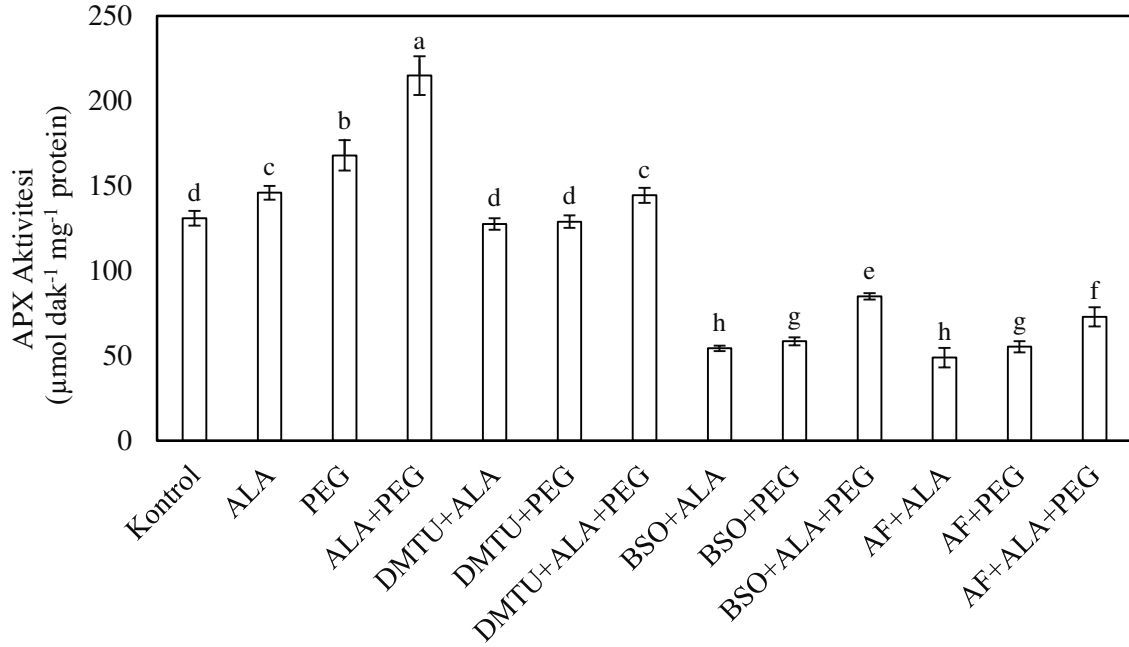


Şekil 15. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının CAT aktivitesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.3.3. Askorbat Peroksidaz Aktivitesi

ALA uygulaması yapılan fideler kontrole göre, ALA+PEG fideleri de PEG'e göre kıyaslandığında, APX aktivitesinde önemli artışlar gözlemlendi (Şekil 16).

DMTU, BSO ve AF uygulamalarının APX aktivitelerini radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulaması yapılmamış fidelere göre azalttığı görüldü. DMTU+PEG fideleri ile karşılaştırıldığında, DMTU+ALA+PEG fidelerinde APX aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlendi. BSO+PEG fideleri ile kıyaslandığında, BSO+ALA+PEG fidelerinde enzim aktivitesinin önemli ölçüde arttığı bulundu. Ayrıca, AF+ALA+PEG uygulanmış fidelerde, AF+PEG fidelerine göre APX aktivitesinin daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 16).

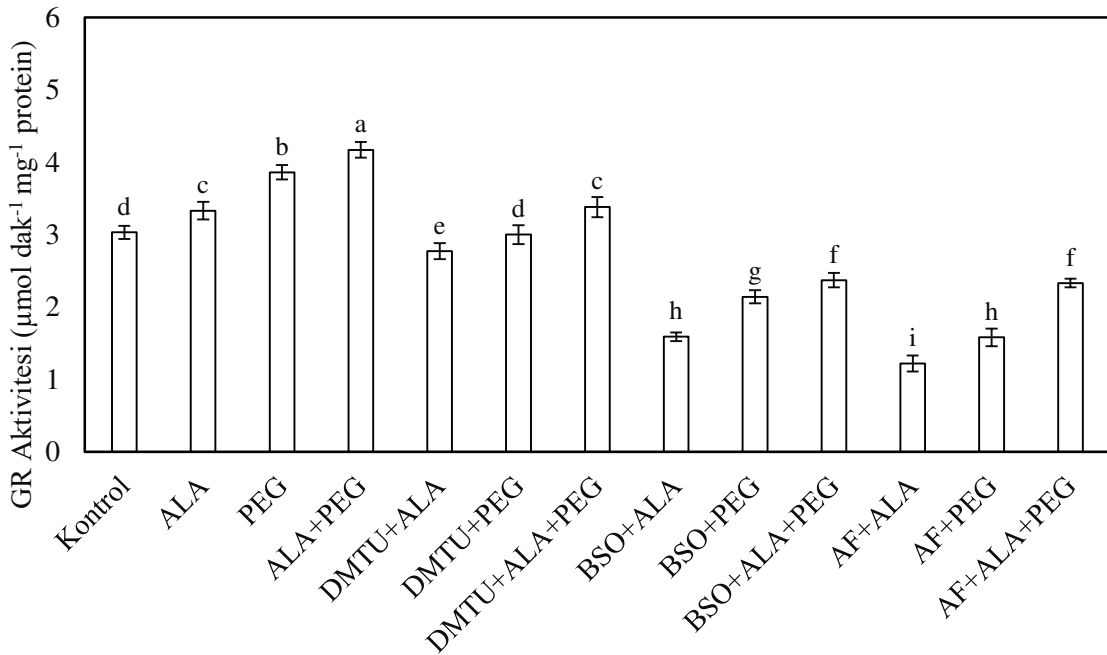


Şekil 16. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının APX aktivitesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.3.4. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi

GR aktivitesinin ALA uygulanan fidelerde kontrole göre arttığı belirlendi. Osmotik stres koşullarında (PEG), glutasyon redüktaz aktivitesi kontrole göre artarken, bu artışın ALA+PEG fidelerinde daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 17).

DMTU, BSO ve AF uygulamalarının GR aktivitelerini radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulaması yapılmamış fidelere göre azalttığı görüldü. DMTU+PEG fideleri ile kıyaslandığında, DMTU+ALA+PEG fidelerinde enzim aktivitesinin arttığı tespit edildi. BSO+PEG fideleri ile kıyaslandığında, BSO+ALA+PEG fidelerinde GR aktivitesinin daha yüksek olduğu görüldü. Benzer şekilde, osmotik stres koşullarında AF ile birlikte ALA uygulanmış fidelerde, AF+PEG fidelerine göre GR aktivitesinin önemli ölçüde arttığı bulundu (Şekil 17).

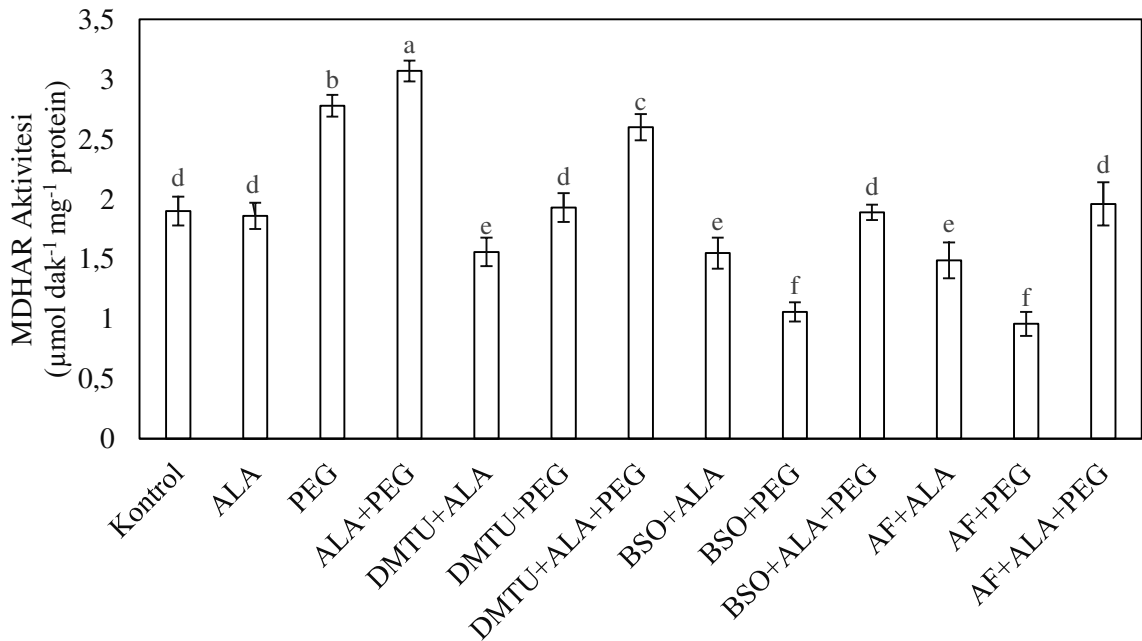


Şekil 17. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının GR aktivitesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.3.5. Monodehidroaskorbat Redüktaz Aktivitesi

MDHAR aktivitesi ALA uygulaması yapılan fidelerde kontrole göre istatistiki olarak değişmezken, ALA+PEG fideleri PEG fideleri ile kıyaslandığında, MDHAR aktivitesinde önemli artış gözlemlendi (Şekil 18).

DMTU, BSO ve AF uygulamalarının MDHAR aktivitelerini radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulaması yapılmamış fidelere göre azalttığı görüldü. DMTU+PEG fideleri ile kıyaslandığında, DMTU+ALA+PEG fidelerinde MDHAR aktivitesinin arttığı bulundu. BSO+PEG fideleri ile kıyaslandığında, ALA+BSO+PEG fidelerinde enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlendi. AF+ALA+PEG uygulanmış fidelerde, AF+PEG fidelerine göre MDHAR aktivitesinin daha fazla olduğu tespit edildi (Şekil 18).

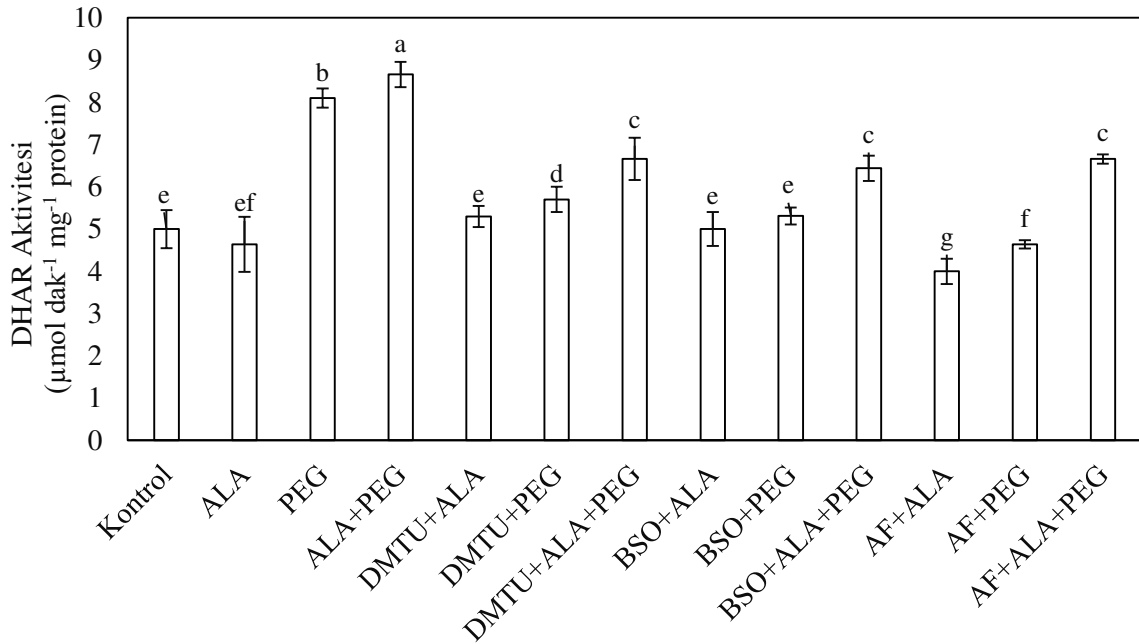


Şekil 18. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının MDHAR aktivitesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.3.6. Dehidroaskorbat Redüktaz Aktivitesi

DHAR aktivitesi ALA uygulanan fidelerde kontrole göre istatistiki olarak değişmezken, PEG fidelerinde artan DHAR aktivitesinin ALA+PEG fidelerinde daha fazla olduğu tespit edildi (Şekil 19).

Osmotik strese maruz bırakılan fidelere H_2O_2 ve süperoksit temizleyicisi DMTU, glutatyon inhibitörü BSO ve askorbat inhibitörü AF uygulamalarının DHAR aktivitelerini radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulaması yapılmamış fidelere göre azalttığı görüldü. ALA grubu fidelerle kıyaslandığında DMTU+ALA ile BSO+ALA fidelerinde önemli bir değişim gözlenmedi. Diğer taraftan, DMTU+PEG fideleri ile karşılaştırıldığında, DMTU+ALA+PEG fidelerinde enzim aktivitesinin arttığı tespit edildi. BSO+PEG fideleri ile karşılaştırıldığında, BSO+ALA+PEG fidelerinde DHAR aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlendi. AF+ALA+PEG fidelerindeki DHAR aktivitesinin AF+PEG fidelerine göre daha fazla olduğu bulundu (Şekil 19).



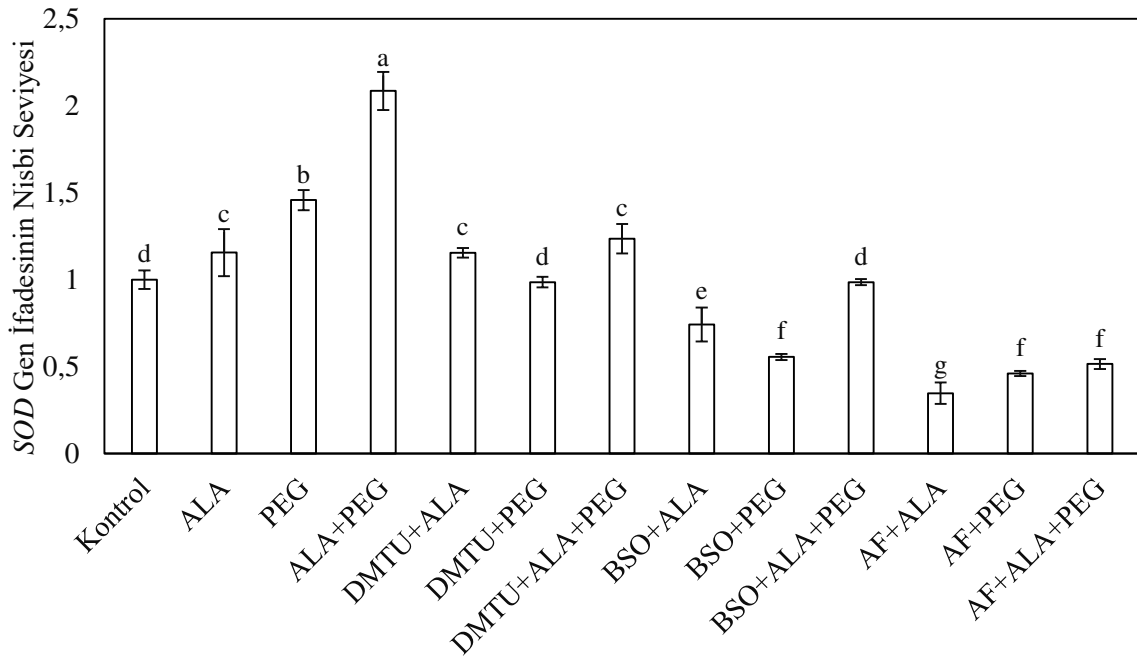
Şekil 19. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının DHAR aktivitesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.4. Antioksidan Gen İfadelerindeki Değişimler

3.4.1. *SOD* Gen İfadesi

Mısır yapraklarındaki antioksidan sistemle ilgili enzimleri kodlayan genlerin ifade düzeylerinde meydana gelen değişim, house-keeping gen olan aktin geninin ifade seviyesinde meydana gelen değişime göre göreceli olarak tespit edildi.

Osmotik stres koşullarında artan *SOD* gen ifadesinin ALA muamelesi ile daha da arttığı görüldü. DMTU, AF ve BSO uygulamalarının hem stresli hem de stressiz koşullarda radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulaması yapılmamış fidelere göre *SOD* gen ifadesini azalttığı belirlendi. DMTU+PEG fiderleri ile karşılaştırıldığında DMTU+ALA+PEG fiderlerinde *SOD* gen ifade seviyesinin daha fazla olduğu bulundu. Benzer şekilde, BSO+PEG fiderleri ile kıyaslandığında BSO+ALA+PEG fiderlerinin *SOD* gen ifadesinin daha yüksek olduğu belirlendi. AF+PEG'e göre AF+ALA+PEG fiderlerinin gen ifade seviyesinde önemli bir değişim gözlenmedi (Şekil 20).

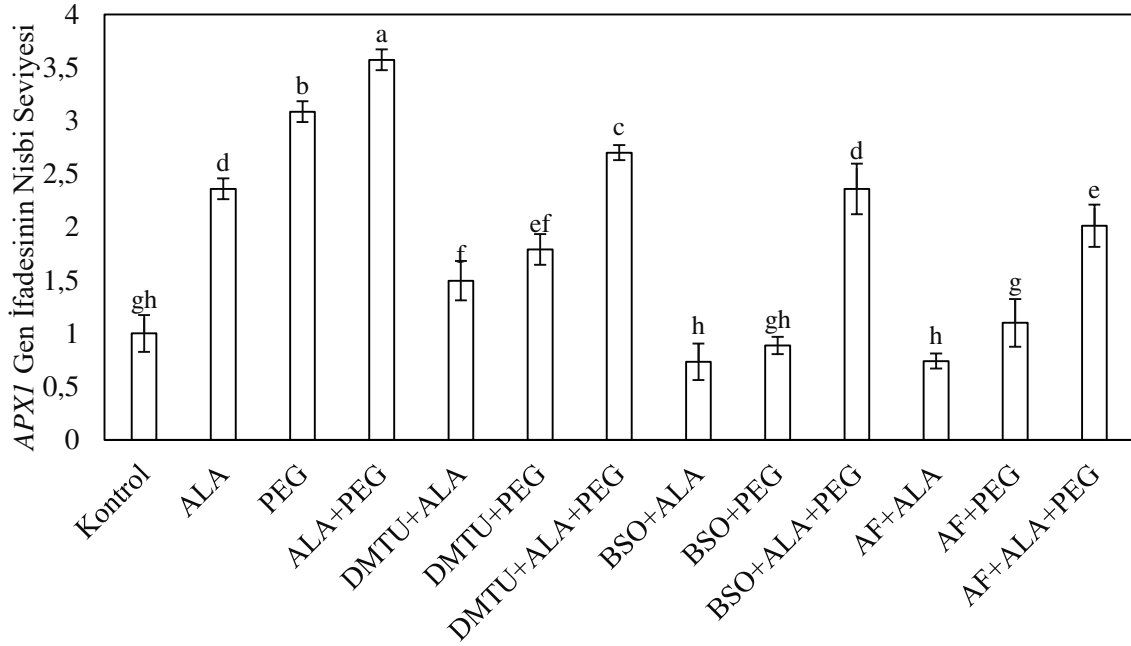


Şekil 20. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının *SOD* gen ifadesinin nispi seviyesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.4.2. *APX1* Gen İfadesi

APX1 gen ifadesi nispi seviyesine bakıldığında, ALA uygulaması yapılan fideler kontrole göre, ALA+PEG fideleri de PEG'e göre kıyaslandığında önemli artışlar belirlendi (Şekil 21).

Stresli ve stressiz koşullarda DMTU, AF ve BSO uygulamalarının radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulaması yapılmamış fidelere göre *APX1* gen ifadesinin nispi seviyesini azalttığı görüldü. DMTU+PEG fideleri ile karşılaştırıldığında, DMTU+ALA+PEG fidelerinde *APX1* gen ifadesi seviyesinin daha fazla olduğu belirlendi. BSO+PEG fideleri ile kıyaslandığında, BSO+ALA+PEG fidelerinde gen ifadesi seviyesinin önemli ölçüde arttığı bulundu. AF+PEG fidelerine göre AF+ALA+PEG uygulanmış fidelerde *APX1* gen ifadesinin daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 21).

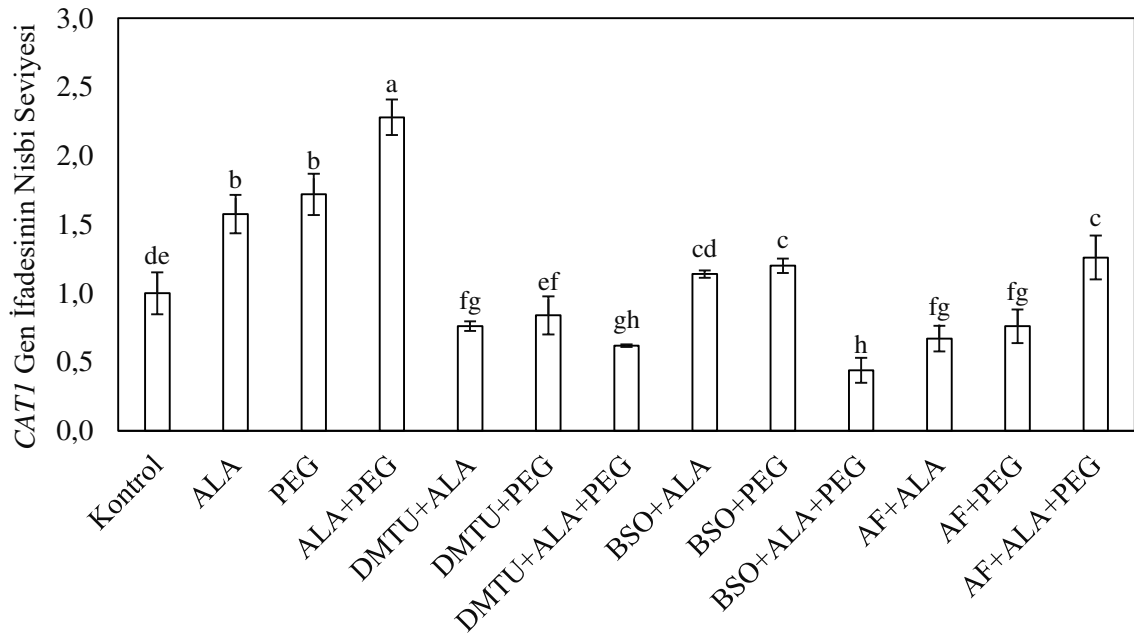


Şekil 21. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının *APX1* gen ifadesinin nispi seviyesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.4.3. *CAT1* Gen İfadesi

Osmotik stresli ve stressiz koşullarda ALA uygulamalarının *CAT1* gen ifadesinin nispi seviyesini uygulama yapılmamış fidelere göre artırdığı belirlendi (Şekil 22).

Stresli ve stressiz koşullarda, DMTU, AF ve BSO uygulamalarının *CAT1* gen ifadesinin nispi seviyesini radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulaması yapılmamış fidelere göre azalttığı görüldü. DMTU+PEG fideleri ile karşılaştırıldığında, DMTU+ALA+PEG fidelerinde gen ifadesi nispi seviyesinin azaldığı bulundu. BSO+PEG fideleri ile karşılaştırıldığında, BSO+ALA+PEG fidelerinde gen ifadesinin daha düşük olduğu belirlendi. Aksine, osmotik stres koşullarında AF ile birlikte ALA uygulanmış fidelerde, AF+PEG fidelerine göre *CAT1* gen ifadesi seviyesinin daha fazla olduğu bulundu (Şekil 22).



Şekil 22. Oksijen radikal temizleyicisi, inhibitör ve ALA uygulamalarının *CAT1* gen ifadesinin nispi seviyesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

4. TARTIŞMA

Bitkilerin osmotik strese cevabında antioksidan bir bileşik olan ALA sinyalizasyonu ile ROT ve antioksidan bileşikler (ASC ve GSH) arasındaki etkileşimin belirlenmesi ve bu etkileşimin antioksidan sistemin bileşenleri üzerine etkisinin ortaya konulması amacıyla osmotik stres koşullarındaki mısır fidelerine dıştan ALA ile birlikte ROT temizleyicisi, GSH ve ASC inhibitörleri uygulanmıştır. Mevcut çalışmada, ALA'nın sinyal rol oynayan ROT'lar ile etkileşerek ya da ASC ve GSH gibi yine sinyal özelliğe sahip antioksidan bileşikler aracılığıyla antioksidan sistemi uyarabileceği ve böylece ASC-GSH döngüsüne dahil olabileceği hipotez olarak düşünülmektedir. Hipotezi test etmek için, DMTU, BSO ve AF uygulamalarıyla sırasıyla ROT, GSH ve ASC seviyeleri azaltılmış ve dıştan ALA uygulanarak osmotik strese maruz bırakılan fidelerde antioksidan sistemin bileşenlerindeki (ROT seviyeleri, ALA içeriği, ASC ve GSH miktarları, bazı antioksidan enzim aktiviteleri ve gen ifadeleri) değişimler belirlenmiştir.

Çalışmamızda antioksidan sistemin bileşenleri olarak öncelikle ROT (H_2O_2 ve süperoksit) seviyelerindeki değişimler tespit edilmiştir. Stressiz koşullarda ALA uygulamasının reaktif oksijen türlerinden olan H_2O_2 ve süperoksit içeriklerini artırdığı, strese maruz bırakılan fidelerde ise ALA muamelesinin ROT seviyesini azalttığı belirlenmiştir. Stres koşullarında ALA muamelesiyle ROT seviyesindeki azalma muhtemelen ALA'nın antioksidan özelliğinden kaynaklanmaktadır. Strese maruz kalan bitkilerde ALA'nın serbest radikalleri doğrudan temizleyerek ve antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak bitkileri osmotik stresten koruyabileceği ileri sürülmüştür. Görcek ve Erdal (2015) dıştan uygulanan ALA'nın H_2O_2 ve süperoksit içeriğini önemli ölçüde azalttığını ve ALA'nın tuz stresli buğday fidelerinde oksidatif hasara ve metabolik bozulmalara karşı katkı sağladığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde, ALA'nın antioksidan özelliği sayesinde maya hücrelerinde oksidanlara (özellikle H_2O_2 'e) karşı koruyucu ve antimutajenik etkilere sahip olabileceği gösterilmiştir (Della Croce vd., 2003). Diğer taraftan, son yıllarda yapılan bir çalışmada, ALA'nın abiyotik stres koşullarında antioksidan sistemi indükleyen potansiyel bir sinyal molekülü olabileceği bildirilmiştir (Terzi vd., 2018). Stressiz koşullarda ALA muamelesiyle ROT seviyesindeki artış ALA'nın etkinliğinin ROT sinyalizasyonu ile gerçekleşebileceğini düşündürmektedir. Mısır fidelerine DMTU uygulaması yapıldığında H_2O_2 ve süperoksit seviyelerinin azaldığı gözlemlenmiştir. BSO ve AF muameleleri ile sırasıyla glutasyon ve

askorbat seviyelerindeki azalışların ROT seviyelerinde artışlara neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, osmotik stres koşullarında radikal temizleyicisi (DMTU) veya inhibitör (BSO veya AF) maddelerle birlikte ALA uygulandığında H_2O_2 ve süperoksit seviyelerinin ALA uygulanmamış fidelere göre azaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgular, ALA'nın stressiz koşullarda ROT sinyalizasyonunu uyarabileceğine, strese maruz kalan bitkilerde ise ROT'ların temizlenmesine katkılabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmamızda antioksidan maddelerden biri olan alfa lipoik asit içeriğindeki değişim belirlenerek dıştan uygulanan ALA'nın içsel ALA seviyesini nasıl etkilediği saptanmıştır. Ayrıca, ALA sinyalizasyonunda ROT'lar ya da GSH ve ASC arasındaki etkileşimlerin açıklanmasına yönelik olarak ALA içeriğindeki değişimler belirlenmiş ve osmotik stres koşullarında kontrole göre ROT seviyesi artarken ALA içeriğinin de arttığı bulunmuştur. Söz konusu artış ROT'ların ALA sentezini uyarabileceğine işaret etmektedir. DMTU muameleleri ile ROT seviyeleri azaltıldığında ALA içeriğinin de azaldığı belirlenmiştir. ROT ve ALA içeriğindeki değişimler üzerine elde edilen bulgular, ALA'nın ROT sinyalizasyonunu harekete geçirerek antioksidan sistemi uyarabileceği hipotezini desteklemektedir. Ek olarak, çalışmamızda GSH ve ASC inhibitörleri uygulandığında ALA içeriklerinin daha az olduğunun gözlenmesi, ALA'nın GSH ve ASC sinyalizasyonuna dahil olabileceği ve böylece antioksidan sistemi uyarabileceği hipotezini desteklemektedir.

Bitkiler antioksidan enzimlerin yanı sıra antioksidan aktiviteye sahip birçok düşük molekül ağırlıklı bileşik bakımından da zengindir. ASC ve GSH, peroksidazların H_2O_2 ile hızla reaksiyona girmelerini sağladığı ve oksitlenmiş formları yüksek kapasiteli indirgemelerle yeniden üretildiği için bitkilerde bulunan antioksidan moleküller arasında kilit aktörlerdir. Bu özellikler ASC ve GSH'ı diğer antioksidanlardan ayırır, çünkü tekrarlanan redoks döngüsünün ve genel hücre redoks durumunun etkili bir şekilde düzenlemesini sağlarlar (Soares vd., 2019). GSH homeostazı, hücreleri oksidatif strese karşı korumada merkezi bir rol oynar. Bu nedenle ALA'nın antioksidan sistemi uyarmada hücredeki GSH ile nasıl bir etkileşiminin olduğunun anlaşılması önemlidir. ALA'nın GSH sentezinde görev alan genlerin bir transkripsiyonel indükleyicisi olarak hareket ederek ve potansiyel olarak substrat kullanılabilirliğini artırarak hücresel GSH seviyelerini artırdığı bildirilmiştir (Podda vd., 1994; Sen vd., 1997). Aynı zamanda ALA'nın, glutatyon sentezinde hız sınırlayıcı enzim olan γ -glutamilsistein ligazın (γ -GCL) ifadesini yukarı düzenleyerek ve glutatyon sentezi için gerekli amino asit olan sisteinin hücresel alımını artırarak glutatyon sentezini artırabileceği rapor edilmiştir (Suh vd., 2004). Mevcut

çalışmada, osmotik stres koşullarında GSH seviyesinin arttığı, bu artışın ALA uygulamasından sonra daha fazla olduğu belirlenmiştir. ALA'nın GSH içeriğini artırarak GR ve DHAR aktivitelerini uyarabildiği ifade edilebilir. Nitekim osmotik stres koşullarındaki bitkilerde GSH konsantrasyonunun arttığı ve bu artışın ASC-GSH yolundaki enzim aktivitelerindeki değişimle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Kadioglu vd. 2011). Bulgularımıza benzer şekilde Packer ve Cadenas (2011) E ve C vitaminleri gibi diğer antioksidanları yeniden oluşturabilen ALA'nın, hücre içi GSH seviyelerini artırma ve proteinlerin ve transkripsiyon faktörlerinin redoks düzenlemesini sağlama kabiliyeti nedeniyle antioksidan ağının kritik bir bileşeni olabileceğini ileri sürmüştür. Gorcek ve Erdal (2015) tuz stresine maruz kalan buğday fidelerinde toplam GSH ile okside form GSSG içeriklerinin arttığını, indirgenmiş form GSH'ın azaldığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte ALA uygulamasının hem toplam GSH hem de indirgenmiş GSH içeriğini artırdığını, okside form GSSG içeriğini ise azalttığını rapor etmişlerdir. Böylece ALA'nın hem GR aktivitesini artırarak hem de kendi redoks potansiyeli sayesinde GSH'yi yeniden oluşturduğunu ve böylece hücrel redoks durumunun korunmasına ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sisteminin iyileştirilmesine katkıda bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Mevcut çalışmada, osmotik stres koşullarında DMTU, BSO ve AF muameleleri ile ROT, GSH ve ASC miktarı azaltıldığında, ALA muamelelerinin GSH içeriklerini önemli ölçüde artırdığı görülmüştür. Stres koşullarında radikal temizleyicisi veya inhibitörler aracılığıyla sırasıyla ROT, GSH ve ASC seviyesi azaltıldığında ALA'nın GSH seviyesini artırması ALA'nın ROT ya da GSH ve ASC ile etkileşerek antioksidan sistemi uyarabileceği hipotezini doğrulamaktadır. Diğer taraftan, Yan vd., (2018) tuz stresli domates fidelerine GSH uygulamasının kloroplastta hücrel redoks durumunun korunmasına ve çözünür sülfhidril gruplarını ve membran proteinlerini indirgeyerek stres hasarlarının hafifletilmesine katkı sağladığını rapor etmişlerdir. Böylece ALA'nın antioksidan sistemin bileşenlerini etkileyerek su kaybı hasarlarını azaltabileceği de ifade edilebilir.

Bitkileri streslerden koruyan antioksidan kapasiteyi sürdürmek için yüksek düzeyde içsel ASC seviyesine gereksinim duyulmaktadır (Zhou vd., 2009). Çalışmamızda osmotik stresin etkisiyle mısır fidelerinde ALA içeriği artarken ASC içeriğinin de arttığı, ALA uygulamasıyla ASC içeriğinin daha fazla arttığı kaydedilmiştir. ASC içeriğindeki artış, APX etkinliğinin korunmasında önemli bir rol oynayabilir. Strese maruz kalan bitkilerde ALA içeriğindeki değişimler üzerine yapılan sınırlı çalışmalardan birinde bulgularımızın aksine, tuz stresi ve yüksek CO₂ konsantrasyonuna maruz bırakılan buğday fidelerinde ALA içeriği

artarken ASC içeriğinin azaldığı ve oksidatif stres etkilerinin hafiflediği ileri sürülmüştür (Pérez-López vd., 2010). Bitkilerde ALA muamelesinin ASC seviyesine etkisi üzerine de oldukça sınırlı sayıda çalışma bildirilmiştir. Örneğin, tuz stresine maruz bırakılan buğday fidelerinde ALA uygulamasının toplam ASC ve indirgemiş ASC seviyelerinde artışa, okside form DHA seviyesinde azalışa neden olduğu belirlenmiştir (Gorcek ve Erdal 2015). Turk vd. (2018) kurşun toksisitesi altındaki buğday köklerinde ASC ve ASC/DHA oranının azaldığını, ALA uygulamasıyla bu değişimin tersine döndüğünü, ASC ve ASC/DHA’da belirgin bir artışın olduğunu kaydetmişlerdir. Mevcut çalışmada osmotik strese maruz kalan fidelede, ROT, ASC ve GSH seviyeleri azaltıldığında ASC içeriğinin radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulanmayan fidelere kıyasla daha az olduğu bulunmuştur. Ek olarak, stres koşullarında radikal temizleyicisi veya inhibitör maddelerle birlikte ALA muamelesinin ALA uygulanmamış fidelere göre ASC içeriğini artırması ALA’nın ROT ya da ASC ve GSH gibi sinyal moleküller aracılığıyla antioksidan enzim aktivitelerini ve gen ifadelerini uyarabileceği fikrini desteklemektedir. ALA’nın ASC’nin rejenerasyonunu hızlandırdığını ve diğer antioksidan bileşiklerle redoks etkileşimi sayesinde ROT detoksifikasyonunu aktive edebildiği de düşünülebilir.

Bitkiler, ROT üretimini sınırlayan ve onları hücrel ortamdan uzaklaştıran karmaşık antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmiştir. ROT detoksifikasyonunda kritik rol oynayan enzimatik antioksidanların oksidatif stresle mücadele etmek ve hücrel homeostazı korumak için aktivitelerini arttığı gözlenmiştir (Blokina vd., 2003; Almeselmani vd., 2006). Mevcut çalışmada osmotik stres koşullarında ASC-GSH döngüsü enzimleri APX, GR, DHAR ve MDHAR aktiviteleri ile SOD ve CAT enzim aktivitelerinin arttığı, ALA uygulamasıyla bu artışların daha fazla olduğu bulundu. ALA uygulanan mısır fidelerinde yüksek antioksidan enzim aktiviteleri içsel ROT seviyesindeki azalışlarla uyumludur. Bu da, dıştan uygulanan ALA’nın antioksidan enzim aktivitelerini uyarak ROT’ları temizlediğini göstermektedir. Dıştan uygulanan ALA’nın antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Örneğin, Gorcek ve Erdal (2015) tuz stresine maruz bırakılan buğday fidelerinde ALA’nın antioksidan sistemi uyarak oksidatif hasarı hafiflettiğini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, Terzi vd., (2018) osmotik stres koşullarındaki mısır fidelerine uygulanan ALA’nın antioksidan enzim aktivitelerini uyarak H₂O₂ içeriğini azalttığını bildirmişlerdir. ALA’nın antioksidan enzim aktivitesini uyardığını gösteren kayıtların aksine, Turk vd. (2018) yaptıkları çalışmada buğday köklerine uygulanan ALA’nın antioksidan enzimleri uyarmak

yerine kendi radikal temizleme özelliklerini kullanarak veya diğer antioksidan bileşiklerle redoks etkileşimi sayesinde kurşun toksisitesine toleransın geliştiğini kaydetmişlerdir.

Çalışmamızda bazı antioksidan genlerin (*SOD*, *APX1* ve *CAT1*) ifade seviyelerindeki değişimler de belirlenmiştir. Antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimlere paralel olarak *SOD1* ve *APX1* enzimlerini kodlayan genlerin nispi ifade seviyelerinde de benzer değişimlerin olduğu bulunmuştur. *CAT1* gen ifadesi bulguları ise stres koşullarında oksijen radikal temizleyicisi veya inhibitör muameleri ile ROT ve GSH seviyeleri azaltıldığında ALA'nın *CAT1* gen ifadesinin nispi seviyesini azalttığı, ASC seviyesi azaltıldığında ise *CAT1* gen ifadesinin nispi seviyesini artırdığını göstermiştir. Bulgularımız osmotik stres altında radikal temizleyicisi veya inhibitörler aracılığıyla ROT, GSH ve ASC seviyelerinin azaltılmasıyla antioksidan enzim aktivitelerinin ve antioksidan enzimleri kodlayan genlerin ifadeleri dahil olmak üzere mısır fidelerinde savunma cevaplarının önemli ölçüde inhibe edildiğini göstermiştir.

Sonuç olarak, mevcut çalışmada ALA'nın sinyal ağını aydınlatmak için radikal temizleyicisi veya inhibitör maddeler kullanılarak elde edilen bulgular, ALA'nın muhtemelen ROT seviyesi azaltıldığında ASC ve GSH aracılığıyla SOD, CAT ve ASC-GSH döngüsü enzimlerini uyarabileceğine işaret etmektedir. ASC ve GSH seviyeleri azaltıldığında ise ALA uygulaması ile tüm enzim aktiviteleri ve antioksidan sistem bileşenlerinde ALA uygulanmamış gruplara göre gözlenen artış ALA'nın ROT sinyalizasyonu ile antioksidan sistemi uyarabileceği fikrini desteklemektedir. ALA'nın osmotik strese karşı toleransı artırmak için ROT sinyali ve GSH ve ASC gibi diğer sinyal bileşikler ile etkileşerek antioksidan enzim aktiviteleri, antioksidan gen ifadelerinin seviyeleri ve antioksidan maddeleri uyardığını ve böylece ASC-GSH döngüsüne dahil olarak savunma mekanizmasının bir parçası olduğunu ortaya koymaktadır.

5. SONUÇLAR

1. Stressiz koşullarda ALA muamelesinin ROT (H_2O_2 ve süperoksit) içeriğini artırdığı, osmotik stres koşullarında ise ALA'nın ROT içeriğini azalttığı belirlendi. Oksijen radikal temizleyicisi DMTU uygulamaları ile azalan ROT içeriğinin ALA uygulamasıyla daha fazla azaldığı tespit edildi. Stres koşullarında GSH biyosentez inhibitörü BSO ve ASC biyosentez inhibitörü AF aracılığıyla sırasıyla GSH ve ASC seviyeleri azaldığında ise artan ROT içeriğinin ALA muamelesiyle azaldığı saptandı.
2. Stressiz ve stresli koşullarda ALA muamelesinin içsel ALA içeriğini artırdığı görüldü. Ayrıca, strese maruz kalan fidelerde radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulamaları ile sırasıyla ROT, GSH ve ASC seviyeleri azaltıldığında ALA içeriğinin azaldığı ancak dıştan ALA uygulamasının içsel ALA içeriğini artırdığı bulundu.
3. Osmotik stres koşullarında ALA muamelesinin GSH içeriğini artırdığı, radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulamaları ile sırasıyla ROT, GSH ve ASC miktarları azaltıldığında ALA muamelelerinin GSH seviyesini artırdığı, stressiz koşullarda ise GSH seviyesini azalttığı belirlendi.
4. Osmotik stres koşullarında ALA muamelesinin ASC içeriğini artırdığı, radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulamaları ile sırasıyla ROT, GSH ve ASC miktarları azaltıldığında, ASC içeriğinin azaldığı ancak dıştan ALA uygulandığında ASC içeriğinin arttığı bulundu.
5. Osmotik stres koşullarında, ALA muamelesinin SOD, CAT, APX, GR, MDHAR ve DHAR enzim aktivitelerini artırdığı saptandı.
6. Osmotik stres koşullarında, radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulamaları ile ROT, GSH ve ASC seviyeleri azaltıldığında, SOD, CAT, APX, GR, MDHAR ve DHAR enzim aktivitelerinin azaldığı, radikal temizleyicisi veya inhibitör maddelerle birlikte ALA muamelesinin ise enzim aktivitelerini artırdığı görüldü.
7. Osmotik stres koşullarında ALA muamelesinin *SOD*, *CAT1* ve *APX1* gen ifadelerinin nispi seviyelerini artırdığı saptandı.
8. Osmotik stres koşullarında radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulamaları ile ROT, GSH ve ASC seviyeleri azaltıldığında, *SOD* ve *APX1* gen ifadelerinin nispi seviyelerinin azaldığı, radikal temizleyicisi veya inhibitör maddelerle birlikte ALA muamelesinin ise *SOD* ve *APX1* gen ifadelerinin nispi seviyelerini artırdığı bulundu.

9. Osmotik stres koşullarında radikal temizleyicisi veya inhibitör uygulamaları ile gen ifadelerinin nispi seviyesinin azaldığı görüldü. Osmotik strese maruz bırakılan fidelerde, radikal temizleyicisi veya inhibitör muameleri ile ROT ve GSH seviyeleri azaltıldığında ALA'nın *CAT1* gen ifadesinin nispi seviyesini azalttığı, ASC seviyesi azaldığında ise artırdığı tespit edildi.
10. ALA'nın sinyal rol oynayan ROT'lar ile etkileşerek ya da GSH ve ASC gibi antioksidan bileşikler aracılığıyla antioksidan sistemi uyarabileceği ve böylece ASC-GSH döngüsüne dahil olabileceği sonucuna varıldı.



6. ÖNERİLER

Mısır hem besin kaynağı hem de farklı amaçlar doğrultusunda kullanımı yaygın bitkilerden biridir. Dünyada olduğu gibi, ülkemizde de mısır verimini kısıtlayan en önemli faktör su kıtlığıdır. Özellikle çiçeklenme döneminde su bulunmaması ciddi derecede verim kaybına neden olmaktadır. Tarımsal alanda kullanılan bitkilerin osmotik toleranslarının artırılması ve bitkilerden yeterli verimin alınabilmesi için çeşitli fizyolojik, moleküler ve biyokimyasal analizlerin yapılması gerekmektedir.

Dıştan ALA uygulamasının bitki büyüme ve gelişimine etkileri ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu tez çalışmasında, ALA ile ROT ve antioksidan bileşikler arasındaki etkileşim belirlenmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre, ALA'nın hem reaktif oksijen türleri hem de askorbat glutatyon gibi antioksidan maddelerle etkileştiği ve böylece antioksidan sistemi uyararak mısır fidelerinin stres toleransına katkıda bulunabileceği sonucuna varılmıştır. Mevcut çalışmamız, dıştan uygulanan ALA'nın osmotik stres koşullarındaki bitkilerde sinyal iletim mekanizmalarının daha anlaşılır olmasına katkı sağlayacağını ve mısır üretimindeki verimi arttıracaklarını göstermektedir. Sonuç olarak verilerimiz osmotik strese tolerans mekanizmalarının belirlenmesi amacıyla yapılacak araştırmalara ışık tutacaktır.

ALA'nın bitkilerdeki stres toleransına karışan metabolik yollar üzerine literatürde çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma verilerine dayanarak, ALA'nın hücre içindeki kalsiyum ile fosfatidik asit gibi diğer sinyal bileşiklerle etkileşiminin araştırılması önerilmektedir. Diğer taraftan, ALA'nın mineral besin alınımını nasıl etkilediğinin bilinmesi strese toleranslı bitki türlerinin geliştirilmesi için önemli olabilir. Ayrıca, stres koşullarında ALA muamelesinin fenolik asit ya da yağ asiti içeriği gibi bitkilerde stres toleransına katkı sağlayan bazı maddeler üzerine etkileri konusunda yapılan herhangi bir çalışma bulunmaması nedeniyle bu analizlerin HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmesi önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Abd El Baky, H., Nofal, O. ve El Baroty, G., 2016. Enhancement of Antioxidant Enzymes Activities, Drought Stress Tolerances and Quality of Potato Plants as Response to Algal Foliar Application. Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture, 8, 70-77.
- Abeles, FB., Morgan, PW. ve Saltveit, ME Jr., 1992. Ethylene in Plant Biology 2nd edn. Academic Press, San Diego, Calif. 55-173.
- Aebi, H. E., 1983. Catalase. Methods of Enzymatic Analysis, In: Bergmeyer, H. U. (Ed), 273-286, Weinherm: Verlag Chemie.
- Agarwal, P. ve Jha, B., 2010. Transcription Factors in Plants and ABA Dependent and Independent Abiotic Stress Signalling. Biologia Plantarum, 54, 201-212.
- Ahmad, P. ve Sharma, S., 2008. Salt stress and Phyto-biochemical Responses of Plants. Plant Soil Environ, 54, 89-99.
- Ahmad, P., Jaleel, C., Salem, M., Nabi, G. ve Sharma, S., 2010. Roles of Enzymatic and Nonenzymatic Antioxidants in Plants During Abiotic Stress. Critical Reviews in Biotechnology, 30, 161-175.
- Alcázar, R., Marco, F., Cuevas, J., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P. ve Altabella, T., 2006. Involvement of Polyamines in Plant Response to Abiotic Stress. Biotechnology Letters, 28, 1867-1876.
- Almeselmani, M., Deshmukh, P., Sairam, R., Kushwaha, S. ve Singh, T., 2006. Protective Role of Antioxidant Enzymes Under High Temperature Stress. Plant Science, 171, 382-388.
- Altuntaş, C., Sezgin, A., Demiralay, M., Terzi, R., Sağlam, A. ve Kadioğlu, A., 2019. Application of Sucrose Modulates the Expressions of Genes Involved in Proline and Polyamine Metabolism in Maize Seedlings Exposed to Drought. Biologia Plantarum, 63, 247-252.
- Amtmann, A. ve Blatt, M., 2009. Regulation of Macronutrient Transport. New Phytologist, 181, 35-52.
- Anjum, N., Gill, S., Gill, R., Hasanuzzaman, M., Duarte, A., Pereira, E. ve Tuteja, N., 2014. Metal/Metalloid Stress Tolerance in Plants: Role of Ascorbate, its Redox Couple and Associated Enzymes. Protoplasma, 251, 1265-1283.
- Anjum, S., Xie, X., Wang, L., Saleem, M., Man, C. ve Lei, W., 2011. Morphological, Physiological and Biochemical Responses of Plants to Drought Stress. African Journal of Agricultural Research, 6, 2026-2032.

- Ashraf, M. ve Ali, Q., 2008. Relative Membrane Permeability and Activities of Some Antioxidant Enzymes as the Key Determinants of Salt Tolerance in Canola (*Brassica napus* L.). Environmental and Experimental Botany, 63, 266-273.
- Ashraf, M. ve Foolad, M., 2007. Roles of Glycine Betaine and Proline in Improving Plant Abiotic Stress Resistance. Environmental and Experimental Botany, 59, 206-216.
- Ayala, A., Munoz, M. ve Argüelles, S., 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- Barker, A.V. ve Pilbeam, D.V., 2007. Handbook of Plant Nutrition (1st Edn),. CRC Taylor and Francis, NY, 636.
- Beauchamp, C. ve Fridovich, I. (1971). Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. Analytical Biochemistry, 44, 276-287.
- Bederedse, F., Kroon, H. ve Braakhekke, W., 2007. Use and Loss of Nutrients. Functional Plant Ecology, 259-283.
- BEGG, J., 1980. Morphological Adaptations of Leaves to Water Stress. Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress.
- BEGG, J. ve Turner, N., 1976. Advances in Agronomy, 28, 161-217.
- Bennetzen, J. L. ve Hake, S.C., 2008. (Eds.) Handbook of Maize: Its Biology. Springer Science and Business Media.
- Benson, G.O. ve Pearce, R., 1987. Corn Perspective and Culture. Corn: Chemistry and Technology, 1-29.
- Bielski, B. ve Cabelli, D., 1966. Superoxide and Hydroxyl Radical Chemistry in Aqueous Solution. *Active Oxygen in Chemistry*, 66-104.
- Bienert, G.P, Schjoerring, J.K. ve Jahn, T., 2006. Membrane Transport of Hydrogen Peroxide. Biochimica et Biophysica (BBA)- Biomembranes, 1758, 994-1003.
- Bisby, R. ve Parker, A., 1995. Reaction of Ascorbate with the α -tocopheroxyl Radical in Micellar and Bilayer Membrane Systems. Archives of Biochemistry and Biophysics, 317, 170-178.
- Blokhina, O., Virolainen, E. ve Fagerstedt, K., 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review. Annals of Botany, 91, 179-194.
- Boguszewska, D., Grudkowska, M., ve Zagdanska, B., 2010. Drought-Responsive Antioxidant Enzymes in Potato (*Solanum tuberosum* L.). Potato Research, 53, 373-382.

- Bradford, M.M., 1976. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-25.
- Brenner, C., 1991. Biotechnology and Developing Country Agriculture: The Case of Maize. Organization for Economic Cooperation and Development.
- Breusegem, F.V., Vranová, E., Dat, J.F. ve Inz, D., 2001. The Role of Active Oxygen Species in Plant Signal Transduction. Plant Science, 161, 405-414.
- Breviario, D., Giani, S., Di Vietri, P. ve Coraggio, I., 1992. Auxin and Growth Regulation of Rice Coleoptile Segments. Plant Physiology, 98, 488-495.
- Caverzan, A., Casassola, A. ve Brammer, S., 2016. Antioxidant Responses of Wheat Plants Under Stress. Genetics and Molecular Biology, 39, 1-6.
- Cha-um, S. ve Kirdmanee, C., 2009. Proline Accumulation, Photosynthetic Abilities and Growth Characters of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Plantlets in Response to Iso-Osmotic Salt and Water-Deficit Stress. Agricultural Sciences in China, 8, 51-58.
- Chaves, M., Maroco, J. ve Pereira, J., 2003. Understanding Plant Responses to Drought - From Genes to the Whole Plant. Functional Plant Biology, 30, 239-264.
- Chen, K., Gong, H., Chen, G., Wang, S. ve Zhang, C., 2004. Gradual Drought Under Field Conditions Influences the Glutathione Metabolism, Redox Balance and Energy Supply in Spring Wheat. Journal of Plant Growth Regulation, 23, 20-28.
- Chen, Z. ve Gallie, D., 2004. The Ascorbic Acid Redox State Controls Guard Cell Signaling and Stomatal Movement. The Plant Cell, 16, 1143-1162.
- Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L. ve Panda, S.K., 2013. Reactive Oxygen Species Signaling in Plants Under Abiotic Stress. Plant Signaling and Behavior, 8, e2368.
- Clo, E., Snyder, J., Ogilby, P. ve Gothelf, K., 2007. Control and Selectivity of Photosensitized Singlet Oxygen Production: Challenges in Complex Biological Systems. ChemBioChem, 8, 475-481.
- Cnubben, N., Rietjens, I., Wortelboer, H., Van Zanden, J., Van Bladeren, P., 2001. The Interplay of Glutathione-Related Processes in Antioxidant Defense. Environmental Toxicology and Pharmacology, 10, 141-152.
- Cornic, G. ve Massacci, A., 1996. Leaf Photosynthesis Under Drought Stress. In *Photosynthesis and The Environment*. 347-366. Springer, Dordrecht.
- Coşkun, Y., Coşkun, A., Demirel, U. ve Özden, M., 2011. Physiological Response of Maize (*Zea mays* L.) to High Temperature Stress. Australian Journal of Crop Science, 5, 966-972.

- Crafts-Brandner, S. ve Salvucci, M., 2002. Sensitivity of Photosynthesis in a C4 Plant, Maize, to Heat Stress. Plant Physiology, 129, 1773-1780.
- Creealman, R. ve Muller, J., 1997. Oligosaccharins, Brassinolides, and Jasmonates: Nontraditional Regulators of Plant Growth, Development, and Gene Expression. The Plant Cell, 9, 1211-1223.
- D'amico, M., Navari-Izzo, F., Sgherri, C. ve Izzo, R., 2004. The Role of Lipoic Acid in the Regulation of the Redox Status of Wheat Irrigated with 20% Sea Water. Plant Physiology and Biochemistry, 42, 329-34.
- Das, K. ve Roychoudhury, A., 2014. Reactive Oxygen Species (ROS) and Response of Antioxidants as ROS-Scavengers During Environmental Stress in Plants. Frontiers in Environmental Science, 1-13.
- Davey, M., Montagu, M., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N. ve Fletcher, J., 2000. Plant L-Ascorbic Acid: Chemistry, Function, Metabolism, Bioavailability and Effects of Processing. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 825-860.
- Davies, W. ve Zhang, J., 1991. Root Signals and the Regulation of Growth and Development of Plants in Drying Soil. Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology, 42, 55-76.
- Degl'Innocenti, E., Hafsi, C., Guidi, L. ve Navari-Izzo, F., 2009. The Effect of Salinity on Photosynthetic Activity in Potassium-Deficient Barley Species. Journal of Plant Physiology, 166, 1968-1981.
- Della Croce, C., Bronzetti, G., Cini, M., Caltavuturo, L. ve Poi, G., 2003. Protective Effect of Lipoic Acid Against Hydrogen Peroxide in Yeast Cells. Toxicology in Vitro, 17, 753.
- Demidchic, V., 2015. Mechanisms of Oxidative Stress in Plants: From Classical Chemistry to Cell Biology. Environmental and Experimental Botany, 105, 212-228.
- Demirevska, K., Zasheva, D., Dimitroy, R., Simova-Stoilova, L., Stamenova, M. ve Feller, U., 2009. Drought Stress Effects on Rubisco in Wheat: Changes in the Rubisco Large Subunit. Acta Physiol Plant, 31, 1129-1138.
- Deutsch, J., 2000. Dehydroascorbic Acid. Journal of Chromatography A, 881, 299-307.
- Dias, L., Santa-Catarina, C., Silveria, V., Pieruzzi, F. ve Floh, E., 2009. Polyamines, Amino Acids, IAA and ABA Contents During *Ocotea catharinensis* Seed Germination. Seed Science and Technology, 37, 42-51.
- Dubey, R. ve Pessarakli, M., 2001. Physiological Mechanisms of Nitrogen Absorption and Assimilation in Plants Under Stressful Conditions. In Handbook of Plant and Crop Physiology. 659-678. CRC Press.

- Edwards, E., Rawsthorne, S. ve Mullineaux, P., 1990. Subcellular Distribution of Multiple Forms of Glutathione Reductase in Leaves of Pea (*Pisum sativum* L.). Planta, 180, 278-284.
- Elçi, İ., Kolsarıcı, Ö. ve Geçit, H.H., 1994. Tarla Bitkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 1385, Ankara, 239.
- Faize, M., Burgos, L., Faize, L., Piqueras, A., Nicolas, E., Barba-Espin, G., ve Hernandez, J., 2011. Involvement of Cytosolic Ascorbate Peroxidase and Cu/Zn-Superoxide Dismutase for Improved Tolerance Against Drought Stress. Journal of Experimental Botany, 62, 2599-2613.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. ve Basra, S., 2009. Plant Drought Stress: Effect Mechanisms and Management. Agronomy for Sustainable Development, 29, 185-212.
- Fattman, C., Schaefer, L. ve Oury, T., 2003. Extracellular Superoxide Dismutase in Biology and Medicine. Free Radical Biology and Medicine, 35, 236-256.
- Faye, I., Diouf, O., Guisse, A., Sene, M. ve Diallo, N., 2006. Characterizing Root Responses to Low Phosphorus in Pearl Millet [*Pennisetum glaucum* (L) R. Br.]. Agronomy Journal, 98, 1187-1194.
- Fenton, H., 1894. LXXIII.—Oxidation of Tartaric Acid in Presence of Iron. Journal of the Chemical Society, Transactions, 65, 899-910.
- Flexas, J., Ribas-Carbo, M., Diaz-Espejo, A., Galmes, J. ve Medrano, H., 2008. Mesophyll Conductance to CO₂: Current Knowledge and Future Prospects. Plant, Cell and Environment, 31, 602-621.
- FAOSTAT <http://Faostat.fao.org>. 17/04/2021.
- Foyer, C. ve Halliwell, B., 1976. The Presence of Glutathione and Glutathione Reductase in Chloroplasts: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism. Planta, 133, 21-25.
- Foyer, C. ve Noctor, G., 2005. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface Between Stress Perception and Physiological Responses. The Plant Cell, 17, 1866-1875.
- Foyer, C., Rowell, J. ve Walker, D., 1983. Measurement of the Ascorbate Content of Spinach Leaf Protoplasts and Chloroplasts During Illumination. Planta, 157, 239-244.
- Frahry, G. ve Schopfer, P., 2001. NADH-Stimulated, Cyanide-Resistant Superoxide Production in Maize Coleoptiles Analyzed with a Tetrazolium-Based Assay. Planta, 212, 175-183.
- Gechev, T. ve Hille, J., 2005. Hydrogen Peroxide as a Signal Controlling Plant Programmed Cell Death. The Journal of Cell Biology, 168, 17-20.

- Ghaderi, N. ve Siosemardeh, A., 2011. Response to Drought Stress of Two Strawberry Cultivars. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 52, 6-12.
- Ghanta, S. ve Chattopadhyay, S., 2011. Glutathione as a Signaling Molecule: Another Challenge to Pathogens. Plant Signal Behavior, 6, 783-788.
- Gill, S., Khan, N., Anjum, N. ve Tuteja, N., 2011. Amelioration of Cadmium Stress in Crop Plants by Nutrients Management: Morphological, Physiological and Biochemical Aspect. Plant Stress, 5, 1-23.
- Gong, H., Zhu, X., Chen, K., Wang, S. ve Zhang, C., 2005. Silicon Alleviates Oxidative Damage of Wheat Plants in Pots Under Drought. Plant Science, 169, 313-321.
- Görcek, Z. ve 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 Science of Food and Agriculture, 95, 2811-2817.
- Gorman, A. ve Rodgers, M., 1992. Current Perspectives of Singlet Oxygen Detection in Biological Environments. Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology, 14, 159-176.
- Gupta, A. K. ve Kaur, N., 2005. Sugar Signalling and Gene Expression in Relation to Carbohydrate Metabolism Under Abiotic Stresses in Plants. Journal of Biosciences, 30, 761-776.
- Gurer, H., Ozgunes, H., Oztezcan, S. ve Ercal, N., 1999. Antioxidant Role of α -lipoic acid in Lead Toxicity. Free Radical Biology and Medicine, 27, 75-81.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press. Oxford.
- Hare, P. ve Cress, W., 1997. Metabolic Implications of Stress-Induced Proline Accumulation in Plants. Plant Growth Regulation, 21, 79-102.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M., Wani, A., Pichtel, J. ve Ahmad, A., 2012. Role of Proline Under Changing Environments: A Review. Plant Signaling and Behavior, 7, 1456-1466.
- He, L. ve Gao, Z., 2009. Pretreatment of Seed with H₂O₂ Enhances Drought Tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seedlings. African Journal of Biotechnology, 8.
- Herschbach, C. ve Rennenberg, H., 1994. Influence of Glutathione (GSH) on Net Uptake of Sulphate and Sulphate Transport in Tobacco Plants. Journal of Experimental Botany, 45, 1069-1076.
- Hossain, M. ve Asada, K., 1984. Purification of Dehydroascorbate Reductase From Spinach and its Characterization as a Thiol Enzyme. Plant and Cell Physiology, 25, 85-92.

- Hossain, M., Bhattacharjee, S., Armin, S.M., Qian, P., Xin, W., Li, H.Y. ve Tran, L. S. P., 2015. Hydrogen Peroxide Priming Modulates Abiotic Oxidative Stress Tolerance: Insights From ROS Detoxification and Scavenging. Frontiers in Plant Science, 6, 420.
- Housley, T.L. ve Pollock, C. J., 1993. The Metabolism of Fructan in Higher Plants, Science and Technology of Fructans. 191-225.
- Huang, B. ve Fu, J., 2000. Photosynthesis, Respiration and Carbon Allocation of Two Cool-Season Perennial Grasses in Response to Surface Soil Drying. Plant Soil, 227, 17-26.
- Islam, M., Hoque, M., Okuma, E., Banu, M., Shimoishi, Y., Nakamura, Y. ve Murata, Y., 2009. Exogenous Proline and Glycinebetaine Increase Antioxidant Enzyme Activities and Confer Tolerance to Cadmium Stress in Cultured Tobacco Cells. Journal of Plant Physiology, 166, 1587-1597.
- Itanna, F., 2005. Sulfur Distribution in Five Ethiopian Rift Valley Soils Under Humid and Semi-Arid Climate. Journal of Arid Environments, 62, 597-612.
- Jacomini, E., Bertani, A. ve Mapelli, S., 1987. Accumulation of Polyethylene Glycol 6000 and its Effects on Water Content and Carbohydrate Level in Water-Stressed Tomato Plants. Canadian Journal of Botany, 66, 970-973.
- Jaleel, C., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ines, J., Al- Juburi, H. ve Panneerselvam, R., 2009. Antioxidant Defense Responses: Physiological Plasticity in Higher Plants Under Abiotic Constraints. Acta Physiologiae Plantarum, 31, 427-436.
- Jaspers, P. ve Kangasjärvi J., 2010. Reactive Oxygen Species in Abiotic Stress Signaling. Physiology Plantarum, 138, 405-413.
- Jiang, M. ve Zhang, J., 2002. Role of Abscissic Acid in Water Stress-Induced Antioxidant Defense in Leaves of Maize Seedlings. Free Radical Research, 36, 1001-1015.
- Jimenez, A., Hernandez, J. A., del Río, L. ve Sevilla, F., 1997. Evidence For the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. Plant Physiology, 114, 275-284.
- Jin, X., Liu, T., Xu, J., Gao, Z. ve Hu, X., 2019. Exogenous GABA Enhances Muskmelon Tolerance to Salinity-Alkalinity Stress by Regulating Redox Balance and Chlorophyll Biosynthesis. BMC Plant Biology, 19, 1-15.
- Jones , R., 1986. The Development of Salt-Tolerant Tomatoes: Breeding Strategies. Acta Horticulturae, 190, 101-114.
- Kadioglu, A., Saruhan, N., Sağlam, A., Terzi, R. ve Acet, T., 2011. Exogenous Salicylic Acid Alleviates Effects of Long Term Drought Stress and Delays Leaf Rolling by Inducing Antioxidant System. Plant Growth Regulation, 64, 27-37.

- Kalefetoğlu, T. ve Ekmekci, Y., 2005. The Effects of Drought on Plants and Tolerance Mechanisms. Gazi University Journal of Science, 18, 723-740.
- Karabulut, H. ve Gülay, M., 2016. Serbest Radikaller, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 4, 1.
- Kavdia, M., 2006. A Computational Model for Free Radicals Transport in the Microcirculation. Antioxidants and Redox Signaling, 8, 1103-1111.
- Kayabaşı, S., 2011. Kuraklık Stresinde Yetiştirilen Soya'da (*Glycine Max. L.*) Bazı Fizyolojik Parametreler İle Prolin Birikiminin Araştırılması/Drought Stress In The Soybean (*Glycine max. L.*) With Some Physiological Parameters Investigation of Accumulations Proline, (*Doctoral Dissertation*).
- Kırtok, Y., 1998. Mısır Üretimi Ve Kullanımı, Kocaoluk Yayınevi.
- Knipp, G. ve Honermeier, B., 2006. Effect of Water Stress on Proline Accumulation of Genetically Modified Potatoes (*Solanum tuberosum L.*) Generating Fructans. Journal of Plant Physiology, 163, 392-397.
- Ko, D. ve Helariutta, Y., 2017. Shoot-Root Communication in Flowering Plants. Current Biology, 27, R973-R978.
- Komatsu, S., Yamamoto, A., Nakamura, T., Nouri, M., Nanjo, Y., Niahizawa, K. ve Furukawa, K., 2011. Comprehensive Analysis of Mitochondria in Roots and Hypocotyls of Soybean Under Flooding Stress Using Proteomics and Metabolomics Techniques. Journal of Proteome Research, 10, 3993-4004.
- Krieger-Liszkay, A., Fufezan, C. ve Trebst, A., 2008. Singlet Oxygen Production in Photosystem II and Related Protection Mechanism. Photosynthesis Research, 98, 551-564.
- Kruk, J., Hollander-Czytko, H., Oettmeier, W. ve Trebst, A., 2005. Tocopherol as Singlet Oxygen Scavenger in Photosystem II. Journal of Plant Physiology, 162, 749-757.
- Kumar, M., Kesawat, M., Ali, A., Lee, S., Gill, S. ve Kim, H.U., 2019. Integration of Absciscic Acid Signaling with Other Signaling Pathways in Plant Stress Responses and Development. Plants, 8, 592.
- Kunkel, B. ve Brooks, D., 2002. Cross Talk Between Signaling Pathways in Pathogen Defense. Current Opinion in Plant Biology, 5, 325-331.
- Kusano, T., Yamaguchi, K., Berberich, T. ve Takahashi, Y., 2007. Advances in Polyamine Research in 2007. Journal of Plant Research, 120, 345-350.
- Kusvuran, S., Ellialtıoglu, S. ve Polat, Z., 2013. Antioxidative Enzyme Activity, Lipid Peroxidation, and Proline Accumulation in the Callus Tissues of Salt and Drought Tolerant and Sensitive Pumpkin Genotypes Under Chilling Stress. Horticulture, Environment and Biotechnology, 54, 319-325.

- Kün, E., 1997. Tahıllar II (Sıcak İklim Tahılları), Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü IV. Baskı.
- Lambers, E. S., Dykstal, C. N., Seo, J. M., Rowe, J. E. ve Holloway, P. H., 1996. Room-Temperature Oxidation of Ni (110) at Low and Atmospheric Oxygen Pressures. Oxidation of Metals, 45, 301-321.
- Lappartient, A. ve Touraine, B., 1996. Demand-Driven Control of Root ATP Sulfurylase Activity and SO₄²⁻-Uptake in Intact Canola (The Role of Phloem-Translocated Glutathione). Plant Physiology, 111, 147-157.
- Larcher, W., Physiological Plant Ecology, Vol 1, 506, Published by Springer, New York, 1995.
- Lastdrager, J., Hanson, J. ve Smeekens, S., 2014. Sugar Signals and the Control of Plant Growth and Development. Journal of Experimental Botany, 65, 799-807.
- Lawlor, D., 2002. Limitation to Photosynthesis in Water Stressed Leaves: Stomata vs. Metabolism and the Role of ATP. Annals of Botany, 89, 1-15.
- Lee, S. H. ve An, C., 2005. Differential Expression of Three Catalase Genes in Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.). Molecules and Cells (Springer Science and Business Media BV), 20,2.
- Levitt, J., Responses of Plants to Environmental Stress, Vol 1, Academic Press, New York, 1980.
- Li, H., He, J., Yang, X., Li, X., Luo, D., Wei, C. ve Zhang, X., 2016. Glutathione-Dependent Induction of Local and Systemic Defense Against Oxidative Stress by Exogenous Melatonin in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). Journal of Pineal Research, 60, 206-216.
- Liu, J. X., Feng, K., Duan, A. Q., Li, H., Yang, Q. Q., Xu, Z. S. ve Xiong, A., 2019. Isolation Purification and Characterization of and Ascorbate Peroxidase From Celery and Overexpression of the AgAPX1 Gene Enhanced Ascorbate Contents and Drought Tolerance in Arabidopsis. BMC Plant Biology, 19, 1-13.
- Liu, T., Hu, X., Zhang, J., Du, Q. ve Li, J., 2018. H₂O₂ Mediates ALA Induced Glutathione and Ascorbate Accumulation in the Perception and Resistance to Oxidative Stress in *Solanum lycopersicum* at Low Temperature. BMC Plant Biology, 18, 34.
- Livingston, D., Hinch, D. ve Heyer, A., 2009. Fructan and its Relationship to Abiotic Stress Tolerance in Plants. Cellular and Molecular Life Sciences, 66, 2007-2023.
- Lombardi, L. ve Sebastiani, L., 2005. Copper Toxicity in *Prunus cerasifera*: Growth and Antioxidant Enzymes Responses of In Vitro Grown Plants. Plant Science, 168, 797-802.

- Lu, C. ve Zhang, J., 1998. Effects of Water Stress on Photosynthesis , Chlorophyll Fluorescence and Photoinhibition in Wheat Plants. Australian Journal of Plant Physiology, 25, 883-892.
- Ludlow, M. ve Muchow, R., Advances in Agronomy, A Critical Evaluation of Traits for Improving Crop Yields in Water-Limited Environments, 43, 107-153, 1990.
- Maggio, A., Miyazasaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J., Damsz, B. ve Bressan, R., 2002. Does Proline Accumulation Play an Active Role in Stress-Induced Growth Reduction?. The Plant Journal, 31, 699-712.
- Makavitskaya, M., Svistunenko, D., Navaselssky, I., Hryvusevich, P., Mackievic, V., Rabadanova, C. ve Voitsekhovskaja, O., 2018. Novels Roles of Ascorbate in Plants: Induction of Cytosolic Ca^{2+} Signals and Efflux From Cells Via Anion Channels. Journal of Experimental Botany , 69, 3477-3489.
- Mani, S., Van De Cotte , B., Montagu, M. ve Verbruggen, N., 2002. Altered Levels of Proline Dehydrogenase Cause Hypersensitivity to Proline and its Analogs in Arabidopsis. Plant Physiology, 128, 78-83.
- Marschner, H.,1995. Mineral Nutrition of High Plants, London: London Academic Press.
- Matysik, J., Alia, B., Halu, B. ve Mohanty, P., 2002. Molecular Mechanisms of Quenching of Reactive Oxygen Species by Proline Under Stress in Plants. Current Science, 82, 525-532.
- McCord, J., 2000. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. The American Journal of Medicine, 108, 652-659.
- McKersie B.D. ve Leshem Y.Y., 1994. Oxidative Stress; in Stress and Stress Coping in Cultivated Plants, 15-54, Kluwer, Dordrecht.
- Mengel, K. 2007. Potassium. in: Handbook of Plant Nutrition. pp. 91–120. Barker, A.V., and Pilbeam, D. J., Eds., Taylor ve Francis, Boca Ratan, FL, USA
- Mengel, K., E. ve A. Kirkby., 1987. Soil as a Plant Nutrient Medium. In: Principles of Plant Nutrition(4th Ed.), International Potash Institute, 56–61.
- Merhaut, D. J., 2007. Magnesium Pp. 145–181 in Barker AV, Pilbeam DJ, eds. Handbook of Plant Nutrition, CRC.
- Misaghi, I., DeVay, J. ve Kosuge, T., 1972. Changes in Cytokinin Activity Associated with the Development of Verticillium Wilt and Water Stress in Cotton Plants. Physiological Plant Pathology, 2, 187.
- Mittler, R., 2002. Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance. Trends in Plant Science, 7, 405-410.

- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. ve Van Breusegem, F., 2004. Reactive Oxygen Gene Network of Plant. Trends in Plant Science, 9, 490-498.
- Muller, D. A., Nakagawa, N., Ohtomo, A., Grazul, J. L., ve Hwang, H. Y., 2004. Atomic-Scale Imaging of Nanoengineered Oxygen Vacancy Profiles in SrTiO₃. Nature, 43, 657-661.
- Mullineaux, P. M. ve Rausch, T., 2005. Glutathione, Photosynthesis and the Redox Regulation of Stress-Responsive Gene Expression. Photosynthesis Research, 86, 459-474.
- Murakeözy, É. P., Nagy, Z., Duhazé, C., Bouchereau, A. ve Tuba, Z., 2003. Seasonal Changes in the Levels of Compatible Osmolytes in Three Halophytic Species of Inland Saline Vegetation in Hungary. Journal of Plant Physiology, 160, 395-401.
- Nair, A., Abraham, T. ve Jaya, D., 2008. Studies on the Changes in Lipid Peroxidation and Antioxidants in Drought Stress Induced Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Varieties. Journal of Environmental Biology, 29, 689-691.
- Nakano, Y. ve 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, 131-140.
- Narusaka, Y., Nakashima, K., Shinwari, Z., Sakuma, Y., Furihata, T., Abe, H. ve Yamaguchi-Shinozaki, K., 2003. Interaction Between Two Cis-Acting Elements, ABRE and DRE, in ABA-Dependent Expression of Arabidopsis rd29A Gene in Response to Dehydration and High-Salinity Stresses. The Plant Journal, 34, 137-148.
- Navari-Izzo, F. ve Quartacci, M., 2001. Phytoremediation of Metals: Mechanisms Against Oxidative Stress. Minerva Biotechnology, 13, 73-83.
- Navari-Izzo, F., Quartacci, M. ve Sgherri, C., 2002. Lipoic Acid: A Unique Antioxidant in the Detoxification of Activated Oxygen Species. Plant Physiology and Biochemistry, 40, 463-470.
- Neill, S., Desikan, R. ve Hancock, J., 2002. Hydrogen Peroxide Signaling. Current Opinion in Plant Biology, 5, 388-395.
- Noctor, G., 2006. Metabolic Signalling in Defence and Stress: The Central Roles of Soluble Redox Couples. Plant, Cell and Environment, 29, 409-425.
- Noctor, G. ve Foyer, C., 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. Annual Review Plant Physiology Molecular Biology, 49, 249-279.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H. ve Foyer, C., 2002. Interactions Between Biosynthesis, Compartmentation and Transport in the Control of Glutathione Homeostasis and Signaling. Journal of Experimental Botany, 53, 1283-1304.

- Özer, H., Karadoğan, T. ve Oral, E., 1997. Bitkilerde Su Stresi Dayanıklılık Mekanizması. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 28.
- Packer, L. ve Cadenas, E., 2011. Lipoic Acid: Energy Metabolism and Redox Regulation of Transcription and Cell Signaling. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 48, 26-32.
- Pál, M., Szalai, G. ve Janda, T., 2015. Speculation: Polyamines are Important in Abiotic Stress Signaling. Plant Science, 237, 16-23.
- Parida, A. K. ve Das, A. B., 2005. Salt Tolerance and Salinity Effects on Plants: A Review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 60, 324-349.
- Paschalidis, K. ve Roubelakis-Angelakis, K., 2005. Sites and Regulation of Polyamine Catabolism in the Tobacco Plant, Correlations with Cell Division/Expansion, Cell Cycle Progression, and Vascular Development. Plant Physiology, 138, 2174-2184.
- Pérez-López, U., Robredo, A., Lacuesta, M., Sgherri, C., Mena-Petite, A., Navari-Izzo, F. ve Munoz-Redua, A., 2010. Lipoic Acid and Redox Status in Barley Plants Subjected to Salinity and Elevated CO₂. Physiologia Plantarum, 139, 256-268.
- Perricone, N., Nagy, K., Horváth, F., Dajkó, G., Uray, I. ve Nagy, I. Z., 1999. Alpha Lipoic Acid (ALA) Protects Proteins Against the Hydroxyl Free Radical-Induced Alterations: Rationale for its Geriatric Topical Application. Archives of Gerontology and Geriatrics, 29, 45-56.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. ve Periyasamy, L., 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets and Their Implication in Various Diseases. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 30, 11-26.
- Podda, M., Zollner, T., Grundmann-Kollman, M., Thiele, J. J., Packer, L. ve Kaufmann, R., 2001. Activity of Alpha-Lipoic Acid in the Protection Against Oxidative Stress in Skin. Current Problems In Dermatology-Basel, 29, 43-51.
- Pourcel, L., Routaboul, J. M., Cheynier, V., Lepiniec, L. ve Debeaujon, I., 2007. Flavonoid Oxidation in Plants: From Biochemical Properties to Physiological Functions. Trends In Plant Science, 12, 29-36.
- Prasertsak, A. ve Fukai, S., 1997. Nitrogen Availability and Water Stress Interaction On Rice Growth Yield. Field Crops Research, 52, 249-260.
- Premachandra , G., Saneoka, H., Fujita, K. ve Ogata , S., 2008. Water Stress And Potassium Fertilization in Field Grown Maize (Zea mays L.):Effects On Leaf Water Relations and Leaf Rolling. Journal of Agronomy and Crop Science, 170, 195-201.
- Pulz, A., Crusciol, C., Lemos, L. ve Soratto, R., 2008. Silicate and Limestone Effects on Potato Nutrition, Yield and Quality Under Drought Stress. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 32, 1651-1659.

- Rabe, E., 1990. Stress Physiology: The Functional Significance of the Accumulation of Nitrogen-Containing Compounds. Journal of Horticultural Science, 65, 231-243.
- Ren, J., Sun, L., Zhang, Q. ve Song, X., 2016. Drought Tolerance is Correlated with the Activity of Antioxidant Enzymes in *Cerasus humulis* seedlings. Biomed Research International.
- Restrepo-Diaz, H., Benlloch, M. ve Fernandez Escobar, R., 2008. Plant Water Stress and K⁺ Starvation Reduce Absorption of Foliar Applied K⁺ by Olive Leaves. Scientia Horticulturae, 116, 409-413.
- Reth, M. 2002. Hydrogen Peroxide as Second Messenger in Lymphocyte Activation. Nature Immunology, 3, 1129-1134.
- Rice-Evans, C., Miller, N. ve Paganga, G., 1997. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds. Trends In Plant Science, 2, 152-159.
- Rizhsky, L., Hallak-Herr, E., Van Breusegem, F., Rachmilevitch, S., Barr, J., Rodermel, S. ve Mittler, R., 2002. Double Antisense Plants Lacking Ascorbate Peroxidase and Catalase are Less Sensitive to Oxidative Stress than Single Antisense Plants Lacking Ascorbate Peroxidase or Catalase. The Plant Journal, 32, 329-342.
- Ryals, J., Neuenschwander, U., Willits, M., Molina, A., Steiner, H. ve Hunt, M., 1996. Systemic Acquired Resistance. The Plant Cell, 8, 1809.
- Sardans, J. ve Peñuelas J., 2004. Increasing Drought Decreases Phosphorus Availability in Evergreen Mediterranean Forest. Plant and Soil, 267, 367-377.
- Sarker, U. ve Oba, S., 2018. Catalase Superoxide Dismutase and Ascorbate-Glutathione Cycle Enzymes Confer Drought Tolerance of *Amaranthus tricolor*. Scientific Reports, 8, 1-12.
- Savicka, M. ve Škute, N., 2010. Savi Effects of High Temperature on Malondialdehyde Content, Superoxide Production and Growth Changes in Wheat Seedlings (*Triticum aestivum* L.). Ekologija, 56, 26-33.
- Scandalios, J., 1993. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. Plant Physiology, 101, 7-12.
- Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J., Williams, R., Cadenas, E. ve Rice-Evans, C., 2002. MAPK Signaling in Neurodegeneration: Influences of Flavonoids and of Nitric Oxide. Neurobiology Of Aging, 23, 861-880.
- Schulze, E., 1986b. Carbon Dioxide and Water Vapor Exchange in Response to Drought in the Atmosphere and the Soil. Annual Review of Plant Physiology, 37, 247-274.
- Sekmen, H., Türkan, İ. ve Takio, S., 2007. Differential Responses of Antioxidative Enzymes and Lipid Peroxidation to Salt Stress in Salt-Tolerant *Plantago maritima* and Salt-Sensitive *Plantago media*. Physiologia Plantarum, 131, 399-411.

- Sen, C., Roy, S., Han, D. ve Packer, L., 1997. Regulation of Cellular Thiols in Human Lymphocytes by α -lipoic acid: A Flow Cytometric Analysis. Free Radical Biology and Medicine, 22, 1241-1257.
- Sezgin, A., Altuntaş, C., Demiralay, M., Cinemre, S. ve Terzi, R., 2019. Exogenous Alpha Lipoic Acid can Stimulate Photosystem II Activity and the Gene Expressions of Carbon Fixation and Chlorophyll Metabolism Enzymes in Maize Seedlings Under Drought. Journal of Plant Physiology, 232, 65-73.
- Sgherri, C., Quartacci, M., Izzo, R. ve Navari-Izzo, F., 2002. Relation Between Lipoic Acid and Cell Redox Status in Wheat Grown in Excess Copper. Plant Physiology and Biochemistry, 40, 591-597.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. ve Lee, T., 2001. Responses of the Cultivated Tomato and its Wild Salt-Tolerant Relative *Lycopersicon pennellii* to Salt-Dependent Oxidative Stress: The Root Antioxidative System. Physiologia Plantarum, 112, 487-494.
- Shao, H., Chu, L., Shao, M., Jaleel, C. ve Hong-mei, M., 2008. Higher Plant Antioxidants and Redox Signaling Under Environmental Stress. Comptes Rendus Biologies, 331, 433-441.
- Shim, I., Momose, Y., Yamamoto, A., Kim, D. ve Usui, K., 2003. Inhibition of Catalase Activity by Oxidative Stress and its Relationship to Salicylic Acid Accumulation in Plants. Plant Growth Regulation, 39, 385-292.
- Sies, H., Stahl, W. ve Sundquist, A., 1992. Antioxidant Functions of Vitamins: Vitamins E and C, Beta-Carotene, and Other Carotenoids A. Annals of the New York Academy of Sciences, 669, 7-20.
- Sinsawat, V., Leipner, J., Stamp, P. ve Fracheboud, Y., 2004. Effect of Heat Stress on the Photosynthetic Apparatus in Maize (*Zea mays* L.) Grown at Control or High Temperature. Environmental and Experimental Botany, 52, 123-129.
- Sircelj, H., Tausz, M., Grill, D. ve Bati, F., 2005. Biochemical Responses in Leaves of Two Apple Tree Cultivars Subjected to Progressing Drought. Journal of Plant Physiology, 162, 1308-1318.
- Smirnoff, N. (Ed.). 2005. Antioxidants And Reactive Oxygen Species In Plants, 169-177. Oxford: Blackwell.
- Smirnoff, N., 1993. Tansley Review No. 52. The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation. New phytologist, 27-58
- Smirnoff, N. ve Cumbes, Q., 1989. Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Compatible Solutes. Phytochemistry, 28, 1057-1060.

- Snell, E., Strong, F. ve Peterson, W., 1937. Growth Factors for bacteria: Fractionation and Properties of an Accessory Factor for Lactic Acid Bacteria1. Biochemical Journal, 31, 1789.
- Soares, C., Carvalho, M., Azevedo, R. ve Fidalgo, F., 2019. Plants Facing Oxidative Challenges A Little Help From the Antioxidant Networks. Environmental and Experimental Botany, 161, 4-25.
- Sudesh, V., Linda, L. ve Pawan, S., 2002. Nutrition and Hypertension. Journal Nutrition Research, 22, 111-123.
- Suh, J., Shenvi, S., Dixon, B., Liu, H., Jaiswal, A., Liu, R. ve Hagen, T., 2004. Decline in Transcriptional Activity of Nrf2 Causes Age-Related Loss of Glutathione Synthesis, Which is Reversible with Lipoic Acid. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101, 3381-3386.
- Sung, M., Hsu, Y., Hsu, Y., Wu, T. ve Lee, T., 2009. Hypersalinity and Hydrogen Peroxide Upregulation of Gene Expression of Antioxidant Enzymes in *Ulva fasciata* Against Oxidative Stress. Marine Biotechnology, 11, 199.
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M. ve Mittler, R., 2011. Respiratory Burst Oxidases: the Engines of ROS Signaling. Current Opinion in Plant Biology, 14, 691-699.
- Szabados, L. ve Savoure, A., 2010. Proline: A Multifunctional Amino Acid. Trends in Plant Science, 15, 89-97.
- Taiz, L. ve Zeiger, E., 2006. Secondary metabolites and plant defense. Plant Physiology, 4, 315-344.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. ve Murphy, A., 2015. Plant physiology and development (Ed. 6. Sinauer Associates Incorporated.
- Taylor, N.L., Day, D.A., Millar, A.H., 2004. Targets of Stress-Induced Oxidative Damage in Plant Mitochondria and Their Impact on Cell Carbon/Nitrogen Metabolism. Journal of Experimental Botany, 55, 1-10.
- Terzi, R., Saruhan Güler, N., Güven, F. ve Kadioglu, A., 2018. Alpha Lipoic Acid Treatment Induces the Antioxidant System and Ameliorates Lipid Peroxidation in Maize Seedlings Under Osmotic Stress. Archives of Biological Sciences, 70, 503-511.
- Tietze, F., 1969. Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. Analytical Biochemistry, 27, 502-522.
- Tomosugi, M., Ichihara, K. ve Saito, K., 2006. Polyamines are Essential for the Synthesis of 2-Ricinoyleoyl Phosphatidic Acid in Developing Seeds of Castor. Planta, 223, 349-358.

- Türk, H., Erdal, S., Karayel, U. ve Dumlupınar, R., 2018. Attenuation of Lead Toxicity by Promotion of Tolerance Mechanism in Wheat Roots by Lipoic Acid. Cereal Research Communications, 46, 424-435.
- Türkan, F., 2019. Investigation of the Toxicological and Inhibitory Effects of Some Benzimidazole Agents on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Enzymes. Archives Of Physiology And Biochemistry, 1-5.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. ve Telser, J., 2004. Role of Oxygen Radicals in DNA Damage and Cancer Incidence. Molecular and Cellular Biochemistry, 266, 37-56.
- Valko, M., Leibfritz, D. ve Moncola, J., 2007. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. International Journal Biochemistry Cell Biology, 39, 44-84.
- Van den Ende, W. ve Valluru, R., 2009. Sucrose, Sucrosyl Oligosaccharides and Oxidative Stress: Scavenging and Salvaging?. Journal of Experimental Botany, 60, 9-18.
- Velikova, V., Yordanov, I. ve Edreva, A., 2000. Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain-Treated Bean Plants, Protective Role of Exogenous Polyamines. Plant Science, 151, 59-66.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. ve Sharma, S., 2017. Absciscic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in PPlants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. Frontiers in Plant Science, 8, 161.
- Wang, X., Vignjevic, M., Jiang, D., Jacobsen, S. ve Wollenweber, B., 2014. Wang, X. Improved Tolerance to Drought Stress After Anthesis Due to Priming Before Anthesis in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Var. Vinjett. Journal of Experimental Botany, 65, 6441-6456.
- Wani, S., Singh, N., Haribhushan, A. ve Mir, J., 2013. Compatible Solute Engineering in Plants for Abiotic Stress Tolerance-Role of Glycine Betaine, Current Genomics, 14: 157-165.
- Williams Jr, F. T., 1992. Biosensor-Based Analyser. Measurement of Glucose, Sucrose, Lactose, l-lactate and Alcohol. In Biotech Forum Europe; Germany, 9, 5.
- Wu, Y. ve Cosgrove, D., 2000. Adaption of Roots to Low Water Potentials by Changes in Cell Wall Extensibility and Cell Wall Proteins. Journal of Experimental Botany, 51: 1543-1553.
- Xia, X., Zhou, Y., Ding, J., Shi, K., Asami, T., Chen, Z. ve Yu, J., 2011. Induction of Systemic Stress Tolerance by Brassinosteroid in *Cucumis sativus*. New Phytologist, 191, 706-720.
- Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Takahashi, T., Michael, A. ve Kusano, T., 2007. A Protective Role for the Polyamine Spermine Against Drought

- Stress in Arabidopsis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 352, 486-490.
- Yan, Z., Ming, D., CUI, X., WEN, Z., ZHANG, J. ve LIU, H., 2018. Exogenous GSH Protects Tomatoes Against Salt Stress by Modulating Photosystem II Efficiency, Absorbed Light Allocation and H₂O₂-Scavenging System in Chloroplasts. Journal of Integrative Agriculture, 17, 2257-2272.
- Yang, J., Yunying, C., Zhang, H., Liu, L. ve Zhang, J., 2008. Involvement of Polyamines in the Post-Anthesis Development of Inferior and Superior Spikelets in Rice. Planta, 228, 137-149.
- Yasuno, R. ve Wada, H., 2002. The Biosynthetic Pathway for Lipoic Acid is Present in Plastids and Mitochondria in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 517, 110-114.
- Yıldız, M., Akcalı, N. ve Terzi, H., 2015. Proteomic and Biochemical Responses of Canola (*Brassica napus* L.) Exposed to Salinity Stress and Exogenous Lipoic Acid. Journal of Plant Physiology, 179, 90-99.
- You, J. ve Chan, Z., 2015. ROS Regulation During Abiotic Stress Responses in Crop Plants. Frontiers in Plant Science, 8, 1092.
- Yousuf, P., Hakeem, K., Chandra, R. ve Ahmad, P., 2012. Role of Glutathione Reductase In Plant Abiotic Stress, In Abiotic Stress Responses In Plant, 149-158.
- Zhou, Z., Guo, K., Elbaz, A. ve Yang, Z., 2009. Salicylic Acid Alleviates Mercury Toxicity by Preventing Oxidative Stress in Roots of *Medicago sativa*. Environmental and Experimental Botany, 65, 27-34.
- Zhou, Q. ve Yu, B., 2010. Changes in Content of Free, Conjugated and Bound Polyamines and Osmotic Adjustment in Adaptation of Vetiver Grass to Water Deficit. Plant Physiology and Biochemistry, 48, 417-425.
- Zicker, S., Hagen, T., Joisher, N., Golder, C., Joshi, D. ve Miller, E., 2002. Safety of Long-term Feeding of dl-alpha-lipoic acid and its Effect on Reduced Glutathione: Oxidized Glutathione Ratios in Beagles, Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine, 3, 167-176.

ÖZGEÇMİŞ

KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. Biyoloji bölümünden mezun olarak aynı zamanda Biyoloji Pedagojik Formasyon eğitimini tamamladı. Ara vermeyerek, KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Rabiye TERZİ danışmanlığında Yüksek Lisans eğitimine başladı.

