



**MISIR (*Zea mays* L.) BİTKİSİNİN ÜŞÜMEYE
DİRENCİ ÜZERİNE KARNİTİNİN ETKİLERİNİN
LİPİD VE SOLUNUM METABOLİZMASI İLE
BAĞLANTILI OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Hülya TÜRK

**Doktora Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı
Prof. Dr. Rahmi DÜMLÜPINAR
2018
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MISIR (*Zea mays* L.) BİTKİSİNİN ÜŞÜMEYE DİRENCİ ÜZERİNE
KARNİTİNİN ETKİLERİNİN LİPİD VE SOLUNUM
METABOLİZMASI İLE BAĞLANTILI OLARAK
ARAŞTIRILMASI

Hülya TÜRK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Botanik Bilim Dalı

ERZURUM
2018

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**MISIR (*Zea mays* L.) BİTKİSİNİN ÜŞÜMEYE DİRENCİ ÜZERİNE
KARNİTİNİN ETKİLERİNİN LİPİD VE SOLUNUM METABOLİZMASI İLE
BAĞLANTILI OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR danışmanlığında, Hülya TÜRK tarafından hazırlanan bu çalışma 20/04/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Botanik Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza :

Üye : Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mesut TAŞKIN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mucip GENİŞEL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Furkan ORHAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 31.10.2018 tarih ve 22./...26 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAŞ
Fen Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

Prof. Dr. Cavit KAZAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Doktora Tezi

MISIR (*Zea mays* L.) BİTKİSİNİN ÜŞÜMEYE DİRENCİ ÜZERİNE KARNİTİNİN ETKİLERİNİN LİPİD VE SOLUNUM METABOLİZMASI İLE BAĞLANTILI OLARAK ARAŞTIRILMASI

Hülya TÜRK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

Mevcut çalışmada, mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin büyüme ve gelişmesi ile soğuğa toleransı üzerine dörtlü amonyum bileşiği olan karnitinin etkilerinin lipid katabolizması ve mitokondriyal solunum metabolizması temelinde araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla 9 günlük mısır fideleri dört farklı gruba ((I. Kontrol, II. Soğuk, III. Soğuk+ Karnitin ve IV. Karnitin) ayrılarak, I. ve II. gruplara saf su, III. ve IV. gruplara ise 25 µM karnitin uygulaması yapılmıştır. Uygulamadan yaklaşık 6 saat sonra, I. ve IV. gruptaki bitkiler 25/20°C'ye, II. ve III. gruptaki bitkiler ise 9/5°C'ye ayarlanan iklim dolaplarına aktarılmış; mevcut koşullarda 72 saat büyütüldükten sonra tüm gruplar hasat edilmek suretiyle fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler parametrelerinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Soğuk ve karnitin uygulamalarının lipidlerin solunuma dahlini uyarıp uyarmadığını ortaya koymak bağlamında; çalışılan lipaz, karnitin açıl transferaz (CAT I ve CAT II) ve sitrat sentaz (CS) aktivitelerinde önemli artışlar belirlendi. Bu enzimler için en yüksek değerler ise soğuk ve karnitinin birlikte uygulandığı bitkilerde kaydedildi. Oksijen tüketimi ölçümleri neticesinde, ayrı ayrı soğuk ve karnitin uygulanan bitkilerde toplam solunum hızlarının yanı sıra, sitokrom yolu, alternatif solunum yolu ve eşleşme önleyicilerin hızlarında kontrol bitkilerine kıyasla belirgin artışlar kaydedilirken, bu parametreler için en yüksek değerler yine karnitin ile soğukun birlikte uygulandığı gruplarda belirlendi. Lipid ve solunum metabolizmalarında görevli enzimlerin aktivitelerinde kaydedilen soğuk ve/veya karnitin indüklü bu artışlar, hücrelerin total lipid içeriklerinde kaydedilen azalma ve serbest ve açıl-karnitin içeriklerinde belirlenen artışlar ile de pozitif bir korelasyon gösterdi. Ayrıca soğuk ve/veya karnitin uygulamalarının, bu yollarda görevli enzimlerin sadece aktiviteleri üzerine değil, aynı zamanda gen ekspresyonları (lipaz, CS, sitokrom oksidaz (COX) ve alternatif oksidaz (AOX)) ve protein ifadeleri (AOX ve COX) üzerine de benzer etkiye sahip oldukları belirlendi. Öte yandan, krebs döngüsüyle bağlantılı olan azot asimilasyonunun enzimlerinden biri olan NADH bağımlı glutamat dehidrogenazın (NADH-GDH) aktivitesinde ve gen ekspresyon seviyesinde soğuk kaynaklı meydana gelen inhibisyon, karnitin uygulaması ile önemli oranda yatıştırılırken, tek başına karnitin uygulaması ile bu enzimin aktivitesinde ve gen ekspresyon seviyesinde belirgin bir artış kaydedildi. Mevcut çalışmada ayrıcalipid ve solunum metabolizmasında belirlenen karnitin ve/veya soğuk indüklü aktivasyon ile mısır bitkisinin büyüme parametreleri ile soğuğa tolerans derecesi arasındaki ilişki de çalışıldı. Soğuk uygulaması, mısır bitkilerinin kuru madde içeriğinde artışa neden olurken, kök ve yaprak uzunluğu ile yaprak yüzey alanlarını önemli derecede inhibe etti. Dahası soğuk stresi, hem süperoksit anyonu hem de hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin (ROT) seviyelerinde önemli artışa neden olurken; lipid peroksidasyon, elektrolit kaçağı ve protein oksidasyonu gibi oksidatif stres parametrelerinin de yükselmesine yol açtı. Karnitin uygulaması ise hem ROT içeriğinde hem de oksidatif stres parametrelerinde meydana gelen soğuk kaynaklı artışları önemli oranda engelledi. Yağ asidi analizi sonuçları gösterdi ki; soğuk ve karnitin uygulamaları doymuş yağ asidi içeriklerini azaltırken, doymamış yağ asidi içeriklerinde belirgin bir artışa neden oldu. En yüksek doymamış yağ asidi içeriği ise soğukla birlikte karnitin uygulanan bitkilerde kaydedildi. Tüm bu bulgular ışığında; karnitin uygulamasının bitkilerde lipid katabolizmasını hızlandırmak suretiyle yağ asitlerinin mitokondriye taşınması ve solunuma dahil olmasını uyardığı, böylelikle hem enerji hem de solunumla bağlantılı diğer yolların aktivasyonu sayesinde normal koşullar altında bitki büyüme ve gelişmesine, soğuk koşullarda ise büyümenin devamlılığı ile birlikte bitki toleransına katkı sağladığı söylenebilir.

2018, 147 sayfa

Anahtar Kelimeler: Karnitin, lipid metabolizması, solunum, soğuk stresi, mısır

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF THE CARNITINE EFFECTS ON CHILLING RESISTANCE OF MAIZE (*Zea Mays* L.) PLANT IN CONNECTION WITH LIPID AND RESPIRATORY METABOLISM

Hülya TÜRK

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Department of Botany

Supervisor: Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

In the present study, it was aimed to investigate the effects of carnitine, a quaternary ammonium compound, on the growth and development, and cold tolerance of maize (*Zea mays* L.) plant on the basis of lipid catabolism and mitochondrial respiration metabolism. For this purpose, 9-day-old maize seedlings were divided into four different groups (I. Control, II. Cold, III. Cold + Carnitine and IV. Carnitine); and group I and II were applied with distilled water and the other groups (III and IV) were treated with 25 μ M carnitine. Approximately 6 hours after the application, the plants in the group I and IV were transferred to climate cabinets set at 25/20°C and the plants in the group II and III were transferred to climate cabinets set at 9/5°C; and 72 hours after, all groups were harvested and the changes in physiological, biochemical and molecular parameters were determined. Significant increases were determined in the activities of the enzymes, studied to clarify whether applications of cold and carnitine stimulate involving lipids into respiration, lipase, carnitine acyl transferase (CAT I and CAT II) and citrate synthase (CS). The maximum values for these enzymes' activities were recorded in the plants to which cold and carnitine were applied together. With measuring the oxygen consumption, while it was remarkable increases were recorded in the rates of cytochrome pathway, the alternative respiratory pathway and the uncouplers in comparison to the control plants as well as total respiration rates in the cold and carnitine-treated plants separately, the highest values for these parameters were again determined in the plants to which carnitine together with cold applied. Cold and/or carnitine-induced these increases recorded at activities of enzymes involved in lipid and respiratory metabolisms were positively correlated with the decline in the total lipid content and increment in the contents of free and acyl-carnitine in the cells. In addition, it was determined that cold and/or carnitine applications had similar effects not only on the activities of enzymes involved in these pathways but also on gene (lipase, CS, cytochrome oxidase (COX) and alternative oxidase (AOX)) and protein expressions (AOX and COX). On the other hand, while the cold-induced inhibition in the enzyme activity and gene expression level of NADH-dependent glutamate dehydrogenase, one of the enzymes of nitrogen assimilation, associated with the Krebs cycle, was significantly alleviated by the application of carnitine, a significant increase in the activity and gene expression level of this enzyme was noted with the application of carnitine alone. In the current study, the relationship between carnitine and/or cold-induced activation determined in lipid and respiratory metabolism and the growth parameters and the degree of cold tolerance of maize plant was also investigated. While cold treatment caused to an increase in the contents of dry matter of maize seedlings, it inhibited significantly root and leaf lengths and leaf surface areas. Besides, while cold stress caused a significant increase in the levels of reactive oxygen species (ROS) like the superoxide anion and the hydrogen peroxide, it also led to elevation of the oxidative stress parameters like lipid peroxidation, electrolyte leakage and protein oxidation. Carnitine application significantly inhibited the cold-induced increases in both ROS content and oxidative stress parameters. Fatty acid analysis results demonstrated that while cold and carnitine applications decreased saturated fatty acid contents, it caused a marked increase in unsaturated fatty acid contents. The highest content of unsaturated fatty acid was recorded in the plants to which carnitine along with the cold were applied. In the light of these findings, it can be said that carnitine application contributed to the following: (1) plant growth and development under controlled-conditions; (2) plant cold tolerance along with continuity of growth under cold conditions due to activation energy and other respiratory-related pathways as a results of stimulation of the transport of the fatty acids into the mitochondria with their participation to the respiration based on carnitine-induced increased lipid catabolism.

2018, 147 pages

Keywords: Carnitine, lipid metabolism, respiration, cold stress, maize

TEŞEKKÜR

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

Öncelikli olarak çalışmalarında her türlü desteği sağlayan çok değerli ve kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Rahmi DÜMLÜPINARA'a en içten şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımı her an takip edip bana yol gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya ve Sayın Doç. Dr. Mesut TAŞKIN'a sonsuz teşekkür ederim. Çalışmalarında yine büyük desteğini gördüğüm çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Mucip GENİŞEL'e de içten ve sonsuz teşekkür ederim.

Her türlü manevi desteklerini üzerimden eksik etmeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ramazan ALTUNDAŞ ve Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ'a, ayrıca başta iş arkadaşım Sibel AKTAY olmak üzere akademiden idari personele kadar tüm DAYTAM ailesinde manevi desteğinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Yağ asidi çalışmalarında desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Fatih ÖZ ve ekibine de şükranlarımı sunarım. Çalışmalarımı beraber yürüttüğümüz ve her işime canla başla koşan canım arkadaşım Ümran KARAYEL'e, uzakta olsa da hep yanımdaymış gibi destek veren canım arkadaşım H. Berrak ÜNLÜ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım. Moleküler çalışmalarında yardımını esirgemeyen İsmail Hakkı TAŞ'a ayrıca teşekkür ederim.

Doktora eğitimim sırasında gösterdikleri sonsuz sevgi, sabır ve anlayışları ile her an yanımda olup her türlü maddi ve manevi desteklerini üzerimden eksik etmeyen kıymetli babam Zeki TÜRK, annem Semiha TÜRK, kardeşlerim M. Halime TÜRK ve Ş. Dilara TÜRK'e, ayrıca hep destekçim olan canım teyzem Keziban KALAÇAY'a da sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak da çalışmamda kullanılan tohumları temin eden May Tohumculuğa teşekkür ederim.

Hülya TÜRK

Nisan, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	28
2.1. Lipaz (triasil gliserol hidrolazlar EC 3.1.1.3.)	28
2.2. Karnitin Açıl Transferazlar (CAT).....	29
2.3. Sitrat sentaz (CS) (EC 2.3.3.1).....	30
2.4. Sitokrom Oksidaz (COX; EC 1.9.3.1).....	32
2.5. Alternatif Oksidaz (AOX; EC 1.10.3.11).....	33
2.6. NADH Bağımlı Glutamat Dehidrogenaz (NADH-GDH; EC 1.4.1.2).....	34
2.7. Reaktif Oksijen Türleri.....	36
2.7.1. Singlet oksijen ($^1O_2$).....	37
2.7.2. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$).....	37
2.7.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2).....	38
2.7.4. Hidroksil radikali ($\cdot OH$)	39
2.8. Lipid Peroksidasyonu (LPO).....	40
2.9. Protein Oksidasyonu.....	41
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	44
3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	44
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	45
3.3. Yöntemler.....	49
3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi.....	49
3.3.2. Kök ve yaprak uzunluklarının belirlenmesi	50
3.3.3. Kuru madde içeriğinin belirlenmesi	50
3.3.4. Yaprak yüzey alanının belirlenmesi	50

3.3.5. Çözünebilir protein miktarının tayini	50
3.3.6. Lipid peroksidasyon (LPO) seviyesinin belirlenmesi	52
3.3.7. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi	52
3.3.8. Süperoksit anyon (O ₂ ^{·-}) üretiminin belirlenmesi	53
3.3.9. Protein oksidasyon seviyesinin belirlenmesi.....	54
3.3.10. İyon iletkenliği ve % donma hasarının belirlenmesi	55
3.3.11. Lipaz aktivitesinin belirlenmesi	55
3.3.12. NADH bağımlı Glutamat Dehidrogenaz (NADH-GDH) aktivitesinin belirlenmesi	56
3.3.13. Mitokondri izolasyonu	57
3.3.14. Sitrat sentaz aktivitesinin belirlenmesi.....	57
3.3.15. Karnitin açıl transferaz aktivitelerinin belirlenmesi.....	58
3.3.16. Total solunum, sitokrom yolu ve alternatif solunum yolları aktivitelerinin belirlenmesi	58
3.3.17. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE).....	59
3.3.18. AOX ve COX protein ifadeleri analizi (Western Blot).....	60
3.3.19. RNA izolasyonu ve gen analizleri.....	61
3.3.20. İçsel karnitin ve açıl karnitin içeriklerinin belirlenmesi.....	63
3.3.21. Yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi	64
3.4. İstatistiksel analiz	65
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	66
4.1. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkileri	66
4.2. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Total Lipid İçeriği Üzerine Etkileri	67
4.3. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının CAT I ve CAT II Aktiviteleri Üzerine Etkileri	68
4.4. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Serbest Karnitin ve Açıl Karnitin İçerikleri Üzerine Etkileri	70
4.5. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Sitrat Sentaz Aktivitesi Üzerine Etkileri	77

4.6. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının NADH bağımlı Glutamat Dehidrogenaz Aktivitesi Üzerine Etkileri	78
4.7. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Total Solunum ve Alternatif Solunum Yolları Üzerine Etkileri	79
4.8. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının AOX ve COX Proteinlerinin İfadeleri Üzerine Etkileri.....	81
4.9. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının AOX, COX, Lipaz, NADH-GDH ve CS Gen İfadeleri Üzerine Etkileri.....	82
4.10. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Kök Uzunluğu Üzerine Etkileri.....	84
4.11. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Yaprak Uzunluğu Üzerine Etkileri.....	85
4.12. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Yaprak Yüzey Alanı Üzerine Etkileri.....	86
4.13. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Toplam Kuru Madde İçeriği Üzerine Etkileri.....	87
4.14. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Yağ Asidi Profili Üzerine Etkileri.....	88
4.15. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Süperoksit Anyon ($O_2^{\cdot-}$) İçeriği Üzerine Etkileri	90
4.16. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının H_2O_2 İçeriği Üzerine Etkileri....	91
4.17. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının MDA İçeriği Üzerine Etkileri ...	92
4.18. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının İyon İletkenliği ve % Donma Hasarı Üzerine Etkileri	93
4.19. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Protein Oksidasyonu Üzerine Etkileri.....	94
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	96
KAYNAKLAR	126
ÖZGEÇMİŞ	147

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

TD	: Taze doku
KD	: Kuru doku
K	: Karnitin uygulaması
S	: Soğuk uygulaması
CoA	: Koenzim-A
M	: Molar
N	: Normal
mM	: Milimolar
μ M	: Mikromolar
nmol	: Nanomol
μ mol	: Mikromol
mg	: Miligram
ng	: Nanogram
μ l	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
U	: Enzim ünitesi
rpm	: Devir/dakika
xg	: Yerçekimi ivmesinin katı
ROT	: Reaktif oksijen türleri
$O_2^{\cdot-}$	: Süperoksit anyonu
$OH^{\cdot}$	: Hidroksil radikali
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
LPO	: Lipid peroksidasyon
MDA	: Malondialdehit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
MOPS	: 3-morfolinopropan-1-sulfonik asit
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADH-GDH	: NADH bağımlı glutamat dehidrogenaz
CAT I	: Karnitin açıl transferaz I

CAT II	: Karnitin açıl transferaz II
CACT	: Karnitin açıl karnitin taşıyıcı
COX	: Sitokrom oksidaz
AOX	: Alternatif oksidaz
CS	: Sitrat sentaz
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri Sistemi
GC-FID	: Gaz Kromatografisi-Alev İyonlaşma Dedektör
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
ADP	: Adenoizin difosfat
ATP	: Adenoizin trifosfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Glikoliz evresi reaksiyonları.....	9
Şekil 1.2. Krebs döngüsü	10
Şekil 1.3. Krebs döngüsünün diğer metabolik yollarla ilişkisi	11
Şekil 1.4. Mitokondriyal elektron taşıma sistemi	12
Şekil 1.5. Trigliseridlerin yapıtaşları olan yağ asitlerine hidrolizi.....	16
Şekil 1.6. Yağ asitlerinin iki aşamalı aktifleşme reaksiyonları.....	16
Şekil 1.7. Açıl-CoA'ların mitokondri matriksine taşınması ve krebs reaksiyonlarından solunuma dâhil olması	17
Şekil 1.8. Yağların β -oksidasyonu (16 C'lu bir yağ asidi olan palmitoik asitten β - oksidasyon ile 1 Asetil-CoA'nın ayrılması).....	19
Şekil 1.9. Karnitinin iki farklı izomeri ve kimyasal yapıları	20
Şekil 1.10. Karnitinin biyosentez reaksiyonları.....	21
Şekil 2.1. Sitrat sentaz aktivitesi şeması	31
Şekil 2.2. Glutamat dehidrogenaz enziminin reaksiyon şeması	35
Şekil 2.3. Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşum mekanizması	40
Şekil 3.1. Protein tayininde kullanılan standart grafik.....	51
Şekil 3.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik ...	53
Şekil 3.3. Süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik	54
Şekil 3.4. Lipaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik.....	56
Şekil 4.1. Mısır bitkilerinde lipaz enzim aktivitesi ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri.....	67
Şekil 4.2. Mısır bitkilerinde total lipid içeriği üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri.....	68
Şekil 4.3. Mısır bitkilerinde CAT I enzim aktivitesi ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri.....	69
Şekil 4.4. Mısır bitkilerinde CAT II enzim aktivitesi ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri.....	70
Şekil 4.5. Mısır bitkilerinde serbest L-karnitin ($ng.g^{-1} KD$) içeriği ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri.....	71

Şekil 4.6. Uygulama gruplarında L-karnitin varlığını ve miktarını gösteren kromatogram.....	72
Şekil 4.7. Mısır bitkilerinde uzun zincirli açıl karnitin (Stearoyl-L-Carnitine, Myristoyl-L-Carnitine ve Lauroyl-L-Carnitine) içerikleri üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri	74
Şekil 4.8. Mısır bitkilerinde kısa (Propionyl-L-Carnitine) ve orta zincirli açıl karnitin (Hexanoyl-L-Carnitine ve Decanoyl-L-Carnitine) içerikleri üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri	75
Şekil 4.9. Uygulama gruplarında açıl karnitinlerin varlığını ve miktarını gösteren kromatogram.....	76
Şekil 4.10. Mısır bitkilerinde sitrat sentaz enzim aktivitesi ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri.....	77
Şekil 4.11. Mısır bitkilerinde NADH-GDH enzim aktivitesi ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri.....	78
Şekil 4.12. Mısır bitkilerinde V_t , V_{cyt} , V_{alt} ve $V_{UCP-UCNP}$ değerleri üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri	80
Şekil 4.13. Mısır bitkilerinde V_{alt}/V_t (%), V_{cyt}/V_t (%) ve $V_{UCP-UCNP}/V_t$ (%) değerleri üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri.....	81
Şekil 4.14. Mısır bitkilerinde AOX proteinin ifadesi üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri	81
Şekil 4.15. Mısır bitkilerinde COX proteininin ifadesi üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri	82
Şekil 4.16. Mısır bitkilerinde lipaz, sitrat sentaz, glutamat dehidrogenaz ve sitokrom oksidaz proteinlerinin gen ekspresyonları üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkisinin clustergram ile ifadesi	83
Şekil 4.17. Mısır bitkilerinde AOX1 ve AOX precursor proteinlerinin gen ekspresyonları üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkisinin clustergram ile ifadesi	83
Şekil 4.18. Mısır bitkilerinde kök uzunluğu ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri.....	84
Şekil 4.19. Mısır bitkisinde yaprak uzunluğu ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri.....	85

Şekil 4.20. 12 günlük mısır bitkilerinin genel görünümü	86
Şekil 4.21. Mısır bitkilerinde yaprak yüzey alanı ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri	87
Şekil 4.22. Mısır bitkilerinde kuru madde içeriği ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri	88
Şekil 4.23. Uygulama gruplarında yağ asidi profilini gösteren kromatogram.....	89
Şekil 4.24. Mısır bitkilerinde $O_2\cdot^-$ içeriği ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri	90
Şekil 4.25. Mısır bitkilerinde H_2O_2 içeriği ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri	91
Şekil 4.26. Mısır bitkilerinde MDA içeriği ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri	92
Şekil 4.27. Mısır bitkilerinde % donma hasarı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri	94
Şekil 4.28. Mısır bitkilerinde protein oksidasyonu ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışılan genler, ID numaraları ve primer dizilimleri aşağıda yer alan tabloda verilmiştir	62
Çizelge 3.2. Aşağıda yer alan tabloda çalışılan standartların retention time değerleri verilmiştir.....	63
Çizelge 4.1. Ayrı ayrı ve kombine olarak uygulanan karnitin ve soğuk uygulamalarının mısır fidelerinin yaprak lipid kompozisyonları üzerine etkileri.	89
Çizelge 4.2. Soğuk ve karnitin uygulamalarının mısır bitkisinde iyon iletkenliği üzerine etkileri	93

1. GİRİŞ

Canlılığın devamı için vazgeçilmez organizmalar olan bitkiler, bir yandan ışık enerjisiyle beraber su ve inorganik maddeleri kullanmak suretiyle hem kendileri, hem de diğer canlılar için besin maddelerini üretirken, öte yandan ekosistemin karbondioksit ve oksijen döngüsünün düzenlenmesinden, organik gübre olarak toprak içeriğinin zenginleştirilmesine, hammadde olarak sanayi ve endüstride kullanımlarından, erozyon ve toprak erezyonunun önlenmesine kadar çok sayıda önemli ekolojik fonksiyonu yerine getirmektedirler (Lewit 1980; Yağmur 2008). Bu bakımdan bitkilerin varlıklarını sürdürebilmeleri, ekosistemin dengesi ve canlılığın devamlılığı için elzemdir. Ancak günümüzde hızlı bir şekilde gelişen endüstri ve sanayileşme başta olmak üzere, giderek dengesizleşen çevresel koşulların da etkisiyle, bu canlıların büyüme, gelişme ve verimlilikleri önemli ölçüde sınırlandırılmaktadır (Rihan *et al.* 2017; Stutts *et al.* 2018).

Bitkilerin normal büyüme ve gelişmelerini sürdürerek hayat döngülerini tamamladıkları, optimum koşullar olarak adlandırılan değerlerin altı veya üstü stres koşulları olarak tanımlanmaktadır. Stres koşulları, çeşitli zararlar meydana getirmek suretiyle bitkilerin biyolojik fonksiyonlarının bozulmasına ya da sekteye uğramasına sebep olarak, onların büyüme ve gelişme yönünden genetik potansiyellerine ulaşmalarını engellerler. Biyotik (rekabet, patojenler vb.) ve abiyotik (düşük ve yüksek sıcaklık, tuzluluk, kuraklık vb.) faktörler olmak üzere iki gruba ayrılan stres faktörleri, büyüme ve gelişmenin yanı sıra ürün verimliliği oranlarında da önemli kayıplara neden olurlar (Gorovits and Czosnek 2007; Velazquez *et al.* 2011; Sarwat *et al.* 2013). Bu durum dikkate alınarak, bitki verimini azaltan abiyotik faktörleri konu alan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır.

Bitkilerin yeryüzündeki coğrafik dağılımını, gelişimini ve ürün verimliliğini etkileyen en önemli abiyotik faktörlerin başında ise ekstrem sıcaklıklar gelmektedir (Yang *et al.* 2005). Yaşam döngülerini ideal bir şekilde sürdürebilmek için her bir bitki kendi türüne uygun optimum sıcaklık değerlerine ihtiyaç duymaktadır (Mahajan and Tuteja 2005). Bu değerlerin üzerindeki sıcaklıklar yüksek sıcaklık stresi olarak adlandırılırken, altındaki

sıcaklıklar ise düşük sıcaklık stresi ya da soğuk stresi olarak ifade edilmektedir. Yüksek ve düşük sıcaklık stresinin her ikisi de bitkilerde çok sayıda fizyolojik, morfolojik ve anatomik bozukluklara sebebiyet vermekle birlikte, günümüzde ekstrem sıcaklık merkezli yapılan çalışmaların büyük bir kısmı, ekilebilir tarım arazilerinin yaklaşık %6'sını doğrudan etkilemekte olan düşük sıcaklık stresi üzerine yoğunlaşmıştır (Bruggemann *et al.* 1995; Willits and Peet 1998; Kang and Saltveit 2002; Turk *et al.* 2014; Erdal *et al.* 2015).

Dünya nüfusunda her yıl ortalama 90 milyonluk artış meydana gelmesine karşın, ekilebilir tarımsal alanların kentleşme, sanayileşme gibi nedenlerle daralması ve olumsuz çevre faktörleri nedeniyle tarımsal üretimin artan nüfus oranına paralel olacak şekilde artmamasından dolayı, kısa bir süre sonra yeryüzünde yaşayan tüm canlıların besin kıtlığı problemiyle yüzleşmek zorunda kalacağını tahmin etmek zor değildir (Bray 2000; Erdal 2010). Bu öngörü nedeniyle, bilim çevreleri yüksek besin içeriğine sahip olan, özellikle tarla bitkilerinin, başta düşük sıcaklık stresi olmak üzere çeşitli stres faktörlerine karşı mukavemetlerinin artırılmasına yönelik çalışmalara yoğunlaşmışlardır (Turk and Erdal 2015; Genisel *et al.* 2015; Erdal and Turk 2016). Bu bağlamda, tarımsal üretimin arttırılmasına yönelik olarak, bir taraftan düşük sıcaklığa dayanıklılık ve uyum ile ilgili olan mekanizmaların fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler açıdan aydınlatılması, diğer taraftan da dayanıklı bitki varyetelerinin geliştirilebilmesi için klasik ıslah-eleksiyon, biyoteknoloji ve gen mühendisliği alanlarında yapılmakta olan ve yapılacak olan araştırmalar, yeryüzündeki insan popülasyonunun geleceği açısından hayati önem arz etmektedir.

Düşük sıcaklık stresi, optimum değerlerden daha düşük derecelerdeki sıcaklık değerlerine maruz kalan bitkilerin metabolik, fizyolojik ve morfolojik gelişim süreçlerini olumsuz yönde etkileyebilen abiyotik bir stres çeşitidir. 15°C'nin altındaki sıcaklıklar birçok bitki türünde strese neden olmakla birlikte, bir bitki için optimum olan bir değerin, farklı bir bitki türü için strese sebep olabildiği de bilinmektedir (McKersie and Leshem 1994; Mahajan and Tuteja 2005). Bu nedenle düşük sıcaklık stresi, stresin ortaya çıktığı gelişim evresi, şiddeti, süresi ve bitki çeşidine bağlı olarak hafif, orta ve şiddetli olmak üzere

farklı derecelerde etkilere neden olmaktadır (Kratsch and Wise 2000). Bitkiler düşük sıcaklık stresinden etkilenme derecelerine göre soğuğa duyarlı, soğuğa toleranslı (fakat dona duyarlı) ve dona toleranslı olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadırlar. Soğuk stresi, hücrelerde düşük sıcaklığın doğrudan etkisiyle metabolik düzensizliklere ve hasarlara yol açarken, donma stresi dolaylı rol oynayarak hücrelerde buz oluşumuna neden olmak suretiyle bitkilerde çeşitli hasarlara neden olmaktadır (Pearce 1999).

Hücrelerde cereyan eden fizyolojik olayların dengesini bozan ve biyosentez reaksiyonlarının sekteye uğramasına sebebiyet veren düşük sıcaklıklar, bitki seviyesinde geri dönüşümlü (primer etkiler) ve geri dönüşümsüz hasarların (sekonder etkiler) ortaya çıkmasına yol açarlar (Turan ve Ekmekçi 2008). Geri dönüşümlü hasarların meydana geldiği, ancak geri dönüşümsüz hasarların henüz oluşmaya başladığı kritik bir safha vardır ki bu safhaya “üşüme sınır sıcaklığı” adı verilir. Bu nedenle soğuk stresinin uzun süreli devam etmesi, yani üşüme sınır sıcaklığı safhasının aşılması halinde, bitkinin ölümüne yol açacak ciddi hasarlar meydana gelmesi kaçınılmazdır.

Primer değişimler bitkide bir fonksiyon bozukluğuna neden olan ilk hızlı tepkiler olup, sıcaklığın normal şartlara yükselmesi sonucunda geri dönüşümlüdür ve oluşan hasarlar kolayca düzelebilmektedir. Sekonder değişimler ise, birincil hasarlar oluşuktan sonra stresin devamı halinde ortaya çıkan ve genel olarak geriye dönüşü olmayan değişimlerdir (Wang 1982; Turan ve Ekmekçi 2008). Soğuk hasarının karakteristik belirtileri sekonder etkiler sonucunda ortaya çıkar ve bu belirtiler soğuğun derecesine ve bitkinin maruz kalma süresine bağlı olarak farklılık gösterir (Rab and Saltveit 1996).

Düşük sıcaklığın hücre düzeyinde ilk olumsuz primer etkisi, zarların sıvı-jel durumundan katı-jel durumuna geçişi ve zarlarda kırılma-yarılma şeklinde ortaya çıkan, hücre zarı ve diğer hücresel zar sistemlerinin yapılarının bozulması şeklinde olur (Lyons and Raison 1970). Zarlarda meydana gelen bu hasarlar, dehidrasyon başta olmak üzere, tüm zar fonksiyonlarının kaybına neden olur. Düşük sıcaklıklar, membran bileşenlerinden özellikle lipidler üzerine etki gösterirler. Bu değişiklik, öncelikli olarak hücre ve organel membranlarında bulunan fosfolipidlerin oranındaki artış ile karakterize edilir. Sonrasında

ise soğuk toleransın maksimum olduğu noktada hücre zarında bulunan serebrosidlerin oranında azalma ile kendini gösterir (Uemura and Steponkus 1999). Soğuk kaynaklı bu değişimler, hücre membranlarının bütünlüğünde bozulma, elastikiyetinde ve akıcılığında azalma, geçirgenliğinde artma ve membrana bağlı enzimlerin aktivitelerinde azalmalar şeklinde kendini gösterir. Bilindiği gibi hücre zarının yapısında yüksek miktarda fosfolipid, sterol ve serebrosid bileşenleri bulunurken, organel zarlarında sterol ve serebrosidler bulunmaz (Yoshida and Uemura 1986). Bu farklılık, hücre membranlarının organel membranlarına göre düşük sıcaklıklara karşı daha hassas olmalarının başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir.

Genel olarak, tüm hücre membranlarının yapısında aynı lipid çeşitleri yer alsa da fosfolipid, sterol ve serebrosid oranları bitki türleri arasında oldukça farklılık göstermektedir. Membranlarda bulunan lipid bileşenlerinin miktarları ve oranları, bitkinin soğuğa olan duyarlılığında ve toleransında büyük bir önem arz etmektedir (Mahajan and Tuteja 2005). Hücre zarında doymuş ve doymamış olmak üzere başlıca iki çeşit yağ asidi (lipidlerin yapı taşı) bulunmaktadır. Doymuş yağ asitlerinin ($-CH_2-CH_2-$) karbon atomları tamamen hidrojen (H) ile doyurulmuşken, doymamış yağ asitlerinin karbon zincirinde bir ya da daha fazla sayıda çift bağ ($-CH=CH-$) bulunmaktadır. Bu farklılık nedeniyle, doymuş yağ asidi içeren lipidler, doymamış yağ asidi içeren lipidlere oranla daha yüksek sıcaklıklarda katılaştıklarından, zarlarda bulunan doymamış yağ asitlerinin bağıl oranı zar akışkanlığını önemli ölçüde etkilemektedir (Turan ve Ekmekçi 2008). Ayrıca soğuk uygulaması sonucunda duyarlı olan bitkilerin zar yapılarında bulunan fosfolipidlerin bozulması ile serbest yağ asidi miktarı ve sterol/fosfolipid oranlarının arttığı da bilinmektedir (Lukatkin *et al.* 2012).

Soğuğa duyarlı olan bitkiler, zar yapılarında daha düşük oranlarda doymamış yağ asitleri içerdiklerinden, toleranslı olan türlere göre daha yüksek üşüme sınır sıcaklığı derecesine sahiptirler. Bu da düşük sıcaklıkta sıvı-jel fazdan katı-jel fazına geçme eğilimini artırarak hücre zarlarında iyon sızıntılarına neden olmaktadır (Mahajan and Tuteja 2005; Bakht *et al.* 2006; Uemura *et al.* 2006; Wang *et al.* 2006). Soğuk stresi fosfolipidlerin açıl kuyrukları ile algılandığından, soğuğa maruz kalan membranlarda fosfolipid

moleküllerinin polar kısımları birbirine yaklaşırlar ve katı-jel fazına dönüşürler. Bu yapının zar siteminde çok az miktarda bulunması dahi, hücre zarı yapısında bulunan integral zar proteinlerinin fonksiyonlarının ve dolayısıyla hücre zarının seçici geçirgen özelliğinin bozulmasına neden olur (Lyons 1973; Vigh *et al.* 1998; Bakht *et al.* 2006). Ayrıca stresin süresinin uzaması halinde, ortaya çıkan primer etkileri (turgor kaybı, sitoplazmik sızıntı, zar bütünlüğünün bozulması), sekonder etkilerin (fotosistemlerin hasar görmesi, enerji metabolizmasının yetersiz kalması, hücre otolizi ve ölüm) takip etmesi kaçınılmaz olur (Vigh *et al.* 1998; Martz *et al.* 2006; Morsy *et al.* 2007).

Soğuk hasarının neden olduğu olumsuzluklardan biri de, kökten su alımı ve transpirasyon arasındaki dengenin bozulması nedeniyle ortaya çıkan gövde dehidrasyonudur (Vernieri *et al.* 2001; Turk *et al.* 2014). Soğuğa duyarlı olan bitkilerde, düşük sıcaklıklarda köklerden su alınımının, gövde ve yapraklara iletiminin azalması nedeniyle toprakta yeterli su olmasına rağmen, bitki bünyesinde su eksikliği yaşanır. Bu durum, bir yandan kök uzama bölgesindeki hücrelerin büyümesinde önemli inhibisyonlara neden olurken, öte yandan yaprakların su potansiyelinin hızla azalması neticesinde stomaların açılıp kapanma mekanizmalarında ciddi aksaklıklar meydana getirir. Sonuçta, köklerde olduğu gibi gövdede de büyüme oranında belirgin bir azalma oluşurken, yaprakların genişliğinde ki azalmayla beraber hücresel otoliz, senesens ve devam eden süreçte bitki dokularında özellikle yaprak epidermisinde çukur ve batık alanlar şeklinde ortaya çıkan lezyonlar ve nekrozlar görülür (Saltveit and Morris 1990). Ayrıca suyun absorbe edilme yeteneğinde meydana gelen azalmalara bağlı olarak, topraktaki mineral maddelerin alınımı ve bitki dokuları arasındaki iletimi de azalmakta ve böylelikle bitkide besin eksikliği ve bundan kaynaklı çeşitli semptomlar meydana gelmektedir (Rab and Saltveit 1996; Aroca *et al.* 2001).

Düşük sıcaklıklar, başta kloroplast ve mitokondriler olmak üzere çeşitli hücresel organellerdeki metabolik faaliyetler üzerinde de belirgin olumsuzluklara neden olurlar. Özellikle kloroplastlar düşük sıcaklıklara son derece hassastırlar. Soğuk stresi plastid öncüllerinin oluşum mekanizmasını sekteye uğratmasının yanı sıra, kloroplastlarda da tilakoid zarların şişmesi, granaların parçalanması, lipid granüllerinin birikimi, nişasta

taneciklerinin sayısında ve ebadlarında değişimlerin oluşması ve periferel retikulum denilen çıkıntılarının oluşumu gibi önemli yapısal bozulmalara neden olur (Kratsch and Wise 2000). Soğuk kaynaklı bu değişimlerin sonucunda fotosentez olayı kaçınılmaz olarak olumsuz yönde etkilenir.

Soğuk stresinin fotosentez üzerine etkisi primer reaksiyonlardan (ETS) ziyade, yapraklardaki stoma açıklığının azalmasına bağlı olarak CO₂ miktarında meydana gelen düşüş neticesinde fotosentezin sekonder reaksiyonları olarak adlandırılan stromal reaksiyonların (CO₂ fiksasyon safhası) sekteye uğraması şeklindedir (Vernieri *et al.* 2001). Soğuk stresine maruz kalan bitkide stomaların kapanması nedeniyle azalan içsel CO₂ oranı, enzim aktivitelerinde düşüşlerin oluşması, fotosentez sonucu oluşan şekerlerin yapraklardan havuz durumundaki diğer organlara taşınamaması ve köklerin suya karşı geçirgenliklerinin azalması gibi aksaklıklardan dolayı fotosentez hızı önemli oranda azalır. Ayrıca düşük sıcaklıklarda anten komplekslerinde meydana gelen anormallikler sebebiyle enerji transferinin doğru bir şekilde gerçekleşmemesi, elektron taşıma zincirinin (ETS) aşırı derecede baskılanması, PSI ve PSII arasındaki koordinasyonun bozulması gibi sebeplerden dolayı süperoksit (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikalleri (OH⁻) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunun artışı söz konusu olur ki, oksidatif stres adı verilen bu durumda, bitkide çok ciddi hasarlar ortaya çıkar (Saltveit and Morris 1990; Huner *et al.* 1993; Ensminger *et al.* 2006; Logan *et al.* 2006).

Mitokondriler düşük sıcaklıklara kloroplastlar kadar hassas olmamakla birlikte, stresin süresine ve şiddetine bağlı olarak, bu organellerde de bazı yapısal ve fonksiyonel düzensizlikler (matrikste genişleme, kristada kısalma ve kıvrım sayısında azalma ile proteinlerin ve enzimlerin yapılarında bozulmalar gibi) meydana gelebilir. Soğuk kaynaklı tüm bu değişimler, mitokondrilerde cereyan eden ve hayati öneme sahip olan solunum mekanizmasının sürdürülebilmesini mutlak suretle olumsuz yönde etkilemektedir (Lyons and Raison 1970; de Virville *et al.* 2002). Soğuk stresi altında enzimlerin aktivitelerindeki değişimlerden elektron taşınımının bozulmasına, metabolik yolların inhibisyonundan aşırı ROT oluşumuna kadar mitokondriyal solunum olayları bariz bir şekilde etkilenmekte ve nihayetinde enerji metabolizmasının verimliliği ve

dengesi önemli derecede değişmektedir (Prasad *et al.* 1994a; Shen *et al.* 1999; Suzuki and Mittler 2006).

Bilindiği gibi canlı hücrelerdeki metabolik olayların gerçekleşebilmesi, yani canlılığın devam ettirilebilmesi için yeterli enerjinin varlığı elzemdir (Pu *et al.* 2015). Büyüme ve gelişme için gerekli olan hücresel metabolizma olaylarının başlaması ve devamlılığı için sürekli enerjiye ihtiyaç duyulur (Wallimann *et al.* 1992; Rolletschek *et al.* 2004). Doku ve hücrelerin enerji talepleri, bitkinin büyüme ve gelişim dönemine bağlı olarak sürekli değişim gösterir (Rolletschek *et al.* 2004). Bitki büyüme ve gelişimini sınırlandıran soğuk stresi ise enerji durumunu ve dengesini önemli ölçüde etkileyerek hücresel bileşenlerin oksidasyonuna, gelişimsel gerilemeye, hatta büyümenin neredeyse tamamen durmasına neden olabilir. Literatürde bitkilerin strese adaptasyonu ve enerji dengesi arasındaki ilişkiyi gösteren çok sayıda çalışma vardır (Huner *et al.* 1998; Wilson *et al.* 2006; Baena-Gonzalez and Sheen 2008). Düşük sıcaklık stresi altındaki bitkilerin, genel olarak fotosentez ve solunum performanslarında azalmalar ve bunun sonucu olarak enerji sentezinin yetersizliği durumu ortaya çıkar (Baena-Gonzalez and Sheen 2008). Ayrıca, düşük sıcaklık stresi gibi çeşitli stres faktörleri hücrelerde ATP'nin aşırı tüketimine yol açmak suretiyle hücresel enerji krizlerine sebebiyet vermekte ve bu durum da hücrelerde enerji tasarrufu sağlayan stratejilerin aktifleşmesini zorunlu kılmaktadır. Bu stratejiler arasında, enerji dengesinin yeniden kurulabilmesi için hücresel metabolizma ve transkriptomun yeniden programlanması da vardır (Wilson *et al.* 2006; Baena-Gonzalez and Sheen 2008; Rodriguez *et al.* 2013; Lastdrager *et al.* 2014). Böyle bir yeniden programlama sayesinde, bitkide katabolik süreçlerin indüklenmesinin yanı sıra fotosentez gibi biyosentez reaksiyonlarının inhibisyonu, şekerlerin yeniden konumlanması, nişasta ve depo lipidlerinin birikimi gibi primer ve sekonder metabolizmaya ait olan çok çeşitli değişiklikler meydana gelir (Caldana *et al.* 2013; Tome *et al.* 2014). Benzer şekilde enerji metabolizmasıyla ilgili olan krebs döngüsü ve elektron taşıma zincirindeki bileşenlerin gen ifadelerinde de önemli değişimler ortaya çıkar (Avin-Wittenberg *et al.* 2012).

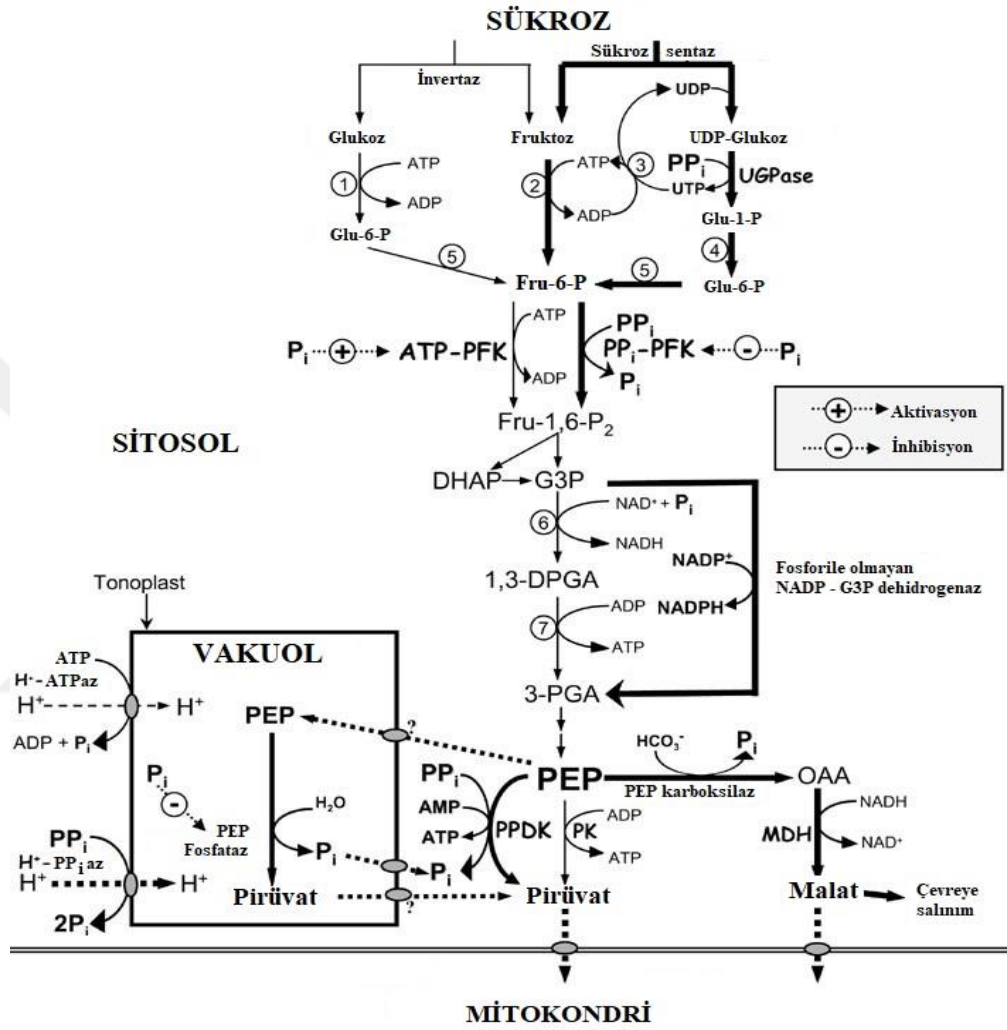
Düşük sıcaklık stresi altında bitkilerde hücresel solunum olaylarında meydana gelen değişimleri belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda, bulguları itibarıyla farklı sonuçlar

elde edilmiştir (Lukatkin *et al.* 2012). Yapılan bazı çalışmalarda, düşük sıcaklıklara maruz kalan bitkilerde adaptasyon stratejileri için gerekli olan enerjiyi sağlamak ve/veya alternatif solunum yolunda meydana gelen yüksek aktivasyon nedeniyle solunumun hızlandığı rapor edilmiştir (Stewart *et al.* 1990; Kannevorff and Vanderplas 1994; Zhou and Solomos 1998; Yadegari *et al.* 2008; Erdal and Genisel 2016). Öte yandan, bazı araştırmacılar ise düşük sıcaklıklar altında mitokondride meydana gelen yapısal hasarlar ile solunum sisteminde görevli enzimlerin aktivitelerindeki inhibisyonlar nedeniyle solunumun yavaşladığını bildirmişlerdir (Wilson 1978; Prasad *et al.* 1994a; Prasad *et al.* 1994b; Lawrence and Holaday 2000; Covey-Crump *et al.* 2002; Atkin and Tjoelker 2003; Munro *et al.* 2004; Bravo *et al.* 2007; Matos *et al.* 2007). Tüm bu çalışmalar göstermektedir ki, bitkiler düşük sıcaklıklara karşı adaptasyon için solunum metabolizmalarında farklı tepkiler verebilmektedirler.

Hayvan hücrelerine benzer olarak bitki hücrelerinde de, solunumda substrat olarak, başta şekerler olmak üzere çeşitli karbon kaynakları kullanılmaktadır. Sırasıyla sitoplazmada glikoliz, matrikste krebs çemberi ve kristada oksidatif fosforilasyon ile şekerler tam olarak CO₂ ve suya kadar yükseltgenerek hücresel metabolik süreçler için gerekli olan enerji (ATP) elde edilir. Bitkilerde meydana gelen solunum işlemi bazı yönleri ile farklılık gösterse de, ana hatları ile hayvanlardaki ile aynıdır. Kimyasal tarifi ile bitki solunumu, 12 karbonlu bir molekül olan sakkarozun yükseltgenmesi ve 12 molekül oksijenin indirgenmesidir (Taiz *et al.* 2015).

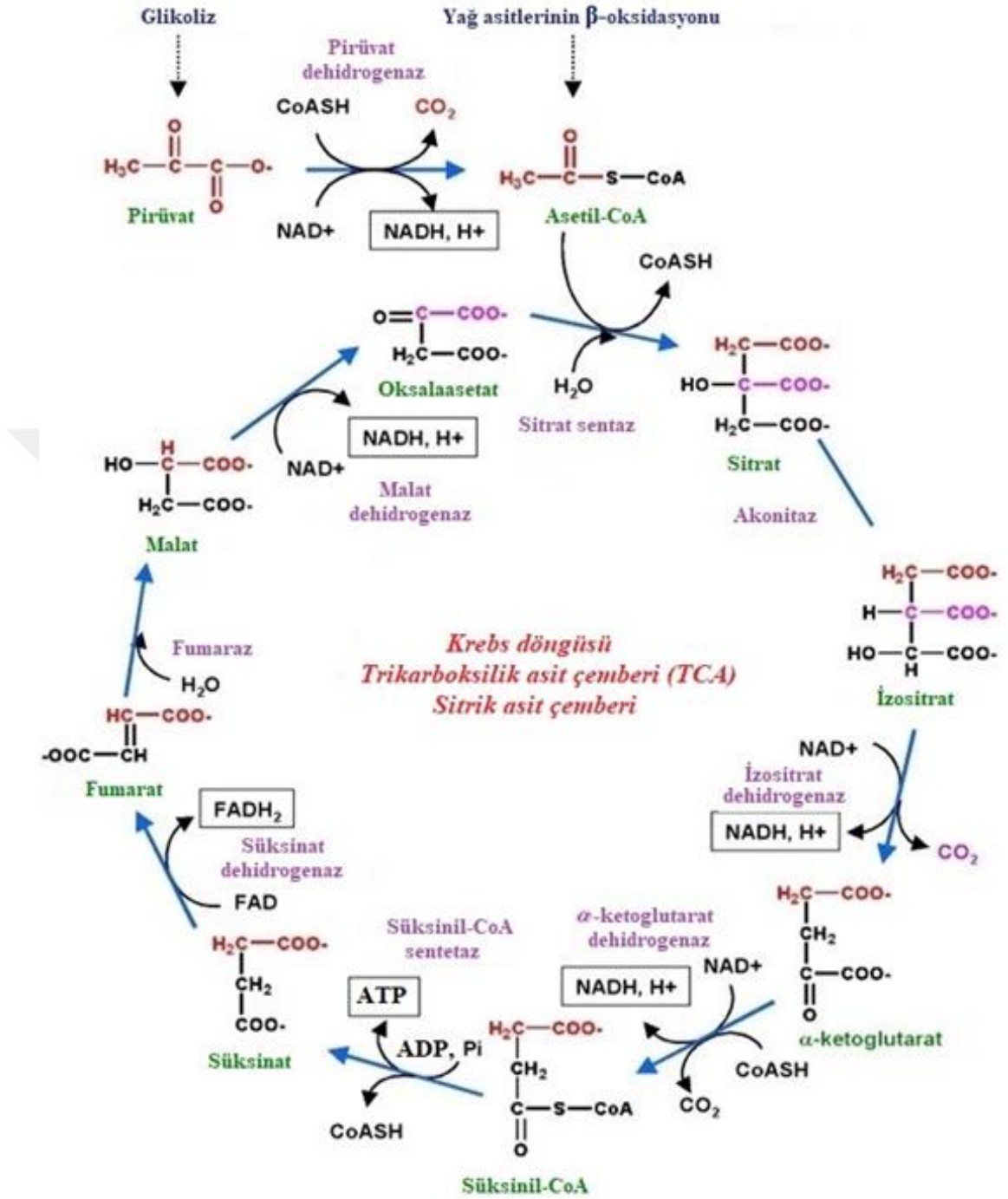
Tüm canlı organizmalarda ortak olarak gerçekleşen ve solunumun ilk basamağı olan glikolizin substratı hayvanlarda glukoz iken, bitkilerde sakkarozdur (Bolouri-Moghaddam *et al.* 2010). Glikolizin ilk aşamasında substrat olan sakkaroz, iki farklı enzimden biri tarafından glukoz ve fruktoz monosakkaritlerine parçalanır. Bunlardan birincisi olan sakkaroz sentaz enzimi hücre sitosolüne yerleşmiş olup, sakkarozun fruktoz ve UDP-glukoza parçalanmasını katalizler. İkinci enzim ise bazı dokuların hücre çeperinde, kofulunda veya sitosolünde bulunan invertaz enzimi olup, sakkarozu glukoz ve fruktoza ayırır (Hoefnagel *et al.* 1998). Daha sonra bu monosakkaritler glikolizin ilerleyen süreci sonunda Şekil 1.1’de görüldüğü gibi pirüvat veya malata kadar parçalanır

ve böylece glikoliz evresi tamamlanmış olur. Glikoliz reaksiyonları esnasında 1 molekül sükrozdan 4 molekül $\text{NADH} + \text{H}^+$ ve toplam 8 ATP üretilir.



Şekil 1.1. Glikoliz evresi reaksiyonları (Sükrozun pirüvat ve malata kadar parçalanması) (UGPase: UDP glukoz fosforilaz; PFK: Fosfofruktokinaz; PPi: İnorganik fosfat; DHAP: Dihidroksi aseton fosfat; DPGA: Difosfo gliseraldehid; PEP: Fosfoenol pirüvat) (Plaxton and Tran 2011)

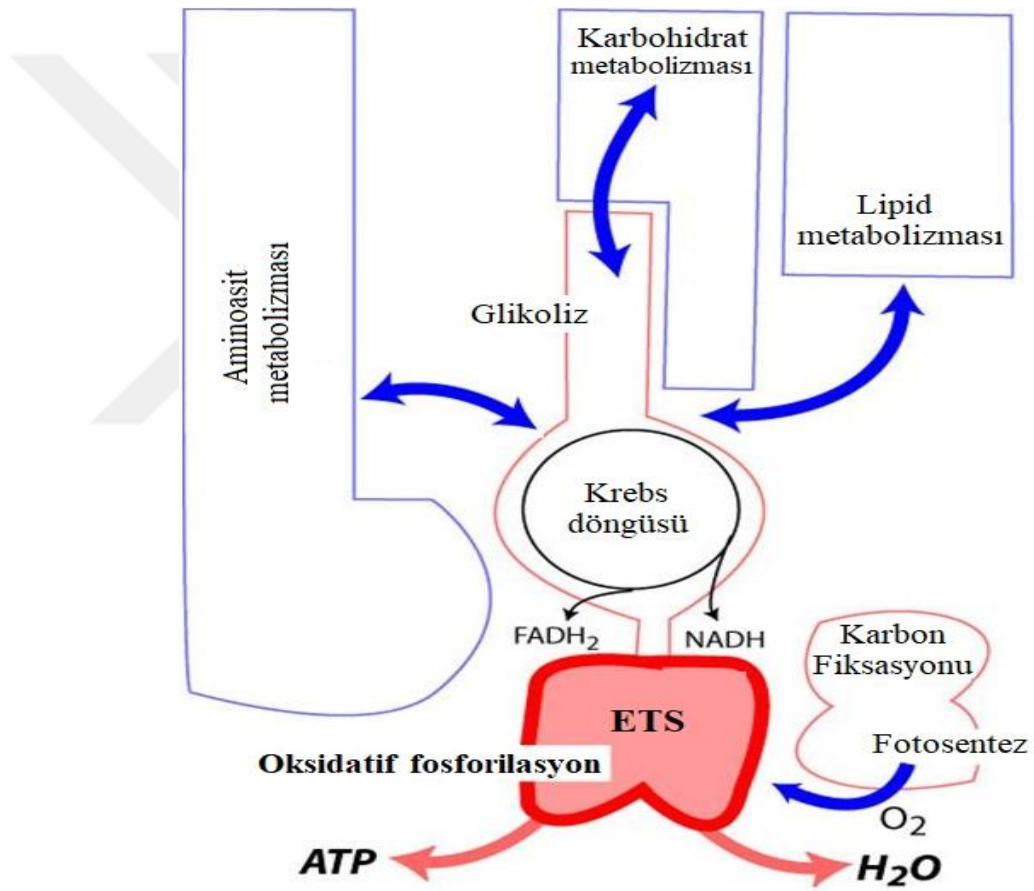
Glikoliz reaksiyonları sonucunda oluşan pirüvat/malat mitokondriye girerek pirüvat dehidrogenaz enzimi vasıtası ile Asetil-CoA'ya dekarboksile edilir ve bu formda krebs döngüsüne (sitrik asit çemberi, TCA) katılarak CO_2 'ye kadar tamamen okside edilir (Şekil 1.2) (Taiz *et al.* 2015).



Şekil 1.2. Krebs döngüsü (Blaber 2001)

Sitrik asit döngüsünün ATP üretimi için gerekli olan NADH ve FADH_2 oluşumlarını sağlamaktan başka diğer bir önemi de, bu yolun ara ürünlerinin hücresel metabolizmanın diğer temel yollarıyla bağlantılı olmasıdır. Metabolizmanın merkezi noktası olarak da adlandırılan bu döngü, birçok metabolik yolun ana ürünlerini ve enzimlerini içerir. Bu

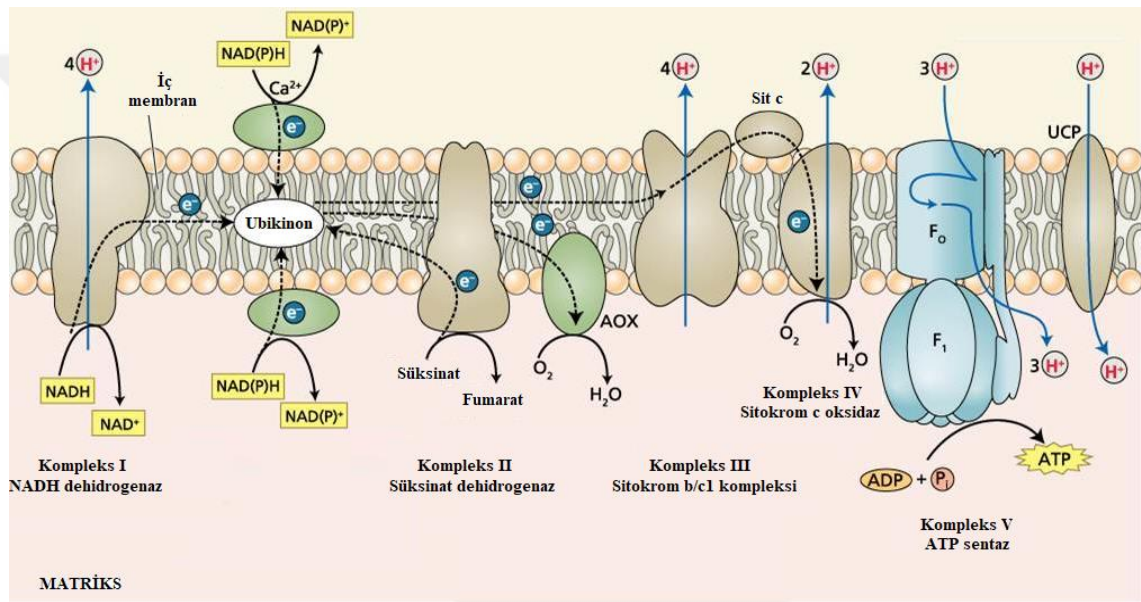
yolun önemli enzimlerinden olan sitrat sentaz ve malat dehidrogenaz, asetil gruplarının ve indirgeyici özellikte olan NADH'lerin iç mitokondriyal membrandan matrikse taşınmasında mekik sistemi olarak görev yapar. Yine bu döngüde ara ürün olan oksaloasetat ve ketoglutarat, aminoasit biyosentezinin öncül bileşikleridir. Oksaloasetat aynı zamanda glukoneogenez rekasyonlarının da bir ara bileşiğidir (Berg *et al.* 2002). Bu özellikleri nedeniyle krebs çemberinde meydana gelen en ufak değişimler bile, çok sayıda metabolik süreci doğrudan etkilemektedir.



Şekil 1.3. Krebs döngüsünün diğer metabolik yollarla ilişkisi (Anonymous 2018a)

Solunum mekanizmasının devam edebilmesi için, glikoliz ve Krebs reaksiyonlarında her sakkaroz başına oluşan indirgenmiş moleküllerin (NADH+H⁺ ve FADH₂), hücreler için kullanılabilir enerji formu olan ATP'ye dönüştürülmesi gerekmektedir. Oksijene bağlı olarak gerçekleştirilen bu olay, "oksidatif fosforilasyon" olarak bilinmekte ve krista adı

verilen mitokondri iç zarlarında meydana gelmektedir (Heldt and Piechulla 2011; Taiz *et al.* 2015). ETS olarak ta adlandırılan bu yol, $\text{NADH} + \text{H}^+$ ve FADH_2 'lerden alınan elektronların, son elektron alıcısı olan oksijene kadar taşınması olaylarını kapsamaktadır (Şekil 1.4). İç mitokondri zarlarına yerleşmiş olan bu sistem, toplamda beş tane protein kompleksinden oluşmaktadır. Bu protein komplekslerinden dört tanesi, oksidoredüktaz (kompleks I-IV) ve bir tanesi ise ATP sentaz kompleksidir (kompleks V) (Dudkina *et al.* 2006).



Şekil 1.4. Mitokondriyal elektron taşıma sistemi (Taiz and Zeiger 2012)

Şekil 1.4'te görüldüğü gibi ETS'den elektronlar geçerken, kompleks I, III ve IV'ten zarlar arasına proton pompalanmakta ve böylece mitokondri iç zarları arasında bir elektrokimyasal gradient farkı oluşmaktadır ki, bu gradient farkı, kompleks V olarak da adlandırılan ATP sentaz aracılığı ile ADP'ye fosfat bağlanması için gerekli olan potansiyel enerjinin oluşumunu sağlar (Boyer 1997; Heldt and Piechulla 2011).

Bitki mitokondriyal solunum zincirinde “**sitokrom yolu**” olarak adlandırılan kompleks I-IV yolu dışında, elektronların izleyebileceği alternatif solunum yolu olarak adlandırılan bir yol daha vardır (Vanlerberghe and McIntosh 1997). Bu yolda ETS'ye giren elektronlar, ubikinon üzerinden kompleks III yerine kısa yoldan alternatif oksidaz (AOX)

enzimine aktarılır (Şekil 1.4). Elektronları alan AOX, oksijenin suya indirgenmesini sağlar. Ancak elektronların bu yolu izlemesi halinde, zarlar arasına H^+ pompalamaz. Bu nedenle alternatif solunum yolunda ubikinon-oksijen arası elektron akışından kaynaklanan serbest enerji, ATP enerjisine dönüştürülmek yerine, ısı enerjisine dönüşür ve bu ısı enerjisi ortama yayılır (Vanlerberghe and McIntosh 1997).

AOX enziminin ETS üzerindeki etkisi son derece önemlidir. AOX sayesinde hem karbon metabolizması, hem de elektron geçişi ve ATP sentezi arasındaki metabolizmayı olumsuz yönde etkileyebilecek dengesizlikler giderilmiş olur. Böylelikle alternatif solunum yolu karbon iskeleti, ATP ve indirgenmiş güç desteğine ihtiyacı olan diğer metabolik süreçler ile solunum arasındaki entegrasyonun sağlanmasına ve solunumun optimize edilmesine katkı sağlar (Finnegan *et al.* 2004; Vanlerberghe *et al.* 2009). Ayrıca, $NADH+H^+$ ve ATP düzeyinin aşırı derecede artması, sitokrom yolunun tıkanmasına sebep olacağından, AOX'un bu tıkanıklığı gidermesi, TCA döngüsünün de potansiyel olarak zarar görmesini engellemektedir (McIntosh 1994; Erdal and Genisel 2016).

Alternatif solunum yolunun diğer önemli bir fonksiyonu ise, ROT'ların üretilmesini henüz oluşmadan engellemeleridir (Purvis 1997; Wagner and Moore 1997). ETS'deki aşırı yüklenme veya herhangi bir nedenle elektron akışında meydana gelebilecek tıkanmaları önlemek amacıyla alternatif yolda görevli olan AOX enzimi, ubikinondan elektronları alarak doğrudan oksijene iletir (Moller and Kristensen 2004). Böylelikle AOX, mitokondride süperoksit radikalının üretildiği yerler olan kompleks I ve kompleks III'e yapılan aşırı elektron yüklenmesini, ETS'den çevreye olan elektron kaçaklarını ve sitokrom yolundaki tıkanmaları engellemek suretiyle, ROT oluşumunun önemli derecede inhibe olmasını sağlar. Ayrıca, AOX üzerinden geçen her dört elektron için bir su molekülü olduğundan, organel içi oksijen-su konsantrasyonunun korunması da sağlanmış olur (Siedow and Moore 1993; Maxwell *et al.* 1999). Bu özellikleri sayesinde, özellikle stres şartlarında alternatif solunumun aktivasyonu ile bitkilere önemli düzeyde direnç kazandırılabilir (Juszczuk and Rychter 2003; Matos *et al.* 2007).

Öte yandan, ETS'deki ana komplekslerin haricinde yine kristalar üzerine bulunan, protein yapısında veya kimyasal yapıda olan bazı yapılar/maddeler daha vardır ki bunlara sırasıyla eşleşme önleyici proteinler (uncoupling proteins- UCP) veya eşleşme önleyiciler (UCNP- Uncoupling non- proteins veya uncouplers) adı verilmektedir. H^+ tutma kabiliyetinde olan bu bileşenler ATP sentezi için oluşturulan proton gradiyentini dağıtmak suretiyle ATP sentezini engellerler. Kısacası ETS boyunca zarlar arasına taşınan protonlar, ATP sentaz yerine UCP veya UCNP'ler tarafından tekrar matrikse taşınarak ATP sentezi önlenmiş olur.

İyi bilindiği üzere, sentezlenen hücrel enerji miktarının artırılması, normal şartlar altında olan bitkilerin büyüme ve gelişmesini önemli ölçüde teşvik etmekte ve stresli şartlara maruz kalan bitkilerin ise adaptasyon kabiliyetlerinin artmasını sağlamaktadır. Bu bağlamda, şekerlere ilaveten substrat olarak solunuma dahil olabilecek farklı karbon kaynaklarının (özellikle lipidler) ortamda yeterli düzeyde olması, bitkinin her ihtiyaç duyduğunda gerekli enerjiyi sentezleyebilmesi açısından büyük önem arz etmektedir. Şekil 1.2'de de açıkça görülebileceği gibi, lipidler krebs çemberinden solunuma dahil olabilmektedirler. Buna dayanarak; lipidlerin solunuma katılmalarının teşvik edilmesi ile, hücrelerde üretilen enerji miktarının artışının yanı sıra, solunumla bağlantılı diğer yolların da, hücrenin bu yollardaki ürünlere ihtiyacının söz konusu olması halinde, hücrenin ihtiyacına cevap verecek kadar aktive edilebileceğini söylemek mümkündür. Bitkinin ihtiyacına cevap verebilecek kadar enerji üretimi sağlayabilecek bir potansiyelinin bulunması, stresli şartlarda olsa bile, bu potansiyeli kullanmak suretiyle bir taraftan strese karşı savunma stratejisiyle alakalı olan metabolik olayların düzenlenmesi, diğer taraftan da enerji gerektiren büyüme ve gelişmeye yönelik metabolik olayların fazla aksatılmadan devam ettirilmesi açısından büyük bir önem arz etmektedir.

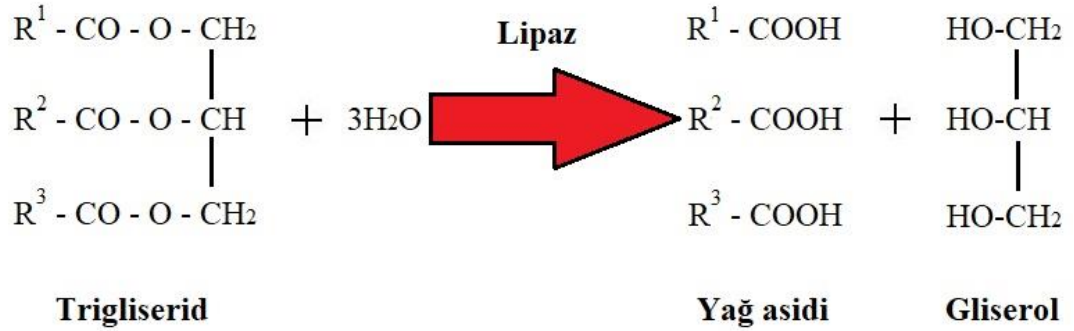
Lipidler ve onların yapıtaşları olan yağ asitleri, hücrel membranların önemli bileşenleri olmalarının yanı sıra büyüme, gelişme ve bitki performansı için de mutlak gerekli olan organik maddelerdir (Heldt and Piechulla 2011; Keha ve Küfrevioğlu 2014; Taiz *et al.* 2015). Lipidler, yağlı tohumlarda trigliserid (triasil gliserol) halinde karbonun temel depo formu olmalarından, epidermiste bulunan kütin ve mumlara; endodermis ve tohum

kabuğunda bulunan süberinden, polen hücre duvarlarının yapısını oluşturmaya kadar çok farklı görev ve fonksiyonlara sahiptirler (Heldt and Piechulla 2011; Taiz *et al.* 2015).

Lipidlerin yapısal fonksiyonlarından en önemlisi yukarıda da izah edildiği gibi membranların yapısına katılmalarıdır. Membranların en önemli lipid bileşenleri gliserolipidler, steroller ve sfingolipidlerdir (Brown and London 1998). Bunların yanı sıra kolestrol, stigmastreol, sitosterol ve kampesterol de membranların yapısına katılan diğer lipid bileşenleridirler. Membranların yapısında bulunan lipidler, doymuş ve doymamış yağ asidi içeriklerine göre zarların akışkanlığını düzenleme görevlerinin yanı sıra, aynı zamanda hücre içi ve daha uzun menzilli sinyal bileşiklerinin öncüllerini oluşturmak gibi görevleri de vardır (Stintzi and Browse 2000).

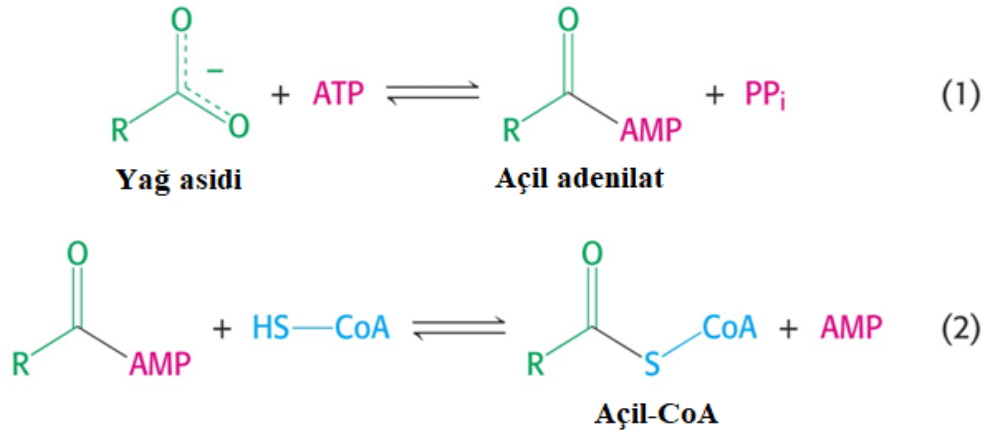
Lipidler, zeytin ve avokado gibi meyvelerde, özellikle de tohumlarda triaçilgliserol formunda depo edilirler (Ohlrogge and Browse 1995). Depo bileşiği olarak triaçilgliserollerin kullanılmasının sebebi, kütle/karbon oranının düşük olmasıdır. Triaçilgliseroller, hücrede oleozomlar veya lipid cisimciklerinde depolanırlar. Bunlar tek tabakalı lipid ile sarılı yağ damlacıklarıdır. Meyvelerde bulunan triaçilgliseroller depo işlevinden ziyade, hayvanları cezbetmek için kullanılırlar. Tohumların endospermelerinde bulunan lipidlerin ise çimlenme sonrasında fidelerin radikula ve plumula kısımlarına doğru taşınması gerekmektedir. Depolanmış olan lipidler bitkilerde bu şekli ile taşınmadığından, daha hareketli bir karbon formuna, genellikle sakkaroz formuna dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu işlem, yağ cisimciğinde depolanan triaçilgliserolün serbest yağ asitlerine hidrolizi ile başlar ve sırasıyla glioksilat ve glukoneogenez yollarıyla sakkarozla dönüşmeleriyle son bulur (Heldt and Piechulla 2011; Keha ve Küfrevioğlu 2014).

Bitkilerde ki yapısal ve fonksiyonel görevlerinden kısaca bahsedilen lipidlerin solunuma girebilmeleri ve enerji metabolizmasına dâhil olabilmeleri için öncelikle sitoplazmada bulunan lipaz enzimi tarafından yapıtaşları olan yağ asitlerine hidroliz edilmeleri gerekmektedir.



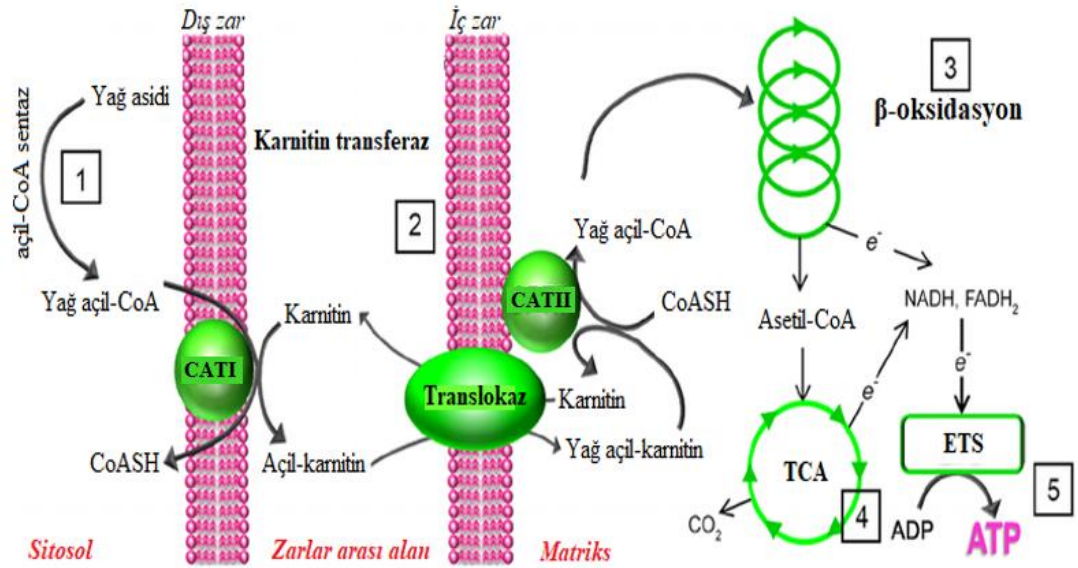
Şekil 1.5. Trigliseridlerin yapıtaşları olan yağ asitlerine hidrolizi

Lipidlerin yağ asitlerine hidrolizinden sonra aktifleştirilmeleri gerekmektedir. Mitokondri membranı üzerinde bulunan açıl-CoA sentetaz enzimi tarafından katalizlenen bu işlem, bir molekül ATP'nin AMP'ye hidrolizlenmesi eşliğinde, yağ asidinin karboksil grubu ile CoA'nın sülfidril grubu arasında tiyoester bağının meydana gelmesiyle oluşur (Kunau *et al.* 1995). İki aşamada meydana gelen bu reaksiyonda, önce yağ asidi bir açıl adenilat oluşturmak için ATP ile reaksiyona girer. Oluşan açıl adenilatta, yağ asidinin karboksil grubu AMP'nin fosforil grubuna bağlanarak bir anhidrid oluşturur. ATP'nin diğer iki fosforil grubu ise pirofosfat olarak ayrılır. İkinci aşamada ise CoA'nın sülfidril grubu enzime bağlı olan açıl adenilat ile reaksiyona girerek açıl-CoA ve AMP'yi oluşturur. Bu reaksiyon ile yağ asitlerinin hücre dışına çıkışı engellenmektedir. Meydana gelen açıl-CoA'ların takip edeceği iki yol bulunmaktadır; ya mitokondriye girerek yıkımları gerçekleştirilir, ya da triaçilgliserol sentezinde kullanılırlar (Coleman *et al.* 2002).



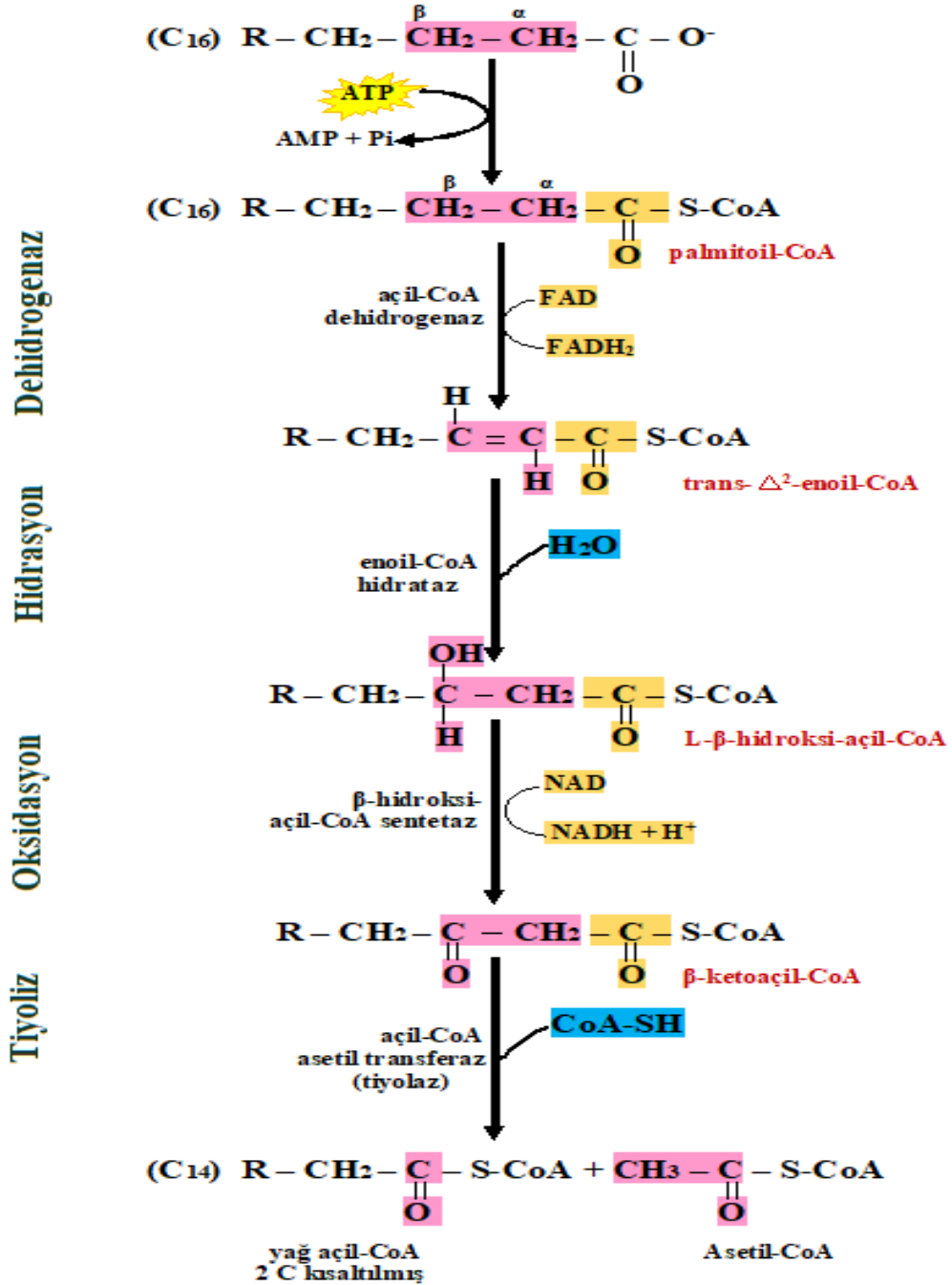
Şekil 1.6. Yağ asitlerinin iki aşamalı aktifleşme reaksiyonları

Aktifleşmiş yağ asitlerinden yıkıma uğrayacak olan kısa ve orta zincirli açıl-CoA'lar mitokondri membranlarından kolayca geçerek matrikse ulaşırken, uzun zincirli açıl-CoA'lar mitokondri iç membranından geçemezler. Bu nedenle zardan geçip matrikse ulaşabilmeleri için karnitin adı verilen polar bir bileşiğe bağlanmak zorundadırlar (Fritz and Yue 1963). Bunun için, mitokondri iç zarının sitosol tarafında lökaleze olan karnitin açıl transferaz I (CATI) tarafından katalizlenen bir reaksiyon meydana gelir (Fritz and Marquis 1965). Bu reaksiyonda açıl-CoA'dan açıl grubu ayrılarak karnitinin hidroksil grubuna bağlanır ve böylelikle açıl-karnitin bileşiği oluşmuş olur. Oluşan açıl karnitin bileşiği, iç mitokondri zarında bulunan bir taşıyıcı protein (karnitin/açıl taşıyıcı transportör-CACT) aracılığı ile mitokondri matriksine aktarılır. Matrikste bulunan karnitin açıl transferaz II (CATII) enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonla açıl grubu bu kez karnitinden ayrılarak matrikste bulunan farklı bir CoA'ya transfer edilir ve yeniden açıl-CoA bileşiği meydana gelir (Kunau *et al.* 1995). Serbest kalan karnitin ise aynı taşıyıcı protein tarafından tekrar dışarıya taşınır. Böylece mitokondri iç zarı üzerinde bulunan taşıyıcı protein vasıtasıyla bir karnitin/açıl-karnitin takası sağlanmış, aynı zamanda matriks ve sitoplazmada bulunan CoA havuzlarının birbirine karışması da önlenmiş olur.



Şekil 1.7. Açıl-CoA'ların mitokondri matriksine taşınması ve krebs reaksiyonlarından solunuma dâhil olması (Dunning *et al.* 2014)

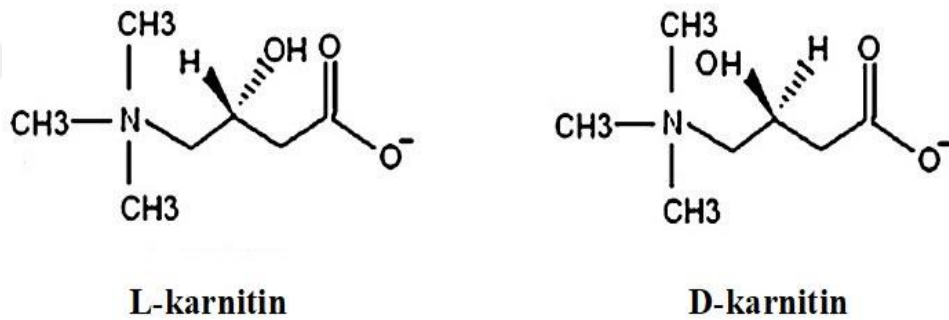
Matrikse geçen açıl-CoA bileşikleri β -oksidasyona maruz kalmak suretiyle 2 karbonlu asetil-CoA'lara kadar yıkılırlar ve böylelikle krebs döngüsünden solunuma dahil olmuş olurlar (Charrier *et al.* 2012; Keha ve Küfrevioğlu 2014). Yağ asitlerinin asetil-CoA'ya oksidasyonu β -oksidasyon olarak adlandırılır. β -oksidasyon süreci, glukoneogenezin devamı niteliğinde olup, hem solunuma substrat olarak asetil-CoA birimlerinin oluşmasını sağlarken, hem de diğer yandan metabolik olarak önemli bileşiklerin üretimi için açıl-CoA'ların modifiye edilmesine aracılık eder. Ayrıca bu süreç sayesinde, membran lipidlerinden ve proteinlerden orjinlenen zararlı serbest yağ asitlerinin temizlenmesi de sağlanır. Yüksek yapılı bitkilerde bu sürecin nerede gerçekleştiği ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış, 1980 yılına kadar bu sürecin yağlı olan bitkilerde glioksizomlarda, yağsız olan bitkilerde ise mitokondride gerçekleştiği kabul görmüştür (Galliard 1980). 1980'lerin başında yağsız dokuların peroksizomları içerisinde β -oksidasyon enzimlerinin bulunduğu rapor edilmiş ve daha sonra yapılan çalışmalarda, β -oksidasyonun, mitokondri ve peroksizomlarda birbirine bağlantılı olan iki kademede meydana geldiği belirtilmiştir (Thomas and Wood 1986; Wood *et al.* 1986; Kindl 1987; Schulz 1991; Masterson and Wood 2000).



Şekil 1.8. Yağların β -oksidasyonu (16 C'lu bir yağ asidi olan palmitoik asitten β -oksidasyon ile 1 Asetil-CoA'nın ayrılması) (Mehta 2011'den revize edilmiştir)

Uzun zincirli yağ asitlerinin matrikse geçmesine ve böylelikle solunuma katılmasına aracılık eden **karnitin (4-N- trimetilamonyum-3-hidroksibutirik asit)**, tüm canlılarda yaygın olarak bulunan ve çok sayıda metabolik işleve sahip olan doğal bir amonyum bileşiğidir (Charrier *et al.* 2012). İlk olarak *Tenebrio molitor* adı verilen bir un kurdu

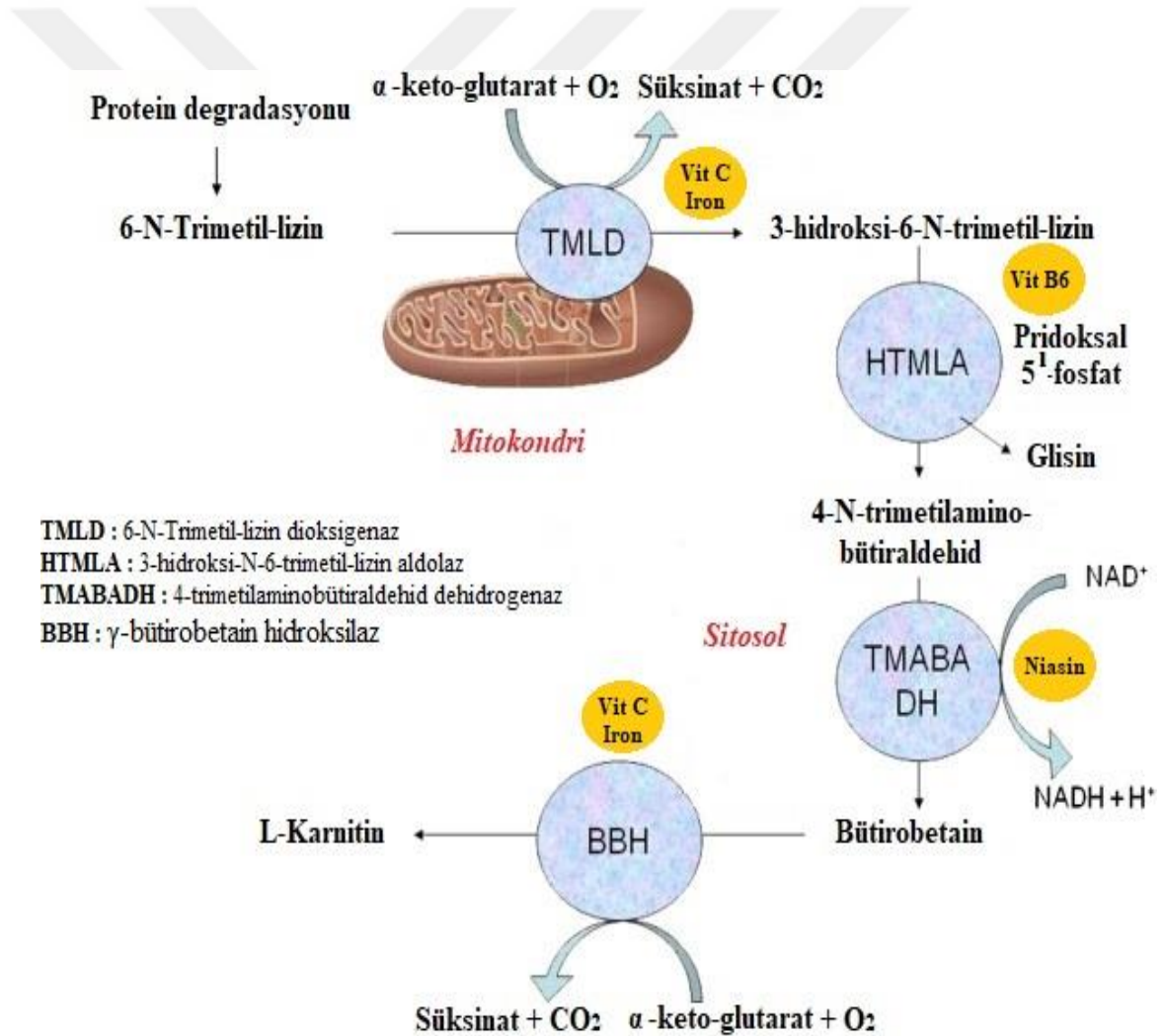
larvasının gelişimi için gerekli besin maddesinin belirlenebilmesi amacıyla gerçekleştirilen bir araştırma sırasında keşfedilen bu madde, metabolizmadaki rolleri nedeniyle vitaminlere benzetildiğinden bulunduğu kurda ithafen B_T vitamini olarak adlandırılmıştır (Fraenkel 1951). Ancak insan vücudunda düşük miktarlarda da olsa üretilbildiği için vitaminler sınıfındaki yeri tartışmalıdır. Düşük molekül ağırlığına sahip olan bu molekül higroskopik ve hidrofilik özelliklere sahiptir. D ve L olarak iki farklı formu bulunan karnitin, sadece L formunun biyolojik olarak aktif olduğu belirlenmiştir (Şekil 1.9). İlk olarak 1905 yılında kas dokusundan izole edilen bu madde üzerine yapılan kapsamlı araştırmalar sayesinde, karnitin metabolizmadaki rolleri ve önemi büyük ölçüde aydınlatılmış olup, temel olarak lipid metabolizmasıyla özdeşleşen bu maddenin enerji metabolizması, stres toleransı ve detoksifikasyon gibi temel biyolojik fonksiyonlara da sahip olduğu ortaya konulmuştur (Gulewitsch and Krimberg 1905; Bourdin *et al.* 2007; Charrier *et al.* 2012).



Şekil 1.9. Karnitinin iki farklı izomeri ve kimyasal yapıları

Lizin ve metiyonin amino asitlerinden sentezlenen bir dördüncül amonyum katyonu olan karnitin biyosentezi, kofaktör olarak askorbik asit, demir, vitamin B6 ve nikotinamide bağlı olarak gerçekleşir (Sakemi *et al.* 1992; Ha *et al.* 1994). Lizin aminoasidi karnitine azot ve karbon atomlarını sağlarken, metiyonin aminoasidi ise metil grubunu sağlar (Rebouche 1992). Karnitin biyosentezi, protein bağlı lizin aminoasidi ile metiyonin aminoasidinin metilasyon işlevi ile başlayan ve 4 farklı enzim tarafından katalizlenen bir süreçtir. İlk olarak protein bağlı lizin ve metiyonin aminoasitlerinin metilasyonu gerçekleşir. Daha sonra lizozomal ve protein degradasyonu ile karnitin öncülü olan 6-N-

trimetillizin (TML) oluşturulur. TML bileşiği ortamda vitamin C ve Fe^{+2} varlığında TML dioksigenaz (TMLD; EC 1.14.11.8) enzimi ile hidroksillenerek 3-hidroksi-6-N-trimetillizin (HTML) oluşturulur. Oluşan bu bileşik ortamda vitamin B6 varlığında HTML aldolaz (HTMLA; EC 4.1.2.X) ile katalizlenir ve 4-N-trimetilaminobütiraldehit (TMABA) ve glisin meydana getirir. TMABA dehidrogenaz (TMABADH; EC 1.2.1.47), TMABA bileşiğini 4-N-trimetilaminobütrata (γ -BB, γ -bütirobetain) katalizler. Son basamakta ise γ -BB ortamdaki vitamin C ve Fe^{+2} varlığında γ -bütirobetaindioksigenaz (BBH; EC 1.14.11.1) aracılığı ile hidroksillenerek son ürün olan L-karnitine dönüştürülür (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Karnitinin biyosentez reaksiyonları (Shekhawat *et al.* 2013'ten revize edilmiştir)

Yukarıda bahsedilen kofaktörlerden herhangi birinin eksikliğinde, karnitin biyosentezinde önemli aksamalar meydana gelmektedir. Ratlarda yapılan bir çalışmada B6 vitamini eksikliğinde, plazma ve dokularda serbest ve asit-çözünür karnitin miktarlarında indirgenmeler gözlenirken, B6 vitamininin takviyesi ile bu maddelerin içeriklerinde belirgin artışların meydana geldiği kaydedilmiştir (Goa and Brogden 1987; Ha *et al.* 1994). Yine yapılan başka bir çalışmada, vitamin C'nin karnitin biyosentezini regüle ettiği bildirilmiştir (Ha *et al.* 1991).

Karnitinle ilgili memelilerde yapılan ilk çalışmalarda, bu bileşiğin yağ asitlerinin taşınımı ile ilgili olduğu ve lipid metabolizmasında aktif bir rol üstlendiği belirlenmiştir (Bremer 1962; Fritz and Marquis 1965). Uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri iç zarından matrikse geçmesinde görev alan karnitin, sitoplazma ve matriks arasındaki açıl-CoA'ların dengesini sağlamanın yanı sıra, β -oksidasyon reaksiyonları ile de temel enerji kaynağı olan ATP'nin sentezlenmesine önemli katkı sağlamaktadır (Gulcin 2006). Karnitinin ayrıca hayvanlarda hormonal aktivitenin düzenlenmesi, CoA'nın içsel dengesinin sağlanması, yetersiz metabolize olmuş açıl CoA'ların salınımı, enerjinin açıl-karnitin formu şeklinde depo edilmesi, amonyum detoksifikasyonu, Alzheimer hastalıklarında hafıza güçlendirici etki göstermesi, serbest radikallerin neden olduğu hasarlara karşı hücreleri koruması, antiaging etkisi gibi çok sayıda fonksiyonlar üstlenebildiği de rapor edilmiştir (Sugiyama *et al.* 1984; Golper and Ahmad 1992; Torreele *et al.* 1993; Vaz and Wanders 2002). Uzun zincirli yağ asitlerinin peroksizomlarda β -oksidasyona uğrayarak kıaldıktan sonra mitokondriye taşınmasında da yine karnitinin etkin olduğu belirlenmiştir (Fraser *et al.* 1999; Antonenkov and Hiltunen 2012; Nguyen *et al.* 2016).

Bitkilerde ise karnitinin varlığı ilk olarak 1951 yılında Fraenkel tarafından belirlenmiş olup, miktar tayini ancak 1969 yılında Panter ve Mudd tarafından yapılabilmektedir (Fraenkel 1951; Panter and Mudd 1969). Sonraki yıllarda LC-ESI-MS/MS ile yapılan çalışmalarda çeşitli bitki dokularında serbest ve açıl-karnitinlerin hem varlığı, hem de miktarları belirlenmiş ve elde edilen değerlerin hayvansal dokulardan ortalama bin kat daha az olduğu tespit edilmiştir (Wood *et al.* 1992). Benzer çalışmalarda; farelerin kalp, karaciğer ve böbreklerindeki serbest karnitin ve açıl-karnitin değerlerinin bitkilere oranla

yüz ila bin kat daha fazla olduğu, oysaki uzun zincirli açıl-CoA miktarlarının ise neredeyse aynı oranlarda bulunduğu rapor edilmiştir (Ellis *et al.* 2000; Fulda *et al.* 2004; van Vlies *et al.* 2005). Bourdin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise *Arabidopsis thaliana*, *Nicotina tobaccum*, *Linum usitatissimum* ve *Brassica napus* bitkilerinde içsel karnitin ve açıl-karnitin içerikleri ile yağ asidi içeriklerine bakılmış, hayvanlarda %30 olan açıl-karnitin içeriğinin bitkilerde %2 civarında olduğu ve hayvanlara kıyasla, bitkilerde lipid metabolizması ile daha az ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Bourdin *et al.* 2007).

Günümüze kadar bitkiler üzerinde karnitin rolleri ile ilgili çok sınırlı sayıda çalışma yapılmış olup, bu çalışmalar neticesinde, karnitin biyosentezinin memelilerdekine benzer olduğu ve benzer taşıyıcılar tarafından taşındığı tespit edilmiştir. Dahası bitki, memeli ve mantarların genomları arasında mukayeseli olarak yapılan araştırmalarda, karnitin biyosentezinden sorumlu olan çeşitli enzimlerin birbirlerine homolojik yapı gösterdiği, yani çok benzer oldukları belirlenmiştir (Rippa *et al.* 2012).

Bitki hücrelerinin mitokondri zarlarında da açıl moleküllerinin taşınmasında karnitin görev yaptığını bildiren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bezelye ve çeşitli baklagillerde yapılan çalışmalarda, hem mitokondri hem de kloroplastlarda karnitin açıl transferaz enzimlerinin varlığı belirlenmiş ve bunların aktiviteleri ölçülebilmektedir (Wood *et al.* 1983; McLaren *et al.* 1985; Thomas and Wood 1986; Burgess and Thomas 1986; Gerbling and Gerhardt 1988; Budde *et al.* 1991; Masterson and Wood 2009). *Arabidopsis thaliana* ile yapılan bir çalışmada serbest karnitin yanı sıra açıl-karnitin miktarına da bakılmış ve karnitin bitki lipid metabolizmasındaki rolü belirlenmiştir (Bourdin *et al.* 2007). Yine *Arabidopsis* mutantları ile yapılan farklı bir çalışmada, açıl-karnitin lipid metabolizmasının anabolik yolu ile ilişkili olduğu, membran ve depo lipidlerinin biyosentezleri sırasında görev yaptıkları rapor edilmiştir (Nguyen *et al.* 2016). Thomas ve arkadaşları, arpa yapraklarına verilen karnitin solunumun substratı olarak iş görmediğini bildirmiş, oysaki bezelye bitkisi ile yapılan farklı bir çalışmada ise substrat olarak asetat kullanıldığında, 1 mM karnitin uygulaması ile solunum değerinin yüksek değerde olması için, oksijen alımının maksimum düzeyde sağlanması gerektiğini rapor

etmişlerdir (Thomas *et al.* 1981; Thomas and Wood 1982). Karnitinin ayrıca etiyole arpa yapraklarında ışık altında klorofil üretimini stimüle ettiği ve bunu karbon veya nitrojen kaynağı olarak değil farklı bir yol ile sağladığı rapor edilmiştir (Thomas *et al.* 1981). Masterson ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise kloroplastlardaki asetil-karnitinin yağ asidi biyosentezinde substrat olarak rol oynadığını gösterilmiştir (Masterson *et al.* 1990).

Bitkilerde yağ asitlerinin sentez, taşınma, düzenlenme ve yıkılmaları arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır. Mayalarda olduğu gibi bitkilerde de uzun zincirli yağ asitlerinin, β -oksidasyon için peroksizomlara ATP-bağlı kaset taşıyıcılar (PXA1) ile taşındığı varsayılmaktadır (Bourdin *et al.* 2007). Öte yandan, peroksizomlar içerisinde uzun zincirli açıl-CoA sentetaz aktivitesinin var olması, PXA1'e paralel alternatif bir taşıma yolunun var olabileceğini de göstermektedir. Plastidlerde *de novo* sentezi yapılan yağ asitlerinin taşınımı ile ilgili açık bir bilgi olmasa da, yağ asitlerinin bilinmeyen bir taşıyıcı ile iç membrandan geçtikten sonra dış membran üzerinde yer alan bir açıl-CoA sentetaz enzimi aracılığı ile aktivasyonunun gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Bourdin *et al.* 2007). Hayvanlarda mitokondriye taşınan yağ asitleri için bu taşıyıcının karnitin mekik sistemi olduğu bildirilmiştir (Kerner and Hoppel 2000).

Son yıllarda bitkilerde ışık tarafından düzenlenen ve postgerminatif büyüme sırasında glioksilat siklusuna alternatif olan bir yolun varlığı belirlenmiş ve "BOU proteini" olarak adlandırılan bir proteinin, bu yolda görev yaptığı rapor edilmiştir (Lawand *et al.* 2002). Yapılan çalışmalarda, bu proteini kodlayan gen sekansının CACT protein ailesine benzerlik gösterdiği ve mitokondriye asetat, yağ asitleri ya da bunların karnitin esterlerinin translokasyonunu gerçekleştirdiği gösterilmiştir. BOU mutantlarıyla yapılan çalışmada depo lipidlerinin parçalanmasına karşın, ışıktaki büyüyen mutantlarda ototrofik gelişimin olmadığı, karanlıkta çimlenme olduğunda ya da ortama şeker ilavesi yapıldığında ise büyümenin devam ettiği gözlenmiştir. Bu durumun, BOU yolunun çimlenmeyi ve lipid degradasyonunu etkilemediği, sadece degradasyon ürünlerinin kullanımını engellediği anlamına geldiği rapor edilmiştir. Gelişim geriliğinin karanlıkta

yatıştırılması ise, bu proteinin sadece ışıktaki gerekli olduğunu, karanlıkta ise glioksilat yolunun yeterli olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Karnitin bitkilerdeki metabolik rolünün dışında, olası elverişsiz koşullara karşı bitki toleransında etkili olduğuna dair araştırma bulguları da mevcuttur. Şöyle ki; sitoplazmanın fonksiyonunu değiştirmeden, hücre içerisinde yüksek miktarlarda birikebilen uyumlu bir bileşik olan karnitin, antioksidan ve ozmoprotektan etki gösterdiği rapor edilmiştir. Charrier ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, tuz ve osmotik stres altında yetiştirilen *Arabidopsis thaliana* sürgünlerine yapılan karnitin (5 μ M ve 5 mM) uygulamalarının tuz stresine toleransta etkili olduğu, ancak bu etkinin, lipid metabolizması üzerine etkisinden ziyade, kendi osmo-regülatör özelliğinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Charrier *et al.* 2012). Ayrıca karnitin tuz stresi altındaki bitkilerde, tonoplast ve plazma zarındaki sodyum iyonu taşıyıcılarının düzenlenmesini sağlayarak sodyumun olası toksik etkilerini azalttığı ve bu etkiyi sodyum iyonlarının hücre içine giriş ve birikimini engellenmesi ve çıkışlarının kolaylaştırılması sayesinde sağladığı ortaya konulmuştur (Tuteja 2007; Pardo 2010). Memelilerde hücre içersine karnitin alınımının Na^+ /karnitin simportırı olan OCTN2 ile gerçekleştirilmesi temelinde yapılan çalışmalarda, bitkilerde de 6 adet organik katyon taşıyıcısı bulunduğu belirlenmiş ve bu taşıyıcılardan AtOCT1 olarak tanımlanan birinin plazma membranında, diğer beş adedinin ise tonoplastta yer aldığı tespit edilmiştir (Tamai *et al.* 2001; Lelandais-Briere *et al.* 2007). Tonoplastta bulunan OCT'lerin, memelilerdeki OCTN2'ye benzer görev yaptığı ve vakuolde Na^+ birikimini engellemek suretiyle soğuk, tuz ve kuraklık gibi stres koşullarına karşı bitki cevabının oluşturulması sırasında, bu proteinlerin ifadelerinde artışlar meydana geldiği rapor edilmiştir (Kufner and Koch 2008).

Diğer bir çalışmada, ABA mutantlarında erken sürgün gelişimi ile çimlenme esnasında tuz stresine tolerans geliştirme karnitin ve ABA arasındaki antagonistik etkileşim ile ilişkili olduğu belirlenerek, bu durumun ise olumsuz su koşulları altında fizyolojik olarak çimlenmenin durdurulmamasından kaynaklanmış olabileceği ileri sürülmüştür (LeonKloosterziel *et al.* 1996; Gonzalez-Guzman *et al.* 2002). *Arabidopsis thaliana* sürgünlerine eksojen karnitin uygulamasının kök uzamasını artırdığı, ancak lateral kök

büyümesini inhibe ettiği kaydedilmiş, bu etkilerin karnitin ile ABA'nın antagonistik etki göstermesinden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Lelandais-Briere *et al.* 2007). Charrier ve arkadaşları tarafından yapılan bir transkriptomik analizde, hücre içerisindeki karnitin birikiminin ABA-duyarlı genleri düzenlemek suretiyle bu yolak üzerinde etki gösterdiği belirlenmiştir. Karnitine ve proline duyarlılık gösteren Abil-1 mutantı üzerinde yapılan çalışmalarda ise stres koşullarına adaptasyonda görev yapan bu ozmolitlerin, ABA ile indüklenmiş büyüme inhibisyonunun hafifletilmesinde rol oynadığı belirlenmiştir (Charrier *et al.* 2012).

Literatürde bitkilerin yanı sıra, stresli koşullara maruz kalan hayvan hücreleri ve bakteriler üzerine de karnitinin etkileri ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Soğuk stresi ve ozmotik strese maruz bırakılan bakterilerde karnitin birikiminin artmasıyla, stres kaynaklı hasarların hafiflediği ifade edilmiştir (Angelidis and Smith 2003; Canovas *et al.* 2007). Farklı bir çalışmada, karnitinin soğuk stresi süresince zar lipidlerinin modifiye olması için gerekli olan yağ asitlerinin hücre içerisine taşınmasında görev aldığı ifade edilmiştir (Angelidis and Smith 2003). Karnitinin memeliler ve mantarlarda da antioksidan özelliğe sahip olduğu, hücre tarafından metabolize edilememiş yağ asitlerinin hücre dışına atılımını sağlayarak detoksifiye edilmesinde görev aldığı, kalp kaslarında lipid esterlerinin birikimi ve malondialdehitin üretimini ve birikimini önleyerek ATP sentezini artırdığı, ROT oluşumunu hızlandıran Fe^{++} ile kompleksler oluşturarak lipid peroksidasyonunu azalttığı, mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrogenaz aktivitesi ile nörotoksisiteye karşı süperoksitdismütaz ve katalaz gibi antioksidan enzim aktiviteleri üzerine de koruyucu etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Rodrigues *et al.* 1988; Arduini 1992; Peluso *et al.* 2000; Arrigoni-Martelli and Caso 2001; Binienda and Ali 2001; Koeck and Kremser 2003; Gomez-Amores *et al.* 2007; Silva-Adaya *et al.* 2008; Franken *et al.* 2008). Ayrıca karnitinin eksojen olarak uygulandığı zaman ikincil bir haberci olan nitrik oksit (NO) üretimini artırdığı da belirlenmiştir (Neill *et al.* 2008). NO artışı, nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin sentezi ile sağlanır. Bu enzimin sentezi için arginin aminoasidi gerekli olup, karnitin tarafından arginaz enziminin yapıtaşlarına ayrılması neticesinde açığa çıkan arginin bu enzimin sentezinde tekrar yapıtaşı olarak kullanılır (Ishii *et al.* 2004; Erbas *et al.* 2007). NO'nun *Arabidopsis*'de ABA bağımlı ve

bağımsız yolaklarda, abiyotik strese karşı toleransla ilgili olan bir sinyal molekül olarak iş görmesi, bitkilerde de karnitin uygulaması ile NO üzerinden strese karşı toleransı artırabileceği fikrini akla getirmektedir.

Yukarıda detaylı olarak verilen bilgi ve bulgular ışığında; mevcut araştırmada, yapraklarına eksojen karnitin uygulaması yapılan mısır fidelerinin ayrı ayrı hem kontrollü hem de soğuk koşullar altında yetiştirilip hasat edilmeleri sonrasında yapılacak testler ile;

- Karnitinin bitkilerde lipid katabolizması üzerine sahip olduğu etkilerin biyokimyasal ve moleküler düzeyde aydınlatılması,
- Lipid katabolizması ile mitokondriyal solunum arasındaki ilişki ortaya konularak, lipidlerin solunuma olası dahlinin total solunum hızı, sitokrom yolu ve alternatif solunum yolları üzerine etkilerinin belirlenmesi,
- Solunum hızında meydana gelecek değişimlere bağlı olarak, krebsle bağlantılı diğer yan yolakların aktivitelerinde nasıl bir değişim meydana geldiği ve bu değişimler neticesinde mısır bitkisinin büyüme hızı ile soğuğa karşı toleranslarının nasıl etkilendiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Lipaz (triaçil gliserol hidrolazlar EC 3.1.1.3.)

Enzim sınıflandırmasında hidrolazlar (EC 3), ester bağlarını parçalayanlar (EC 3.1), karboksilik ester hidrolazları (EC 3.1.1) ve triaçilgliserol lipazlar (EC 3.1.1.3) grubunda yer alan lipazlar (Reetz 2002); bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilen ve triaçilgliserollerin yağ asitleri ve gliserole geri dönüşümlü olarak hidrolizini katalizleyen enzimlerdir (Saxena *et al.* 1999; Beisson *et al.* 2000; Sharma *et al.* 2001).

Serin hidrolazları sınıfı içinde yer alan lipazlar, bu nedenle herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymazlar (Ghanem and Aboul-Enein 2004; Gupta *et al.* 2004; Singh and Banerjee 2007). Katalitik aktivitelerinde serin amino asiti dışında, histidin ve aspartik asit/glutamik asitin görev aldığı da bilinmektedir (Cambillau and Vantilbeurgh 1993; Derewenda 1994). Lipazlar, trigliseritler üzerindeki hidrolitik aktivitelerinin yanı sıra esterifikasyon, interesterifikasyon, açidolizis, alkolizis ve aminolizis gibi reaksiyonları da kataliz etme yeteneğine sahiptirler (Sharma *et al.* 2001; Jaeger and Eggert 2002; Houde *et al.* 2004).

Bitkisel ve hayvansal yağların normal şartlarda tersinir hidrolizlerini katalizleyen lipazlar (Svendsen, 2000), aynı zamanda deterjan, gıda, kağıt, deri, kozmetik ve parfüm endüstrisi, sabun üretimi, organik madde sentezi, sulu ortamda oluşan biyolojik dönüşümler, biyomedikal uygulamalar, biyosensör, rasemik asit ve alkol çözeltileri, bölge seçici açilasyon, pestisit üretimi, ve ester sentezi gibi birçok endüstriyel alanda da kullanılmakta olup, endüstriyel enzim pazarında proteazlar ve karbohidratazlardan sonra 3. sırada gelmektedirler (Adrio and Demain 2014). Yağlı atıkların ve poliüretanın parçalanmasını hızlandırmak için de kullanılan lipazlar (Jaeger and Reetz 1998; Pandey *et al.* 1999; Sharma *et al.* 2001), özellikle son yıllarda moleküler uygulamalarda sıkça kullanılan enzimler arasında da yer almaktadır.

Mevcut araştırmada, lipaz enzimin hem aktivitesi hem de gen ekspresyon seviyesine bakılmak suretiyle; karnitin uygulamasının gerek kontrollü şartlarda büyütölen gerekse soğuk stresine maruz bırakılan mısır bitkilerinde, bu enzim tarafından katalizlenen ve lipid katabolizmasının ilk basamağı olarak ta kabul edilen trigliseridlerin yağ asitlerine hidrolizi reaksiyonu üzerine sebep olduğı etkinin biyokimyasal ve moleküler düzeyde aydınlatılması amaçlandı.

2.2. Karnitin Açıl Transferazlar (CAT)

Sitoplazma ve peroksizomlarda yağ açillerini CoA birimlerinden ayırmak suretiyle karnitine bağlayan, matrikste ise karnitinden ayırarak tekrar CoA'ya aktaran enzimlere “karnitin (açıl) transferazlar” adı verilir. Hücre enerji metabolizmasında önemli role sahip geniş bir enzim ailesi olan bu enzimler, kendi aralarında karnitin palmitoiltransferaz (EC 2.3.1.21), karnitin octanoiltransferaz (EC 2.3.1.137) ve karnitin asetiltransferaz (EC 2.3.1.7) olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Her üç enzim grubu da aynı fonksiyona sahip olmalarına karşın, etki ettikleri yağ asitlerinin zincir uzunlarına göre farklı isimler almışlardır. Karnitin palmitoiltransferaz uzun zincirli yağ asitlerinin, karnitin octanoiltransferaz orta zincirli yağ asitlerinin, karnitin asetiltransferaz ise asetil-CoA birimlerinin transferinde görev almaktadır.

Karnitin asetiltransferaz enzimi hayvan hücrelerinde bütün dokuların mitokondri, peroksizom ve endoplazmik retikulumlarında yer alırken, karnitin octanoiltransferaz enzimi sadece peroksizomlarda bulunur ve buradan mitokondriye orta zincirli yağ asitlerinin transfer edilmesini kolaylaştırır (Ramsay and Zammit 2004; Zammit *et al.* 2009; Nguyen *et al.* 2016). Sadece mitokondrilerde bulunan karnitin palmitoiltransferazların ise iki farklı grubu vardır. Tüm bu farklı enzimler “karnitin açıl transferaz (CAT)” olarak ortak bir isimle de adlandırılmaktadırlar.

Dış zar üzerinde yer alan CAT I, uzun zincirli yağ asitlerinin açıl kısımlarının karnitin molekülünün hidroksil kısmına aktarılmasını sağlayarak uzun zincirli açıl-karnitin esterlerinin oluşmasını katalizler. Oluşan bu esterler, yağ asitleri ve karnitin arasında

CoA'ların çift yönlü değişiminin gerçekleştirilmesi ve oluşan karnitin esterlerinin zar sistemlerinden geçişi için spesifik bir taşıyıcı olan karnitin/açıl karnitin translokazlar (CACT) aracılığı ile mitokondri iç zarından matrikse taşınmasını sağlar. Peroksizomlarda da açıl-karnitinlerin taşınmasını sağlayan benzer CACT'lara rastlanılmaktadır (Fraser and Zammit 1999). Mayaların mitokondriyal membranlarında ise bu işi yapan CRC-1 denilen benzer enzimler bulunmaktadır (Lawand *et al.* 2002; Van Roermund *et al.* 2003).

Matrikse taşınan açıl-karnitin bileşikler, burada yer alan CAT II enzimi katalizörlüğünde farklı bir CoA ile trans-esterifiye edilir. Böylelikle serbest kalan karnitin, sitosolde yeni bir açıl grubunu bağlamak üzere CACT yolu ile mitokondriden ayrılır (Fraser and Zammit 1999). Ancak serbest kalan karnitinler için CACT ile mitokondri dışına taşınmanın dışında, farklı bir alternatif yol daha bulunmaktadır. Karnitin asetiltransferaz enziminin katalizörlüğünde gerçekleşen bu yolda, serbest karnitinler, matrikste yağ asitlerinin β -oksidasyonu ile açığa çıkan asetil-CoA'lar ile reaksiyona girerek asetil-karnitinlerin oluşmasını sağlarlar (Fraser and Zammit 1999). Oluşan asetil-karnitinler çift yönlü olarak cereyan eden CACT yoluyla mitokondriden ayrılırken, hücre içerisindeki asetil havuzlarının konsantrasyonu karnitin ile düzenlenmiş olur.

Mevcut araştırmada CAT I ve II enzimlerinin aktivitelerine bakılmak suretiyle, hem normal koşullar altında yetiştirilen hem de stresli koşullara maruz bırakılan mısır bitkilerinde, karnitin uygulaması neticesinde özellikle uzun zincirli yağ asitlerinin beta-oksidasyon sürecine katılabilmek için mitokondriyal matrikse taşınmalarının uyarılıp uyarılmadığının belirlenmesi ve beraberinde elde edilecek bulguların lipaz enzim aktivitesinden elde edilecek bulgularla birlikte değerlendirilmesi neticesinde, karnitin lipit katabolizması üzerine etkilerinin detaylı bir şekilde ortaya konulması amaçlandı.

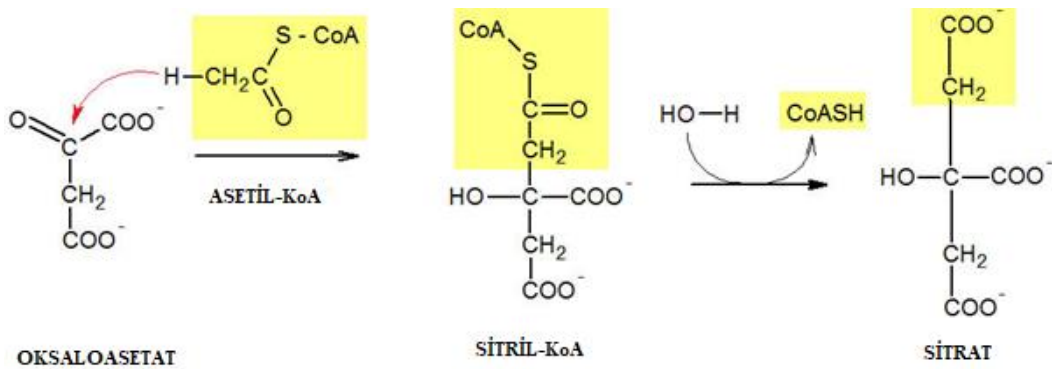
2.3. Sitrat sentaz (CS) (EC 2.3.3.1)

Mitokondriyal matrikste lokalize olmuş ve krebs döngüsünün ilk enzimi olan sitrat sentaz (CS) enzimi, OAA(4C) ile asetil koenzim-A'nın (2C) asetil grubunun kondansasyonunu katalize etmek suretiyle sitrat (6C) oluşumunu katalizler (Correa *et al.* 2007). OAA,

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

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

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



Şekil 2.1. Sitrat sentaz aktivitesi şeması (Proteopedia'dan alınmıştır. Anonymos 2048b)

Mevcut çalışmada CS enziminin hem aktivitesine hem de gen ekspresyon seviyesine bakılmak suretiyle, karnitinin bu enzim üzerine etkisinin biyokimyasal ve moleküler

düzeyde aydınlatılması, bu enzimin aktivitesi temelinde TCA döngüsünün hızında meydana gelen değişimlerin belirlenmesi ve lipaz ile CAT enzimlerinden elde edilen bulguların da birlikte ele alınması suretiyle karnitin-indüklü lipid katabolizması esnasında oluşan yağ asitlerinin mitokondriyal matrikse taşınarak orada beta-oksidasyon reaksiyonuna dahil olması sonucunda oluşan Asetil-CoA birimlerinin TCA devrinden solunuma dahil olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

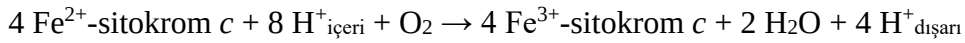
2.4. Sitokrom Oksidaz (COX; EC 1.9.3.1)

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

Siyanid, azid ve karbon monoksit tarafından doğrudan inhibe edilen COX (Alonso *et al.* 2003), hidrojen sülfid ve nitrik oksit bileşikler tarafından hücre solunumunun azaltılması

suretiyle de dolaylı olarak inhibe edilmektedir (Nicholls *et al.* 2013). Bunların dışında, ortamda yüksek oranda ATP molekülünün bulunması halinde, allosterik olarak COX enziminin inhibe edildiği rapor edilmiştir (Arnold and Kadenbach 1997).

COX'un katalize ettiği reaksiyon şu şekilde gerçekleşir;



Mevcut araştırmada, COX enziminin hem aktivitesi, hem gen ekspresyon seviyesi hem de protein ifadesine bakılmak suretiyle, karnitinin bu enzim üzerine etkisinin biyokimyasal ve moleküler düzeyde aydınlatılması, lipid katabolizması ve TCA döngüsünden elde edilen bulgularla birlikte ele alındığında lipidlerin hidroliziyle başlayan süreç ile solunum hızının ilişkilendirilmesi ve gerek kontrollü gerekse soğuk koşulların hücresel solunumun yönü üzerine etkisinin kıyaslamalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2.5. Alternatif Oksidaz (AOX; EC 1.10.3.11)

Alternatif oksidaz (AOX), birçok farklı bitki grubunun mitokondrilerinde bulunan ve elektron taşıma zincirinde alternatif solunum yolu adı verilen yolda görev yapan enzimdir. Matriks tarafından mitokondri iç zarına sıkıca bağlanabilen monotopik bir membran proteini olan AOX, ETS'de sitokrom yoluna alternatif olarak faaliyet gösterir (Berthold and Stenmark 2003). Stres şartlarında membran içeriklerinde meydana gelen değişimler nedeni ile solunumunun sitokrom yolunda aksaklıklar meydana gelebilmekte ve bunun sonucu olarak da ROT oluşumu tetiklenmektedir. Bu gibi durumlarda, elektron zincirindeki elektronların rastgele çevreye saçılmasının engellenmesini ve toksik ROT'ların oluşumunu azaltmak üzere, AOX enzimi ubikinona ulaşan elektronları alıp kısa yoldan oksijene ileterek suyun oluşmasını sağlar (Moller and Kristensen 2004). Bu yolun aktifleşmesiyle, AOX üzerinden geçen her dört elektron için bir su molekülü oluştuğundan, bu olay organel içi ideal oksijen-su dengesinin korunmasına da katkı sağlar (Siedow and Moore 1993; Maxwell *et al.* 1999).

AOX'un elektron taşıma zincirinde üstlendiği fonksiyonlar son derece önemlidir. Çünkü AOX'un görev yaptığı bu alternatif yol sayesinde karbon metabolizması, elektron geçişi ve ATP döngüsü arasında oluşabilen aksaklıklar giderilmiş olur ve böylece karbon iskeleti, ATP ve indirgenmiş güç desteğine ihtiyacı olan diğer metabolik süreçler ve solunum arasındaki entegrasyonun bozulmaksızın sürdürülebilmesine ve solunumun optimize edilmesine önemli bir katkı sağlanmış olur (Finnegan *et al.* 2004; Vanlerberghe *et al.* 2009). Ayrıca, bu alternatif yol, hücrenin belirli bir zaman aralığında ihtiyaç duyduğundan daha fazla NADH ve ATP sentezlenmesi, yani solunumun gereğinden hızlı olması durumunda, NADH'den gelen elektronları su oluşumuna yönlendirerek aşırı ATP üretimini engeller (Mcintosh 1994).

Mevcut araştırmada, AOX enziminin hem aktivitesi, hem gen ekspresyon seviyesi hem de protein ifadesine bakılmak suretiyle, karnitin bu enzim üzerine etkisinin biyokimyasal ve moleküler düzeyde aydınlatılması, soğuk ve/veya karnitin uygulamalarının solunum hızıyla bağlantılı olarak alternatif solunum üzerine etkilerinin ortaya konulması ve karnitin-indüklü lipid katabolizması ile alternatif solunum yolu arasında bir ilişkinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.6. NADH Bağımlı Glutamat Dehidrogenaz (NADH-GDH; EC 1.4.1.2)

Mitokondrial enzimler arasında yer alan glutamat dehidrogenaz (GDH), ökaryotların mitokondrilerinde bulunmasının dışında, birçok mikroskobik canlıda da lokalize olan bir enzimdir. Nitrojen ve glutamat metabolizmasında rol oynayarak enerji homeostazisinin düzenlenmesinde görev alır. Heksamerik bir enzim olan GDH enzimi, glutamatın hem sentez hem de katabolizmasında işlev görmektedir. L-glutamatın oksidatif deaminasyonunu katalizlediği ve 2-oxoglutarat ile serbest NH_4^+ 'ün oluştuğu reaksiyonda, kofaktör olarak NAD^+ kullanılır (Robinson *et al.* 1992; Fox *et al.* 1995; Stewart *et al.* 1995; Glevarec *et al.* 2004; Masclaux-Daubresse *et al.* 2006; Labboun *et al.* 2009). GDH'nin katalizlediği diğer reaksiyonda ise katabolik özelliğinin aksine 2-oxoglutarattan glutamat sentezlenir. Bu yolda kofaktör olarak NADH kullanıldığından, GDH'nın bu aktivitesine NADH bağımlı GDH aktivitesi adı verilir. GDH'nın özellikle

enzimin aktivitesinde meydana gelebilecek bir artış, doğla olarak azot özümlemesinin artmasına katkı sağlayacaktır.

Mevcut araştırmada, GDH enziminin hem aktivitesi hem de gen ekspresyon seviyesine bakılmak suretiyle, karnitin uygulamasının azot asimilasyonunda görevli bu enzim üzerine etkilerinin biyokimyasal ve moleküler düzeyde belirlenmesi ve TCA hızındaki lipid destekli değişimin soğuk ve normal koşullar altında azot asimilasyonu üzerine ne tür bir etkiye sahip olduğunun ortaya konulması amaçlanmıştır.

2.7. Reaktif Oksijen Türleri

Elektronlar, atomların yapısındaki orbital adı verilen uzaysal yörüngelerinde çiftler halinde bulunurlar. Moleküllerin atomları genellikle çift elektronlu olmasına karşın, hücrede bazı molekül yapısındaki atomların bir veya daha fazla atomunun orbitallerinde tek elektron içermeleri söz konusu olabilir. Eksik elektronlu, molekül ağırlığı düşük, kısa ömürlü ve kararsız olan bu moleküller karşılıklı çıkan herhangi bir molekül ile etkileşime girerek, bu molekülden ya bir elektron alır ya da o moleküle bir elektron verirler. Başka moleküllerle kolayca elektron alış-verişine girerek onların yapısını bozan bu moleküllere “serbest radikaller”, “oksidan moleküller” ya da “reaktif oksijen partikülleri” adı verilir.

Reaktif oksijenler iki gruba ayrılırlar;

Radikaller: Tek elektron eksikleri nedeniyle başka moleküller ile kolayca elektron alış-verişine giren oksidanlardır. Örneğin; Süperoksit radikali, hidroksil radikali.

Nonradikaller: Elektron eksikleri olmadığı halde başka moleküllerle radikallerden daha zayıf şekilde birleşebilen oksidanlardır. Örneğin; Hidrojen peroksit (Genişel 2010).

2.7.1. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)

Oksijenin yüksek enerjili formudur. Singlet oksijen, eşleşmiş iki elektronun aynı orbitalde veya farklı orbitallerde zıt spinler halinde bulunması durumunu ifade eder. Eşleşmemiş elektronu bulunmadığı için radikal özelliği yoktur, ancak oksidan özelliği oldukça yüksektir. Singlet oksijen, çok çeşitli yollarla kimyasal veya fotokimyasal olarak üretilebilir. Bitkilerde singlet oksijenin üretildiği, en iyi bilinen yol fotokimyasal olup, fazla miktarda ışık enerjisi absorblayan klorofilden oksijene enerji aktarılmasıyla ilgilidir. Yani asıl kaynağı fotosentez reaksiyonlarında yer alan elektron transport sistemindeki klorofil pigmentleridir (Foyer *et al.* 1997; Güler 2008). Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde, ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları, singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. $^1\text{O}_2$ birçok organik molekülle reaksiyona girdiğinden yüksek oranda yıkıcıdır ve canlı organizmada hasara neden olan başlıca oksijen türlerinden biridir (Cadenas 1989; Durmuş 2003). Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksit radikalini oluşturur ve $\cdot\text{OH}$ kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonu başlatabilir. Hücre zarlarının glikolipid, fosfolipid, sterol ve gliserid yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, aldehitler, hidroksi yağ asitleri ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluştururlar (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003; Erdal 2010).

2.7.2. Süperoksit radikali ($\text{O}_2\cdot^-$)

Süperoksit radikali ($\text{O}_2\cdot^-$) tüm aerobik canlılarda bulunan ve oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda hızlı bir şekilde oluşan ilk anyondur. Süperoksit radikali enzimatik ya da enzimatik olmayan reaksiyonlarla meydana gelebilir. Canlı sistemlerde asıl üretim yeri tilakoid zarlarında bulunan PSI'dir, bunun haricinde mitokondride elektron kaçakları sonucunda da üretilir. Süperoksit anyonunun oluşumu diğer ROT'ların ($\cdot\text{OH}$ ve $^1\text{O}_2$) oluşumunu tetikler (Alscher *et al.* 1997). Bu radikal oldukça reaktiftir ve lipidlerin yanı sıra, diğer biyokimyasal bileşenlerin de oksidasyonuna sebep olur. Bu radikalın lipidperoksidasyonu, membran hasarı, hücrel toksisite ve DNA'daki tek zincir

kırıklarına sebep olduğu belirtilmiştir (Fridovich 1995). Süperoksit radikali kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali hidrojen peroksitle reaksiyona girerek canlı için çok daha toksik bir molekül olan $\cdot\text{OH}$ üretebilir ki bu, Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinir ve demir, bakır gibi metallerin katalizörlüğünde oldukça hızlı gerçekleşir. Süperoksit radikali, yüksek katalitik etkiye sahip olan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile dismutasyona girerek içsel konsantrasyonunda azalma gözlenir (Halliwell 1982; Güler 2008; Erdal 2010).

2.7.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

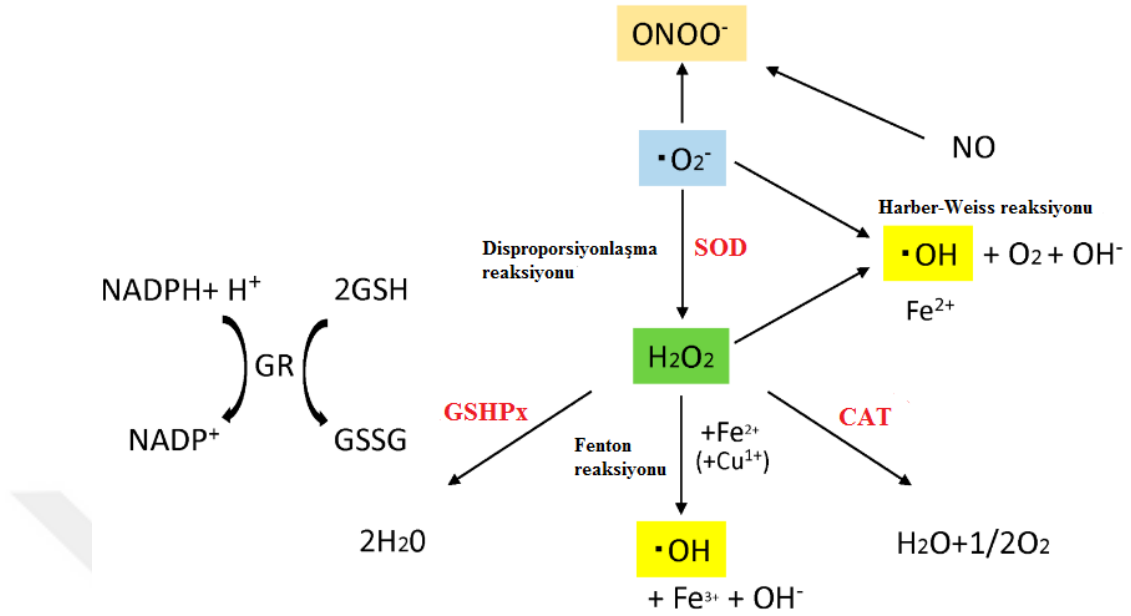
Oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle, ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucunda meydana gelen hidrojen peroksit (H_2O_2), DNA kırılmalarına, protein denatürasyonlarına ve aynı zamanda kloroplast stromasının tioredoksin enzimleri gibi tiol içeren enzimlerin inaktivasyonuna neden olur ve bitki hücreleri için oldukça toksiktir (Hagar *et al.* 1996). Süperoksitin enzimatik olmayan yıkımı, nötral ve hafifçe asidik pH 'da kendiliğinden, enzimatik yıkımı ise SOD enzimi tarafından gerçekleştirilir. Süperoksitin olduğu yerlerde (peroksizomlar, elektron taşıma zinciri, plazma membranı, ekstraselülmatriks) önemli miktarda H_2O_2 'de üretilir (Slesak *et al.* 2007). Ayrıca peroksizomlarda fotosolunum sırasında glikolat, glioksilik aside yükseltgendiğinde de üretilir (Mittler *et al.* 2004). Yüksüz bir moleküldür ve difüzyonla yer değiştirebilir. Zayıf bir asit olmasına karşın güçlü oksidasyon özelliğine sahiptir. Yapısında paylaşılmamış elektron bulunmadığından nonradikal bir bileşiktir. Radikal olmadığı halde, H_2O_2 'nin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında serbest oksijen radikalleri içinde en yüksek derecede toksisiteye sahip olan hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır. H_2O_2 , özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir, çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılması gerekir (Güler 2008).

H₂O₂'nin ortamdan uzaklaştırılmasını CAT, APX ve POD enzimleri sağlar. Bu işlemi, H₂O ve O₂ gibi ürünlere dönüştürerek yerine getirirler. Bitkilerde oksidatif streslere tolerans sağlamada, bu enzimlerin hücresele seviyelerinin düzenlemesi oldukça önemlidir (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003; Erdal 2010).

2.7.4. Hidroksil radikali (•OH)

Serbest radikaller içerisinde en reaktif ve bilinen en potansiyel oksidanttır. Nötral formları hidroksit iyonları olan bu radikaller, kısa ömürlü ve yüksek derecede reaktiftirler. Yarılanma ömürleri çok kısa olan hidroksil radikalleri, iyonlaştırıcı radyasyonun (X ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluştuğu gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilir (Stahl and Sies 2002). Demir ya da bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikali çok hızlı oluşur. Kloroplastlarda bakır ya da demirin varlığında oksijen dönüşüm aktivitesindeki hızlı azalmanın başlıca nedeninin, bakır ya da demir ile katalizlenen Haber-Weiss mekanizmasıyla süperoksit iyonundan hidroksil radikallerinin oluşmasıdır (Yruele *et al.* 1996).

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan •OH, biyolojik açıdan önemli makro moleküllerin tüm çeşitlerinde, özellikle nükleik asitlerde, hasara neden olurlar. Bütün bu tepkimeler •OH'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell 1982). Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. •OH'ın başlıca hedefi yağ asitleri olup, zar lipidlerinin peroksidasyonu ile zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama *et al.* 1998; Erdal 2010).



Şekil 2.3. Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşum mekanizması (Kayama *et al.* 2015)

2.8. Lipid Peroksidasyonu (LPO)

Reaktif oksijen türleri (ROT) lipid, protein, karbohidrat ve nükleik asitler gibi hücrelerin temel bileşenleri üzerinde etkili olurlar. Özellikle çoklu doymamış yağ asitleri ile kolayca reaksiyon vererek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Lipid peroksidasyonu, hücre ve organel zar fosfolipidlerindeki çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olarak, zar lipid yapısını değiştiren, hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır (Thomashow 1999). Canlı sistemler için çok tehlikelidir, çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu (LPO) ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Biyolojik sistemlerde LPO'yu başlatan serbest radikallerin, süperoksit anyonu ile özellikle hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki α -metilen gruplarından bir hidrojen uzaklaştırması ile başlamaktadır. Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidinin radikal özelliği kazanmasına neden olmaktadır. Molekül içi konjuge edilen bağlarının farklı pozisyonlara gelmesi ile değişikliğe uğrayabilen kararsız lipid radikalının, moleküler oksijenle tepkimesi sonucu lipid peroksit radikali meydana gelir (Erdal 2010).

Oluşan lipid radikali kararsız bir bileşiktir. Lipid radikali kararlı duruma gelebilmek için, molekül içi bağlarını tekrar düzenler ve konjuge dien yapısına dönüşür. Reaksiyon moleküler oksijenin lipid radikali ile etkileşmesi ve lipid peroksil radikalinin oluşmasıyla devam eder. Lipid peroksil radikali ise, membran yapısında bulunan diğer çoklu doymamış yağ asidi zincirlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşmasına yol açarken, kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak, lipid hidroperoksite dönüşmüş olur. Lipid hidroperoksitler yakıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak reaktif olan aldehitler, ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda, malondialdehid (MDA) meydana gelir. MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir. Fakat lipid peroksidasyonunun derecesi ile iyi bir korelasyon gösterir. Bu sebeple organizma da oluşan LPO düzeyini ölçmek için, MDA seviyelerinin ölçümü sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. MDA, tiobarbitürik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu çözeltinin absorbans değerlerinden istifade edilerek LPO'nun derecesi saptanmaktadır (Erdal 2010).

2.9. Protein Oksidasyonu

Reaktif oksijen ve nitrojen türleri, direkt ya da indirekt olarak proteinler, lipidler, nükleik asitler ve karbohidratlar gibi biyomoleküllerde önemli hasarlara yol açabilirler. Serbest halde ve proteinlerin yapısında bulunan aminoasitler çeşitli reaktif oksijen, reaktif azot türleri, UV, X, λ ışınları ve metal iyonlarının okside edici etkilerine karşı oldukça hassastırlar (Stadtman and Levine 2003). Oksidatif hasarın major hedeflerinden biri olan proteinlerin ROT'lar ile reaksiyonu sonucu oluşan bu reaksiyon, protein oksidasyonu olarak adlandırılmaktadır. ROT ile proteinin ana yapısının reaksiyonu, aminoasidin α -karbonundan bir H atomunun hidroksil radikaline ($\cdot\text{OH}$) bağlanarak ayrılması ve H_2O oluşturması ile başlar (Stadtman and Levine 2003). H atomunun hidroksil radikaline ($\cdot\text{OH}$) bağlanarak ayrılması sonucunda karbon merkezli bir radikal oluşmuş olur. Karbon merkezli radikal, karbon-karbon çapraz bağlı türevleri üretmek üzere bir başka karbon

merkezli radikal ile reaksiyona girebilir. ROT'ların proteinler ile doğrudan reaksiyonu, yüksek reaktif karbonil gruplarına sahip peptid fragmentlerine (aldehid ve ketonlar) ya da protein türevlerinin oluşumuna neden olabilir (Stadtman and Levine 2003). Proteinlerin reaktif karbonil grupları, indirgen şeker ya da onların oksidasyon ürünleri ile proteinlerin lizin rezidülerinin birincil amino gruplarının ikincil reaksiyonları sonucunda oluşabilirler (Lee and Cerami 1990; Grandhee and Monnier 1991; Lal *et al.* 1995; Verzijl *et al.* 2000) ya da çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu boyunca oluşan doymamış aldehitler ile lizin, sistein ve histidin rezidülerinin Michael ekleme reaksiyonları ile de üretilirler (Uchida and Stadtman 1993; Friguet *et al.* 1994; Nadkarni and Sayre 1995).

Proteinlerin oksidasyonu sonucu, aromatik grupların ve alifatik aminoasit yan zincirlerinin hidroksilasyonu, aromatik amino asit yapısının ve sülfidril gruplarının nitrolanması, metiyoninin sülfoksitlemesi, aromatik ve primer amin gruplarının klorlanması ve bazı amino asit yapılarının karbonil türevlerine dönüşümü gerçekleşmektedir (Stadtman and Levine 2003). Oksidasyon aynı zamanda çapraz bağlı proteinlerin oluşumu ve polipeptit zincirinin kırılmasına da neden olarak, en önemlisi alkoksil radikalleri olan, bazı radikallerin oluşumunu sağlamaktadır. Aminoasit yan zincirlerinin hidroksil veya karbonil türevlerine modifikasyonu ve polipeptid zincirlerinin fragmentasyonu, proteinlerin oksidatif reaksiyonlarının muhtemel sonuçlarıdır. Bunlar arasında protein karbonil grubu içeriği oksidatif protein hasarının genel bir indikatördür ve protein oksidasyonunun en yaygın kullanılan belirtecidir (Lenz *et al.* 1989; Levine *et al.* 1990).

Stres şartları altında ROT oluşumu ve buna bağlı olarak LPO ve protein oksidasyonu seviyesinin arttığı bilinen bir durumdur. Karnitin uygulamasının stresli ve stressiz her iki koşuldada bitkide oksidatif stres üzerine nasıl bir etki göstereceği belirlenmeye çalışılmıştır. Bu reaktif türlerin oluşumu veya aşırı üretimi engellenmeye çalışılarak başta membran hasarı olmak üzere, fotosentez ve solunum ETS'si gibi hayati öneme sahip mekanizmaların sekteye uğramasının karnitin uygulaması ile ne kadar hafifletilebildiği araştırılmıştır.

Çalışmamızda stres şartlarında artış gösteren reaktif oksijen türü olan süperoksit anyon ve hidrojen peroksit içeriğine, lipid peroksidasyon seviyesini gösteren MDA içeriğine ve protein oksidasyon seviyesini gösteren reaktif karbonil içeriklerine bakılarak hem stresli hem de stressiz şartlar altında karnitin uygulamasının bu içeriklerin artışını ve oluşumunu indirmesi amaçlanmıştır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Soğutucu (+4°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-20°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-86°C)	: Nuaire, Glacier NU-9483 17.1, USA
Elektroforez	: Biorad elektroforez sistemleri
Hassas terazi	: Shimadzu AT220
Çoklu plaka okuyucu	: Thermo, Multi Scan Go/Epoch Biotek
Karıştırıcı	: Fisons Whirlimixer
Manyetik karıştırıcı	: Heidolph
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Oksijen tüketim cihazı	: Vernier Labpro
Otomatik pipetler	: Eppendorf, Axigen
PCR	: Qiagen-Rotor Gene
RNA izolasyon robotu	: Qiagen, Qiacube
RNA yoğunluk ölçüm cihazı	: Qiagen, QIAexpert
Otomatik pipetleme robotu	: Qiagen, QIAgility
pH metre	: Mettler Toledo
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat CC1
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Micro 22 R
Spektrofotometre	: Shimadzu UVmini-1240
Western blot cihazı	: Bio-Rad Trans Blot Turbo
Western blot görüntüleme cihazı	: Bio-Rad ChemiDoc™ Imaging System
LC-MSMS	: Agilent 6460
GC-FID	: Shimadzu QP2010 Plus

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

Çalışmada kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Fluka şirketlerinden temin edilmiştir.

1. Arnon ve Hogland besi çözeltisi: 1,02 g KNO_3 , 0,492 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,23 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,49 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,86 g H_3BO_3 , 1,81 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,08 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,22 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6 mg FeSO_4 , 0,6 mg tartarik asit saf su içerisinde çözünerek hacmi 1 litreye tamamlanarak hazırlanmıştır.
2. 25 μM Karnitin çözeltisi: 100 ml, 1 mM stok karnitin çözeltisi hazırlanır. 0,0198 g L-karnitin tartılıp bir miktar saf su içerisinde çözünür ve son hacmi 100 ml'ye tamamlanır. 140 ml (iki uygulama grubuna kullanılan toplam miktar) 25 μM karnitin çözeltisi için bir miktar saf su içerisine 3,5 ml 1 mM çözeltiden ilave edilir ve üzeri 140 ml'ye saf su ile tamamlanır.
3. BCA reaktifi (Protein tayini için): 15 ml Bicinchoninic asit 0,3 ml FeCl_3 ile karıştırılarak hazırlanmıştır.
4. %0,1'lik TCA-trikloroasetik asit (Lipid peroksidasyon ve H_2O_2 içeriği için homojenizasyon çözeltisi): 0,1 g TCA bir miktar saf su içerisinde çözüldükten sonra saf su ile hacmi 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
5. %0,5'lik TBA-tiyobarbütirik asit (Lipid peroksidasyon için reaksiyon çözeltisi): Bir miktar saf su içerisinde 20 g TCA çözüldükten sonra %0,5 TBA ilave edilerek iyice çözünmesi sağlanmış ve son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
6. 10 mM KH_2PO_4 (pH: 7) (H_2O_2 içeriği için): 0,0136 g KH_2PO_4 tartılıp bir miktar saf suda çözülmüş ve pH'sı ayarlandıktan sonra saf su ile 10 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
7. 1 M KI (H_2O_2 içeriği için): Bir miktar saf su içerisinde 1,66 g KI ilave edilmiş ve çözüldükten sonra hacmi 10 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
8. 60 mM KH_2PO_4 (Süperoksit içeriği için homojenizasyon çözeltisi): 0,081 g KH_2PO_4 bir miktar suda çözüldükten sonra pH'sı 7.8'e ayarlanmış ve son hacim 10 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

9. 10 mM hidroksilamin (Süperoksit içeriği için): 0,0069 g hidroksilamin bir miktar saf suda çözünmüş ve son hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
10. 17 mM sülfamid (Süperoksit içeriği için): 0,029 g sülfamid bir miktar saf suda çözünmüş ve son hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
11. 7 mM naftilamin (Süperoksit içeriği için): 0,01 g naftilamin bir miktar saf suda çözünmüş ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
12. Ekstraksiyon tamponu 10 mM NaH_2PO_4 (pH: 7.4) ve 0,14 M NaCl (Protein oksidasyonu için): 0,0599 g NaH_2PO_4 tartılmış ve bir miktar saf suda çözülerek pH: 7.4'e ayarlanmıştır. İçerisine tartılmış olan 0,4090 g NaCl ilave edilip son hacim 50 ml'ye tamamlanmıştır.
13. %10 TCA, %20 TCA, 2N HCl, 10mM 2,4 dinitrofenilhidrazin, 6M guanidin hidroklorid (Protein oksidasyonu için) : 5 g TCA tartılıp bir miktar saf suda çözünmüş ve hacmi 50 ml'ye tamamlanmıştır. 10 g TCA tartılmış bir miktar saf su içerisinde çözünmüş ve son hacmi 50 ml' tamamlanmıştır. 13,22 ml HCl bir miktar saf su içerisine ilave edilmiş ve üzeri 100 ml saf su tamamlanmıştır. 0,0792 g 2,4 dinitrofenilhidrazin tartılmış ve 2N HCl içerisinde çözünmüş ve hacmi yine aynı çözelti ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. 11,46 g guanidin hidroklorid tartılmış ve bir miktar 2 N HCl içerisinde çözünmüş ve hacmi aynı çözelti ile 10 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
14. Lipaz aktivitesi ekstraksiyon tamponu için, %2 CHAPS(w/w), 50 mM L-histidin (pH: 5.5): 1 g CHAPS tartılmış ve bir miktar saf suda çözölmüştür, içerisine 0,3879 g tartılan L-histidin ilave edilerek pH: 5.5'e ayarlanmıştır. Saf su ile son hacmi 49 ml'ye tamamlanmıştır.
15. Solüsyon A (Lipaz aktivitesi için): 50 mM L-histidin (pH: 5.5) 0,0775 g tartılmış ve bir miktar saf suda çözölmüştür. pH: 5.5'e ayarlandıktan sonra saf su ile hacmi 20 ml'ye tamamlanmıştır.
16. Solüsyon B (Lipaz aktivitesi için) : n-heptan içerisinde 0,15 M 4-nitrofenil bütrat (1 ml içerisine 27 μl eklenerek) hazırlanmıştır.
17. Glutamat dehidrogenaz aktivitesi homojenizasyon tamponu için; 1,21 g trizma tartılır ve 90 ml saf suda çözünür pH 8.0'e ayarlanmıştır. İçerisine 0,0028 g MgCl_2 , 0,029g EDTA, 7 μl β -merkaptotanol, 0,015 g DTT ve 0,017 g PMSF ilave edilip çözünür ve son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

- 18.** Reaksiyon karışımı (GDH aktivitesi için); 0,46 g trizma tartılır ve 40 ml saf suda çözünür pH 8.1'e ayarlanmıştır. İçerisine 0,14 g α -katoglutarat, 0,99 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,007 g NADH ve 0,0047 g MgCl_2 ilave edilip çözüldükten sonra son hacmi 50 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 19.** 0,4 M mannitol, 50 mM MOPS, 2mM EGTA, 4 mM L-sistein, %0,6 PVP, 20 mM β -merkaptoetanol, %0,5 BSA (Mitokondri izolasyonu için homojenat tamponu): 3,64 g mannitol, 0,5225 g MOPS 40 ml saf suda çözünmüş, pH: 7.2'ye ayarlandıktan sonra 0,0388 g EGTA, 0,0242 g L- sistein, 0,3 g PVP, 0,25 g BSA ve 70 μl β -merkaptoetanol, aynı çözeltide çözüldükten sonra son hacmi 50 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 20.** 0,3 M mannitol, 20 mM MOPS, 1 mM EGTA, %0,1 BSA (Mitokondri yıkama tamponu): 2,73 g mannitol, 0,209 g MOPS 40 ml saf suda çözünmüştür. pH: 7.2'ye ayarlandıktan sonra 0,0194 g EGTA ve 0,05 g BSA aynı çözeltide çözünmüş ve son hacim 50 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 21.** 400 mM Tris-HCl (pH: 7.6), 4 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 6 mM DTNB, 10 μM asetil koenzim-A, 1 mM L-karnitin (Karnitin açıl transferaz I aktivitesi için) : 0,6304 g tris tartılıp az miktar saf su da çözünüp pH:7.6'ya ayarlanmıştır. Sırası ile 1,3609 g KH_2PO_4 , 0,0039 g MgCl_2 , 0,0029 g EDTA, 0,0237 g DTNB, 0,00008 g asetil-koenzim-A ve 0,0019 g L-karnitin tartılmış ve ilk hazırlanan çözelti içerisine sırayla ilave edilerek 10 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır.
- 22.** DTNB, L-karnitin ve asetil-koenzim-A çıkarılarak bu maddelerin yerine substrat olarak 10 μM palmito-karnitin ve 1 mM CoASH (koenzim-A) kullanılmıştır (Karnitin açıl transferaz II aktivitesi için): 0,00004 g palmitokarnitin ve 0,0078 g CoASH tartılmış ve çözeltiye ilave edilerek hazırlanmıştır.
- 23.** Monomer (akrilamid/bisakrilamid) çözeltisi (%30 akrilamid, %2,7 bisakrilamid): 29,2 g akrilamid 75 ml saf suda çözüldükten sonra üzerine 0,8 g bisakrilamid eklenerek çözünmüştür. Çözeltinin son hacmi 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 24.** Ayırma jeli tamponu (1,5 M tris, pH: 8.8): 18,15g tris 50 ml saf suda çözülmüştür. HCl ile pH'sı 8.8'e ayarlandıktan sonra saf su ile son hacmi 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 25.** Yükleme jeli tamponu (0,5 M tris, pH: 6.8): 3 g tris 40 ml saf suda çözülmüştür. HCl ile pH'sı 6.8'e ayarlanıp saf su ile son hacmi 50 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 26.** %10 SDS: 1 g SDS son hacim 10 ml olacak şekilde saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

- 27.** %10 Amonyum persülfat (polimerizasyon başlatıcı): 0,05 g amonyum persülfat son hacim 500 µl olacak şekilde saf suda çözülerek hazırlanmıştır.
- 28.** Örnek uygulama tamponu (0,125 M tris, %4 SDS, %20 gliserol, %10 2-merkaptotanol, %0,2 bromfenol mavisi pH: 6.8): 2,5 ml yükleme jeli tamponu, 4 ml %10 SDS, 2 ml gliserol, 1 ml 2-merkaptotanol alınıp son hacim 10 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanmış ve pH: 6.8'e ayarlanmıştır. Karışıma 0,02 g bromfenol mavisi katılarak karıştırılmıştır. Kullanılacak hacimlere bölünüp -20°C'de saklanmıştır.
- 29.** Tank tamponu (0,025 M tris, 0,192 M glisin, %0,1 SDS, pH: 6.8) : 3 g tris, 14,4 g glisin, 1 g SDS alınıp 900 ml saf suda çözülerek pH: 6.8'e ayarlanmıştır. Son hacmi 1000 ml olacak şekilde saf su ile eklenerek hazırlanmıştır.
- 30.** Transfer tamponu (Western blot için): 0,725 g glisin, 1,45 g tris ve 0,075 g SDS tartılarak 200 ml saf suda çözünmüş, pH: 8.3'e ayarlanmış ve üzeri 250 ml saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 31.** TBST tamponu: 8 g NaCl, 0,2 g KCl ve 3 g tris tartılarak 900 ml saf su içerisinde çözünmüştür. PH: 7.4 olacak şekilde ayarlandıktan sonra üzeri 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti üzerine 1 ml Tween-20 eklenerek iyice çözülmüştür.
- 32.** 1 mM KCN (AOX ve COX aktivitesi için): 0,0065 gram tartılmış ve bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 33.** 1 mM SHAM (AOX ve COX aktivitesi için): 0,0138 gram tartılmış ve bir miktar saf su içerisinde çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 34.** 200 µM ATP, 500 µM ADP, 10 mM süksinat (AOX ve COX aktivitesi için) : Sırası ile 0,0010 g ATP, 0,00213 g ADP ve 0,0162 g süksinat tartılmıştır. Hepsi bir miktar saf su içerisinde çözüldükten sonra hepsinin son hacimleri 10 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 35.** LC-MSMS analizi için: 10 mg olan standart çözeltiler (Propionyl-L-Carnitine, Hexanoyl-L-Carnitine Decanoyl-L-Carnitine, Lauroyl-L-Carnitine, Myristoyl-L-Carnitine ve Stearoyl-L-Carnitine) 1, 2.5, 5, 10 ve 25 ppb olacak şekilde hazırlanmıştır.
- 36.** LC-MSMS ekstraksiyon çözeltisi(%1 formik asit) : 1 ml formik asit ve 99 ml metanol karıştırılarak hazırlanmıştır.
- 37.** LC-MSMS analizinde kullanılan mobil faz A (5 mM Amonyum format, %0,1 formik asit) : 999 ml ultra saf su içerisine 1 ml formik asit çözeltisi ilave edilmiş ve üzerine 0,385 g amonyum format tartılıp ilave edilerek hazırlanmıştır.

38. LC-MSMS analizinde kullanılan mobil faz B (%1 formik asit) : 990 ml asetonitril içerisine 10 ml formik asit ilave edilerek hazırlanmıştır.

39. RNA izolasyonu için: Rneasy plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılmıştır. Real-time pcr aşamasında kullanılan genler ve housekeeping gen (18S rRNA ve β actin) için spesifik primerler ve Taqman propları Qiagen firmasında dizayn ettirilmiştir.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi

Yapılan tez çalışmasında soğuk stresine hassas olan mısır (*Zea mays* cv. Hido) bitkisi kullanılmıştır. Tohumlar May Tohumculuktan temin edilmiştir. Tohumlar ekilmeden önce %96'lık alkol ile kısa süreli hızlıca yıkanmış ve %5'lik sodyum hipoklorit içerisinde 5 dk. yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra tohumlar musluk suyu ile iyice yıkanmış en son olarak da 5 kez saf su ile yıkanarak, oda şartlarında saf su içerisinde yaklaşık 6 saat şişmeye bırakılmıştır. Tohumlar alt tabakasında iki kat filtre kağıdı içeren kaplara ekilmiş yine üzeri filtre kağıdı ile kapatılmıştır. Filtre kağıtlarının üzerinden yeterli gelecek ve hepsinde eşit olacak şekilde saf su ilavesi yapılmıştır. Kapların üzerlerine streç film kaplanmış ve hava alabilmesi için delikler açılmıştır. Yaklaşık 3 gün süre ile çimlenmeleri için 25°C'ye ayarlı olan çimlenme kabinine yerleştirilmiştir. Çimlenen mısır tohumları hidroponik ortama (1/2 Hoagland besiyeri) aktararak iklim odasında kontrol şartlarında (25/20°C sıcaklık 14/10 saat ışık-karanlık periyodunda 20.000 lüks, %70 nem) büyütülmüştür. Her üç günde bir besin solüsyonu değiştirilmiştir. Dokuzuncu gün bitkiler "Kontrol (Kontrol), Soğuk (S), Soğuk+25 μ M Karnitin (S+K) ve 25 μ M Karnitin (Karnitin)" olarak 4 gruba ayrılmıştır. Kontrol ve soğuk grubuna saf su diğer uygulama gruplarına ise 25 μ M karnitin olarak hazırlanan çözeltiden foliar olarak uygulama yapılmıştır (bir saksıda toplam 35 adet bitki bulunur ve bir saksıya 70 ml uygulama yapılmıştır). Uygulamadan 6 saat sonra besin çözeltileri değiştirilmiştir. Kontrol grubu ve 25 μ M Karnitin uygulanan grup iklimlendirme odasında 25/20°C'de,

Soğuk grubu ve Soğuk+25 μ M Karnitin ise 9/5°C olarak ayarlanmış iklimlendirme odasına yerleştirilerek hasat edilecekleri 12. güne kadar büyütölmeye devam edilmiştir.

Bitkiler uygulamadan 72 saat sonra hasat edilerek moleküler ve biyokimyasal parametrelerindeki değışimler belirlenmeye çalışılmıştır.

3.3.2. Kök ve yaprak uzunluklarının belirlenmesi

Hasat edilen mısır bitkilerinin kök ve yaprak kısımları bir cetvel yardımı ile ölçölerek sonuçlar cm cinsinden verilmiştir.

3.3.3. Kuru madde içeriğinin belirlenmesi

Hasat edilen mısır bitkisinin her grubundan 3 adet bitki örneğı alınarak 70°C'ye ayarlı etüve yerleştirilmiştir. 72 saatlik sürenin sonunda ağırlıkları sabitleştğinde örnekler bir bitki olacak şekilde tartılıp kuru madde içeriğı belirlenmiştir (Jumrani and Bhatia 2018).

3.3.4. Yaprak yüzey alanının belirlenmesi

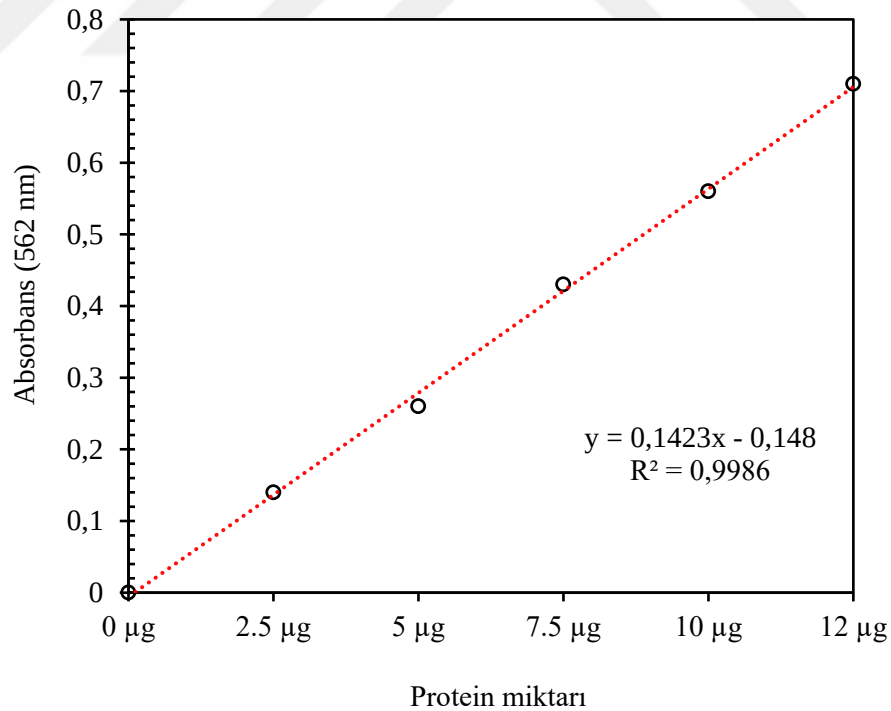
Hasat edilen mısır bitkisinin her grubundan homojen olması açısından aynı noktalardan 1 cm olan yaprak örnekleri alınarak fotoğraflandırılmıştır. Yaprak yüzey alanı Excel 7.0 Paket programında yüzey alanı değeri hesaplanarak yüzdeye çevrilmiştir (Serdar and Demirsoy 2006).

3.3.5. Çözünabilir protein miktarının tayini

Mısır bitkisinin yapraklarından yapılan mitokondri izolasyonu için hazırlanan örneklerden Smith ve arkadaşlarının yaptığı metoda göre protein tayini spektrofotometrik yolla tayin edilmiştir (Smith *et al.* 1985). Sonuçlar “mg protein/g taze doku” cinsinden hesap edilmiştir. Metot için gerekli standart grafik şu şekilde hazırlanmıştır; 1 ml'sinde 1

mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden 0, 2.5, 5, 7.5, 10 ve 12 µg protein içeren hacimler mikrolakadaki kuyucuklara aktarılıp, saf su ile bütün kuyucukların hacimleri 12 µl 'ye tamamlanmıştır. Bu kuyucuklara 0,2'şer ml de BCA (Bicinchoninic asit+ FeCl₃) reaktifi ilave edilip karıştırılmıştır. Kör numune olarak 0,2 ml BCA reaktifi kullanmıştır. Plaka 65°C'de 15 dk. bekletilmiştir. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda, 562 nm'deki absorbans değerlerine karşılık gelen protein değerlerinden yararlanarak standart grafik elde edilmiştir.

Standart grafik hazırlama çalışmasında olduğu gibi, mitokondri izolasyonundan elde edilen özütlerden 15 µl alınıp, 0,2 ml BCA reaktifiyle karıştırılmış, 65°C'de 15 dk. bekletildikten sonra 562 nm'de absorbansları ölçülmüş ve standart grafikten yararlanılıp, 15 µl özütteki protein miktarları belirlenmiştir. Daha sonra, gerekli hesaplamalar yapılarak protein miktarları "mg protein/g taze doku" olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.1. Protein tayininde kullanılan standart grafik

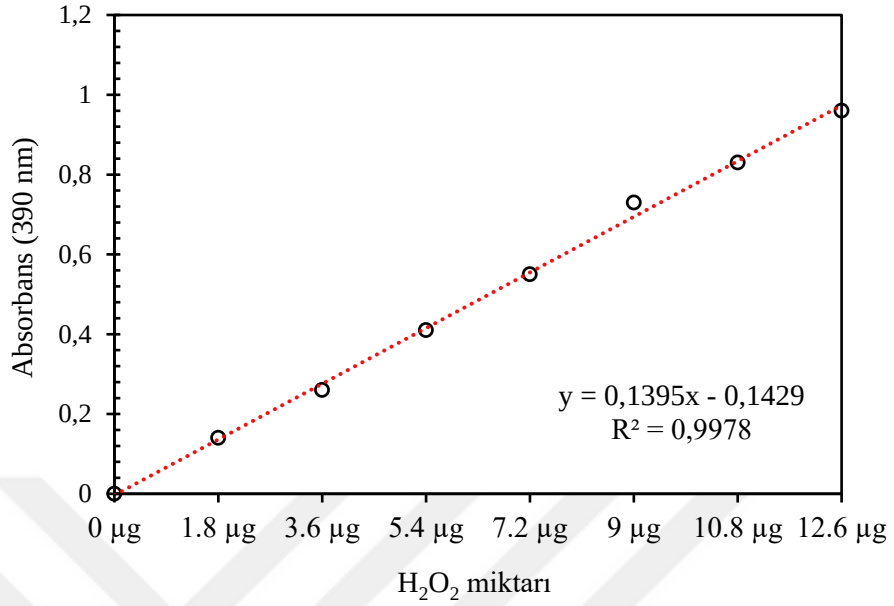
3.3.6. Lipid peroksidasyon (LPO) seviyesinin belirlenmesi

Taze yaprak örneklerinden 0,5 g alınarak 4 ml %0,1'lik TCA (trikloroasetik asit) içinde homojenize edildikten sonra homojenat 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmından 1 ml alınarak üzerine 1 ml %0,5'lik TBA (tiyobarbitürik asit) çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı kaynar suda 40 dakika inkübe edilmiş ve reaksiyon tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durdurulmuştur. Örnekler 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı alınarak 532 nm'deki absorbans değeri ve 600 nm deki non-spesifik absorpsiyon için absorbans değeri okunmuştur (Velikova *et al.* 2000). 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm'de belirlenen değeri çıkarılmış ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/ μ l): $[(A_{532}-A_{600})/155000] \times 10^6$ formülüyle hesaplanmıştır. Sonuçlar MDA (ng.g⁻¹ taze doku) şeklinde verilmiştir (Jaleel *et al.* 2008).

3.3.7. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi

Taze yaprak örneklerinden 0,5 g alınarak 5 ml soğuk %0,1 TCA içinde homojenize edildikten sonra homojenat 12.000xg'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen süpernatantın 0,5 ml'sinin üzerine 0,5 ml 10 mM KH₂PO₄ (pH: 7.0) tamponundan ve 1 ml de KI çözeltisinden eklenmiştir. Absorbans değerleri 390 nm'de ölçülüp kaydedilmiştir. Sonuçlar standart grafikte oranlanarak g doku başına düşen H₂O₂ miktarı (μ g.g⁻¹ taze doku) olarak hesaplanmıştır (Velikova *et al.* 2000).

Standart grafiği hazırlamak için, H₂O₂ çözeltisinden ependorf tüplerine sırasıyla; 0, 1.8, 3.6, 5.4, 7.2, 9, 10.8 ve 12.6 mikrogram H₂O₂ olacak şekilde hesaplanarak konulmuştur. Tüpün hacmi 1 ml olacak şekilde 10 mM KH₂PO₄ (pH: 7.0) tamponu ile tamamlanmıştır. Daha sonra her tüpe 1ml KI ilave edilmiştir. Absorbans değerleri 390 nm'de köre karşı okunmuştur. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram H₂O₂ değerleri kullanılarak standart grafik elde edilmiştir.

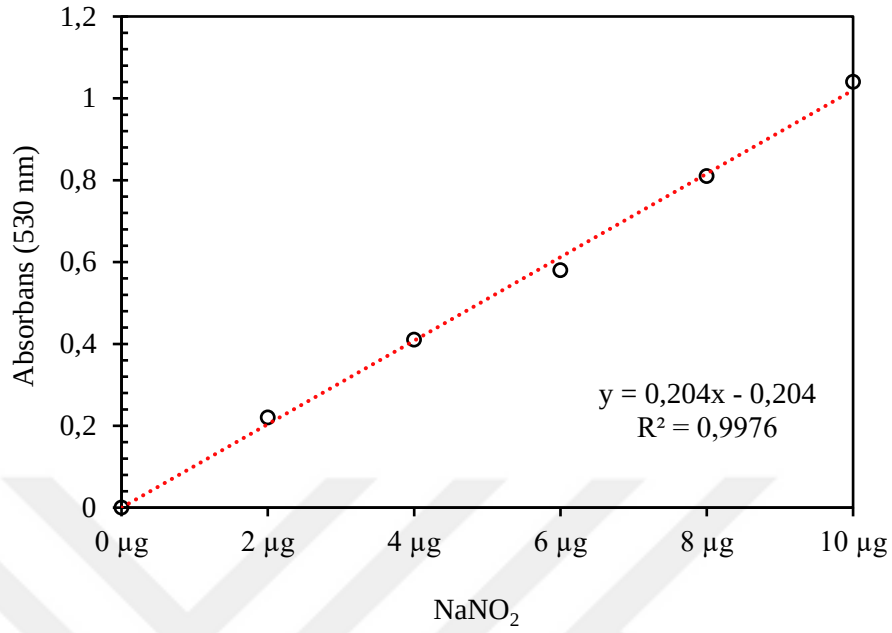


Şekil 3.2. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.8. Süperoksit anyon (O₂^{•-}) üretiminin belirlenmesi

Bitki yapraklarından 0,5 g alınarak 2,5 ml 60 mM potasyum fosfat tamponunda (pH: 7.8) homojenize edilmiştir. Homojenat 12 dakika 12.500 rpm’de santrifüj edildikten sonra süpernatanttan 0,5 ml alınarak üzerine 0,5 ml 60 mM potasyum fosfat (pH: 7.8) tamponundan eklenmiştir. Daha sonra karışıma 0,1 ml 10 mM hidroksilamin hidroklorid eklenerek karıştırılmıştır. Karışım 1 saat 25°C’de inkübe edildikten sonra üzerine 1 ml 17 mM sülfonamid ve 1 ml 7 mM α-naftilamin eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 530 nm’de spesifik absorbans değerleri belirlenmiştir.

Süperoksit anyonu içeriğini hesaplamak için sodyum nitrit (0, 2, 4, 6, 8 ve 10 µg NaNO₂) kullanılarak standart grafik hazırlanmıştır. Sonuçlar µg.g⁻¹ taze doku olarak belirlenmiştir (Eltner and Heupel 1976).



Şekil 3.3. Süperoksit anyon ($O_2^{\bullet-}$) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.9. Protein oksidasyon seviyesinin belirlenmesi

Protein oksidasyonu seviyesi protein karbonil grupları belirlenerek yapılmıştır. Bu metoda göre 0,1 g bitki dokusu alınarak 1 ml (10 mM sodyum fosfat (pH: 7.4) ve 0.14 M NaCl içeren) ekstraksiyon tamponunda homojenize edilmiştir. Homojenat 10.000xg'de sentrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı alınmış ve son hacmin %20'si olacak şekilde soğuk TCA ilave edilmiştir. Beş dakika düşük devirde sentrifüj işleminden sonra 1 ml 2 N HCl içerisinde hazırlanmış 10 mM 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) ilave edilmiştir. Kör olarak hazırlanacak örneğe yalnızca 2 N HCl ilave edilmiştir. Örnekler karanlık bir ortamda oda sıcaklığında her 10 dakikada bir vorteksenerek 1 saat inkübe edilmiş ve 1 ml %20'lik TCA ilave edilerek 5 dakika 10.000xg'de sentrifüj edilmiştir. Süpernatantlar dökülüp elde edilen protein peletleri bir kez daha %20 TCA ile bir kez, serbest kalan DNPH'ları tamamen elemine etmek için 1ml ethanol/etil asetat (1:1) ile üç kez yıkanmıştır. Bu işlemlerin ardından örnekler 0,5 ml 6 M guanidin hidroklorid (2N HCl'de çözülür) içerisinde 37°C'de 15 dakika vorteksenerek çözülmüştür. Karbonil içeriği 366 nm'de 22 M⁻¹ cm⁻¹ katsayı ve kör numune değeriyle fark dikkate alınarak hesaplanmıştır (Levine *et al.* 1994).

3.3.10. İyon iletkenliği ve % donma hasarının belirlenmesi

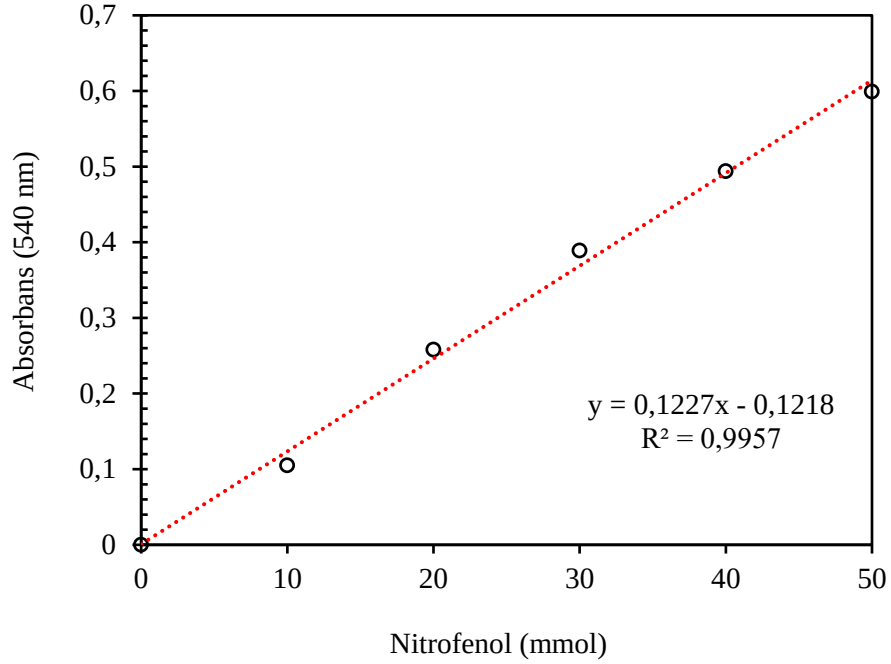
Taze yaprak örnekleri saf su ile üç kez yıkandıktan sonra 0,1 gram olacak şekilde tartılmış ve deney tüplerine konulmuş ve bu tüpler, -12°C'ye kadar ayarlanabilen bir su banyosuna (donmanın gerçekleşmemesi için su banyosu içerisinde su ve alkol karışımı bulunur) topluca yerleştirilmişlerdir. Daha sonra bütün tüpler, 0 dan -12°C'ye kadar, her iki derecelik azalışta 10 dk tutulmuş ve her iki dereceden sonra banyodan bir tüp alınmış ve etiketlenmiştir. Banyodan alınan her bir tüpün içerisine 4 ml saf su ilave edilmiş ve bu tüpler 4°C'de 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra tüplerin içerisindeki saf suya geçen iyon miktarı, bir elektrik kondüktivimetre ile ölçülmüş değerler iyon iletkenliği olarak ve % donma hasarı olarak verilmiştir (Griffith *et al.* 1992; Tasgin *et al.* 2003).

3.3.11. Lipaz aktivitesinin belirlenmesi

%2 3-[(cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) ve 20 mM L-histidin (pH: 5.5) içeren 4 ml ekstrasyon tamponunda 1 g yaprak dokusu 14 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından 10.000xg'de 30 dakika sentrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak 0.45 µM selüloz asetat membrandan geçirilmiş ve -20°C'de analizler için muhafaza edilmiştir.

Enzim aktivitesi analizi için solüsyon A ve B olmak üzere iki reaksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Solüsyon A;150 mM n-heptan içerisinde çözölmüş 4-nitrophenyl butyrate (NPB) karışımından 6.7 µl alınmış ve tüplere ilave edilmiştir. 50 mM sitrik asit (pH: 3-4), sodyum asetat (pH: 5), L-histidin (pH: 5.5-6), sodyum fosfat (pH: 7), tris aminomethan (pH: 8) veya sodyum karbonat (pH: 9-10) içeren solüsyon B'den 1 ml alınarak solüsyon A konulan tüplere ilave edilmiş ve 10 saniye kadar vortekslenmiştir. Daha önceden hazırlanmış doku homojenatları alınarak üzerine solüsyon A ve Solüsyon B karışımından 6,7 µl ilave edilmiştir. Kısa bir karıştırma işleminden sonra kuartz küvetlerde 346 nm'de 5. dakikadaki absorbans değişimi kaydedilmiştir.

Nitrofenol kullanılarak hazırlanan standart grafik yardımı ile 1 μ M nitrofenol üretimi için gereken lipaz aktivitesi 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir (Zhong and Glatz 2006).



Şekil 3.4. Lipaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik

3.3.12. NADH bağımlı Glutamat Dehidrogenaz (NADH-GDH) aktivitesinin belirlenmesi

Bitki yaprak dokularından 0,2 gram alınarak 5 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponunda homojenize edilmiştir. 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponu 3,3 mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 1mM β -merkaptoetanol, 1mm dithiothreitol (DTT) ve 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) içermektedir. Karışım 22.000xg'de 10 dakika (4°C) boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj edildikten sonra reaksiyon karışımına eklenerek 340 nm'de absorbansları okunmuştur (Sukalovic 1990). Reaksiyon karışımı: 76 mM Tris-HCl tamponu (pH 8.1), 20mM α -ketoglutarat, 150mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,2mM NADH, 1mm $MgCl_2$ ve 200 μ l süpernatant eklenerek son hacim 3 ml olacak şekilde hazırlanmıştır (2,8 ml reaksiyon karışımı üzerine 0,2 ml süpernatant toplam 3 ml). NADH kullanılmak

suretiyle çift yönlü reaksiyon özelliğine sahip olan GDH'ın glutamat oluşumunu sağlayan aktivitesi belirlenmiştir.

3.3.13. Mitokondri izolasyonu

Hasat edilen bitki yapraklarının hepsi homojen olması açısından öncelikli olarak sıvı azotta homojenize edilmiştir. Tartılan bitki dokuları ağırlığının 4 katı kadar hacimde; 0,4 M mannitol, 50 mM MOPS (pH: 7.2), 2mM etilen glikol tetra asetik asit (EGTA), 4 mM L-sistein, %0,6 polivilprolidin (PVP), 20 mM β - merkaptotanol ve %0,5 bovine serum albumin (BSA) içeren ekstraksiyon tamponunda 4°C'de homojenize edilmiştir. Karışım 5 dakika 400xg'de santifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı alınıp 15 dakika 2000xg'de tekrar santifüj edilmiştir. Santifüj işleminden sonra süpernatant alınıp 30 dakika 10.000xg'de tekrar üçüncü kez santifüj edilmiştir. Oluşan pelet alınıp 0,3 M mannitol, 20 mM MOPS (pH: 7.2), 1mM EGTA ve %0,1 BSA içeren tamponda homojenize edilmiştir. Elde edilen karışım 2000xg'de 10 dakika boyunca santifüj edilmiştir. Süpernatant alınmış ve 15 dakika 15.000xg'de son kez santifüj edilmiştir. Elde edilen saf mitokondri peleti az miktarda yıkama tamponunda homojenize edilmiştir. Oksijen tüketimi, Western blot analizleri ve enzim aktiviteleri için kullanılabilecek kadar -86°C'de muhafaza edilmiştir (Plummer 1980; Chien 2011).

3.3.14. Sitrat sentaz aktivitesinin belirlenmesi

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

3.3.15. Karnitin açıl transferaz aktivitesinin belirlenmesi

Karnitin açıl transferaz I aktivitesi yağ açıl CoA'nın açıl karnitine dönüşümü esnasında saldıgı SH gruplarının 5-5' dithio-bis-2 nitrobenzoat (DTNB) ile reaksiyonu sonucu 412 nm'de meydana gelen absorbans artışının belirlenmesi esasına dayanır. Enzim aktivitesini belirlemek için toplam hacim 1 ml olacak şekilde; 400 mM Tris-HCl (pH: 7.6), 4 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 6 mM DTNB, 10 μM asetil CoA, 1 mM L-karnitin içeren reaksiyon karışımına izole edilmiş mitokondrilerden 10-80 μg protein içeren enzim kaynağı eklenmiş ve spektrofotometrik yolla 412 nm'deki absorbans değişimi belirlenmiştir. Enzim aktivitesi $\epsilon_{412} = 13.6 \text{ cm}^2 \mu\text{M}^{-1}$ katsayına göre hesaplanmıştır. Kör numune olarak asetil-CoA ve L-karnitin içermeyen reaksiyon karışımı kullanılmıştır.

Açıl koenzim-A'dan tioester bağlarının ayrılması veya bağlanmasını katalizleyen karnitin açıl transferaz II aktivitesi ise; reaksiyon karışımından DTNB, L-karnitin ve asetil-CoA çıkarılarak bu maddelerin yerine substrat olarak 10 μM palmito-karnitin ve 1 mM CoASH (koenzim-A) eklenmesi ile 232 nm'deki absorbans artışı kaydedilmek suretiyle $\epsilon_{232} = 5.0 \text{ cm}^2 \text{ M}^{-1}$ katsayısına göre hesaplanmıştır (Schwabedissen- Gerbling and Gerhardt 1995).

3.3.16. Total solunum, sitokrom yolu ve alternatif solunum yolları aktivitelerinin belirlenmesi

Sitokrom yolu (COX) ve alternatif solunum yolları (AOX ve eşleşme önleyici proteinler/eşleşme önleyicilerin (UCP/UCNP) aktiviteleri bu enzimlerin inhibitörlerinin izole mitokondri ortamına eklenmesi sonucu oksijen tüketimi değerlerinde meydana gelen değişimlere göre hesaplanır.

0,3-0,4 mg protein içeren izole mitokondri örnekleri oda sıcaklığında oksijen elektrotu kuvvetlerine konulmuş ve ortama 200 μM ATP eklendikten sonra, 500 μM ADP ve 10 mM süksinat substrat olarak ilave edilmiştir. Substrat ilave edilmesinden sonra 2 dakika sonra ortama 1 mM KCN ilave edilmesine kadar ölçülen oksijen tüketimi total solunum hızıdır. Alternatif solunum yolu hızı, ortamda 1mM KCN (sitokrom yolu inhibitörü)

mevcut iken 2 dakika sonra AOX inhibitörü olan 1 mM salisilhidroksamik asit (SHAM) ilave edilmesine kadar tüketilen oksijen miktarına göre belirlenmiştir. UCP/UCNP aktivitesi ise, ortama 1mM SHAM ilave edilerek 2 dakikada tüketilen oksijen miktarı ile belirlenmiştir. Bulunan UCP/UCNP hızı alternatif solunum yolları hızından çıkarılarak AOX aktivitesi belirlenmiştir. Alternatif solunum yollarının hızı, total solunum hızından çıkarılmak sureti ile sitokrom yolu hızı belirlenmiştir (Vanlerberghe and McIntosh 1992).

3.3.17. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)

Western blot analizi için mitokondri proteinleri %4–10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) Laemmli (1970) yöntemi ile yürütülmüştür. Bunun için elektroforez plakaları önce alkol, sonra su ile iyice yıkanmıştır. İki cam plaka birbiri üstüne konularak kışkaçlarla tutturulmuş ve jel hazırlama cihazına yerleştirilmiştir. Ayırma jeli hazırlanarak cam plakalar arasına pipetle aktarılmıştır. Bu işlemler yapılırken hava almamasına dikkat edilmiş ve jel yüzeyinin düzgün olması için izopropil alkol ile ince bir tabaka oluşturulmuştur. Polimerleşinceye kadar yaklaşık yarım saat beklenmiştir. Polimerizasyon bittikten sonra üzerindeki izopropil alkol dökülmüş ve hazırlanan yığma jeli cam plakaların en üst seviyesine kadar aktarılmış ve tarak dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. Yaklaşık 45 dakika sonra cam plakalar elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konulup tarak dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde numune tamponu içerisinde hazırlanmıştır. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katılmıştır. Beş dakika boyunca kaynar su banyosunda inkübe edilmiştir. Numuneler soğuk su banyosuna alınıp kuyucuklara pipet yardımı ile aktarılmıştır. Tank kapağı kapatılarak (+) kablo (anot) ve (-) kablo (katot) yerleştirilmiştir. Önce 80 voltluk akım yarım saat geçirilmiş. Daha sonra akım 120 volta ayarlanarak 2-4 saat kadar bir sürede oda sıcaklığında yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda akım kesilerek, cam plakalar tanktan alınmış ve plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarılmıştır.

Yığıma jeli: 1 M'lık Tris-HCl (pH: 6.8)'den 380 µl, %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 400 µl, %10'luk SDS'den 30 µl, %5'lik N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin'den (TEMED) 3 µl ve saf sudan 2,2 ml alınarak karıştırılmıştır. Son olarak yine günlük hazırlanmış %10'luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER)'den 30 µl ilave edilmiştir.

Ayırma jeli: 2,03 ml 1M Tris-HCl (pH: 8.8), 2,67 ml %30'luk akrilamid, %0,8'lik bisakrilamid, 80 µl %10 SDS, 3,2 µl %5'lik TEMED ve 3,15 ml su karıştırılmıştır. Bu karışımın üzerine en son olarak 80 µl %10'luk PER ilave edilmiştir.

3.3.18. AOX ve COX protein ifadeleri analizi (Western Blot)

Mısır yapraklarından izole edilen mitokondrial proteinlerin, yukarıda yer alan SDS-PAGE yöntemi kullanılarak molekül büyüklüğüne göre ayrımı yapılmıştır. Daha sonra molekül büyüklüğüne göre ayrılmış proteinler Towbin ve arkadaşları tarafından tanımlanan metodla 13 mM tris (pH: 7.2), %10 metanol ve 190 mM glisin içeren tamponda nitroselüloz memrana (0,45 mm por büyüklüğüne sahip) 2.5A akım ile 7 dakikalık süreyle trans blot turbo cihazında transfer gerçekleştirilmiştir (Towbin *et al.* 1970). %0,1 Tween-20, 140 mM NaCl içeren 20 mM Tris tamponunun (pH: 7.6) hacmine oranla %3 BSA (sığır serum albumini) ve %5 süt tozu katılmış ve membranlar bu çözeltide 25°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Membran %0,1 Tween-20'de yıkandıktan sonra AOX'e karşı *Sauromatum guttatum* dan elde edilen monoklonal antikorları (Elthon *et al.* 1989) (1: 100 oranında seyreltilmiş) içeren tween-20 ve %5'lik BSA içeren çözeltide bir saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 4 kez 5'er dakika %0,1 Tween-20'de yıkanan membran, yabanturpu peroksidazına bağlanmış anti-mouse sekonder antikorlarını (1:10000 oranında seyreltilen) içeren %0,1 Tween-20 ve %2 süt tozunda iki saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Membran 6 kez 5'er dakika %0,1 Tween-20 ile yıkanmıştır. Cross-reacted antikor SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Perbio Science UK) kullanılarak AOX protein bantları saptanmıştır.

COX proteininin ifadesindeki değişim ise alt birimi olan sitokrom oksidaz II (COXII)'nin ifadesindeki değişimler saptanarak ortaya konulmaya çalışılmıştır. COXII ifade düzeyini belirlemek için ise AOX blotlama işlemindeki tüm basamaklar aynen uygulanırken membranın primer antikorla muamele işlemini 1:1000 oranında seyreltilen poliklonal antikor (COXII) ile gerçekleştirilmiştir (Rurek *et al.* 2015). COXII protein bantları AOX protein bantlarının tespitindeki tüm aşamalar aynen uygulanarak kemilüminesans görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. 15 ile 35 µl arasında izole mitokondri proteini kullanılarak her iki protein için optimum hacim belirlenmiştir.

3.3.19. RNA izolasyonu ve gen analizleri

Lipaz, sitrat sentaz, sitokrom oksidaz, glutamat dehidrogenaz ve alternatif oksidaz enzimlerinin gen analizinde RNA izolasyonu için Rneasy plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılmıştır. Üretici firmanın talimatlarına göre 100 mg bitki dokusundan RNA izolasyon robotu kullanılarak total RNA izole edilmiştir. RNA içerisindeki genomik DNA kalıntıları yok etmek için RNA izolasyonu yaparken genomik DNA elemine edici kolon kullanılmıştır, ardından RNA'nın miktarı ve saflığı QIAexpert (Qiagen) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. cDNA hazırlarken bütün örneklerdeki RNA miktarı 1 µl'de 100 nanogram olacak şekilde eşitlenmiştir. RT-NANOSCRİPT2 PD kiti protokolü uyarınca 12 µl RNA 0,2ml'lik PCR tüplerine alınıp üzerine 2 µl genomik DNA elemine edici tampon ilave edilmiştir. 42°C'de 2 dk Thermal Cycler'daki inkübasyondan sonra örnekler üzerine; Reverse-transcriptase: 1 µl, RT Buffer: 4 µl, dNTP: 1 µl ilave edilerek hazırlanan karışımdan cDNA üzerine 6 µl eklenmiş ve son hacim 20 µl olmuştur. 42°C'de 15 dk ve 95°C'de 3dk Thermal Cycler'da inkübasyona bırakılmıştır. Üretilen cDNA'ların yoğunluğunun seyreltilmesi için 91 µl RNAase ve DNAase içermeyen su eklenmiştir. RT-PCR reaksiyon karışımı toplam hacim 20 µl olacak şekilde 5 µl cDNA, 1 µl Taqman problu reverse ve forward primerleri, 6,5µl dH₂O ve 12,5 µl Mastermix (Rotor-Gene Probe PCR Master Mix, 2x) içerecek şekilde hazırlanan karışım PCR tüplerine dağıtılmıştır.

Glutamat dehidrogenaz, lipaz, sitrat sentaz ve sitokrom oksidaz proteinlerinde referans gen olarak β -actin kullanılırken, alternatif oksidaz I ve alternatif oksidaz prekürsör proteinlerinde ise 18S rRNA kullanılmıştır.

Gerçek Zamanlı PCR protokolü ise şu şekilde programlanmıştır;

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

Elde edilen Ct (Cycle threshold) değerleri, Qiagen sitesinde yer alan GeneGlobe Data Analiz Merkezi’nde kontrol ve kat değişim kriteri olarak 18S rRNA ve β -actin referans geni kullanılması ile ham veri normalizasyonu ile $2^{\Delta CT}$ yöntemine dayalı gerçek zamanlı PCR verilerini analiz etmek için kullanılmıştır.

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

Genler	ID Numaraları	Primer Dizilimleri
<i>Zea Mays</i> Beta Actin	NM_001155179	F: GTGACAATGGCACTGGAATG R: CCATGCTCAATCGGGTACTT
<i>Zea Mays</i> Lipase	NM_001137517	F: TTGCTCCGGGAGAGAACTTA R: CAAGCAGTTCTCGACATCCA
<i>Zea Mays</i> Citrate synthase	NM_001152570	F: TGCTCACAGTGGAGTTTTGC R: AACACTCTTCGGCCTCTCAA
<i>Zea Mays</i> Glutamate dehydrogenase	NM_001111831	F: AGGAAGCTCGTCAACTCCAA R: AGAGCAGCCTCGTTGAGGTA
<i>Zea Mays</i> Cytochrome c oxidase	NM_001301541	F: CATGAGTGCGACTTGGAGAA R: TCAGGAGATGTACCCGCTTC
<i>Zea Mays</i> 18S rRna	009070	F: AAAGTGGCGGAATGCTCTC R: TCTACGGATTTCACCCCTACA
<i>Zea Mays</i> Alternative oxidase I	NM_001111710	F: AGGTGCTTTTCTGGCGTTT R: CGATATTAGCGAGCCCAATTC
<i>Zea Mays</i> Alternative oxidasidase Precursor	NM_001111709	F: GTCTTCTTCAACGCCTACTTC R: GAGGTATTTCGGTATATGAGTGGAT

3.3.20. İçsel karnitin ve açıl karnitin içeriklerinin belirlenmesi

İçsel karnitin ve açıl karnitin içerikleri LC-MSMS analizi yöntemi ile belirlenmiştir. Hasat sonrası kurutulan bitki dokusu sıvı azotta iyice parçalanmıştır. Parçalan dokulardan 100 mg tartılmış ve üzerine %1 formik asit içeren metanol çözeltisinden 1 ml ilave edilerek homojenize edilmiştir. Homojenatlar 1 dk boyunca iyice vortekslenmiştir. Numuneler 40°C'de 10 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Oluşan renkli çözelti 0,22 mikron naylon şırınga ucu filtreden süzülerek cihaza 5 µl olarak enjekte edilmiş ve yürütme işlemi 35°C'de gerçekleşmiştir. Analizde iki farklı mobil faz kullanılmıştır. MPA: 5mM amonyum format, %0,1 formik asit içeren ultra saf su içerisinde hazırlanarak kullanılmıştır. MPB ise: asetronitril içerisine %1 formik asit ilave edilerek hazırlanmıştır. Gradient mobil faz A'dan %90, B'den %10 şeklinde kullanılarak başlatılmıştır. Üçüncü dakikadan sekizinci dakikaya kadar B'den %98, A'dan ise %2 kullanılmıştır. Sekiz ile onuncu dakikalar arasında ise başlangıçtaki gibi A'dan %90, B'den ise %10 şeklinde gradient sonlandırılmıştır. Kullanılan karnitin ve açıl karnitin standartları (1, 2.5, 5, 10 ve 25 ppb olarak hazırlanmıştır; Propionyl-L-Carnitine (3C), Hexanoyl-L-Carnitine (6C), Decanoyl-L-Carnitine (10C), Lauroyl-L-Carnitine (12C), Myristoyl-L-Carnitine (14C) ve Stearoyl-L-Carnitine (18C)) Agilent Zorbax SB-C8 Solvent Saver Plus 3.0X1500 mm 3.5-Micron kolonda yürütülmüştür. L-karnitin, açıl karnitin bileşiklerine göre daha polar bir bileşik olmasından dolayı Agilent Hilic 3.0X150 mm 4,6-Micron kolonda yürütülmüştür.

Çizelge 3.2. Aşağıda yer alan tabloda çalışılan standartların retention time değerleri verilmiştir.

Gruplar	Retention time
L-carnitine	4,062
Propionyl-L-Carnitine	1,563
Hexanoyl-L-Carnitine	4,221
Decanoyl-L-Carnitine	4,909
Lauroyl-L-Carnitine	5,417
Myristoyl-L-Carnitine	6,278
Stearoyl-L-Carnitine	8,683

3.3.21. Yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi

Karnitin uygulamasının yaprak dokularındaki yağ asidi kompozisyonları üzerine nasıl bir etkiye sahip olduğu, yağ asidi içeriklerinin gaz kromatografisi (GC-FID) yöntemi kullanılması ile belirlenmiştir.

Tartılan yaklaşık 10 g taze yaprak örneği, 100°C'lik etüvde sabit tartım elde edilinceye kadar (yaklaşık 18 s) kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin ham yağ içeriği eter ekstraksiyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla, kurutulan örnekler sokslet ekstraksiyon sisteminde dietil eter kullanılarak 8 s süre ile ekstrakte edilmiş ve yağ içerikleri gravimetrik olarak belirlenmiştir (Gökalp vd 2010).

Yağ asidi kompozisyonu, örneklerden elde edilen yağın metil esterlerinin oluşturulmasının ardından, gaz kromatografisi alev iyonizasyon dedektörü (GC-FID) kullanılarak belirlenmiştir. Yağ asidi metil esterlerinin (FAME) oluşturulmasında AOAC 996.01 metodu kullanılmıştır (Satchithanandam *et al.* 2001). Eter ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen 0,1 g yağ, 10 ml n-hekzan ile çalkalanmış, 0,5 ml 2 N metanollü potasyum hidroksit çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. 1-2 s karanlık ortamda bekletildikten sonra üst fazdan 1 µL gaz kromatografisine enjekte edilmiştir.

Yağ asidi kompozisyonu; Shimadzu marka gaz kromatografi (model QP2010 Plus) cihazında alev iyonizasyon dedektör (FID) ve Restek RTX-2330 kapiler kolon (60 m, 0.25 mm i.d., 0.1 µm film kalınlığı, Bellefonte, PA, USA) kullanılarak analiz edilmiştir. Kolon fırını sıcaklığı 100°C'de 3 dk tutulduktan sonra, dakikada 4°C artışla 240°C'ye çıkarılmış ve son sıcaklık derecesinde 18 dk bekleyecek şekilde programlanmıştır. Enjeksiyon sıcaklığı 250°C, dedektör sıcaklığı ise 255°C'ye ayarlanmıştır. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmış ve akış hızı 0.64 ml/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Enjeksiyon split oranı 1:80 olarak ayarlanmıştır. GC-FID sisteminin kontrolü için Lab Solution bilgisayar programı ve standart olarak FAME mix 37 standardı (Supelco) kullanılmıştır. FAME pikleri; alıkonma zamanları ve standartta belirtilen zincir uzunlukları kıyaslanarak teşhis edilmiştir.

3.4. İstatistiksel analiz

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



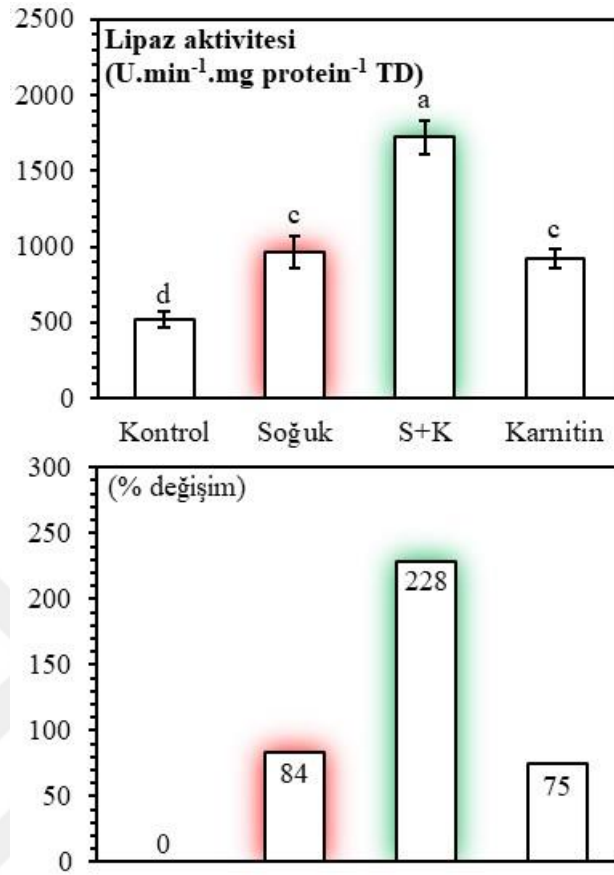
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmamızda mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin soğuğa direnci üzerine etkisini belirlemek amacıyla kullanmayı düşündüğümüz L-karnitin en uygun konsantrasyonlarını bulmak için, öncelikli olarak literatür verilerinden de yararlanarak ön çalışmalar yapılmıştır. Ön çalışmalarda; 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM, 750 µM ve 1000 µM konsantrasyonlarda hazırlanan karnitin çözeltileri, 9 günlük olan mısır bitkisinin yapraklarına eksojen olarak uygulanmış ve uygulanan çözeltilerin bitkilere nüfuz edebilmesi için 6 saat boyunca oda koşullarında beklenmiş ve daha sonrasında bitkiler soğuk ortama transfer edilmiştir. Soğuk uygulamasından 72 saat sonra hasat edilen bitkilerin kök ve gövde uzunlukları, kuru ağırlık, protein, MDA, H₂O₂ ve O₂⁻ içeriklerine bakılarak karnitin (K) soğuğa direnç üzerine en uygun konsantrasyon değeri belirlenmiştir. Ön çalışmalar sonucunda karnitin 25 µM konsantrasyonunda kayda değer sonuçlar elde edildiğinden, esas çalışmaya belirlenen bu konsantrasyonla devam edilmiş, oluşturduğumuz deney gruplarında, gerekli uygulamalar yapıldıktan sonra materyal-yöntem kısmında belirtilen bir takım fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler parametreler test edilmiştir.

Oluşturulan Deney Grupları	
Kontrol (25/20°C, gündüz/gece)	Soğuk (9/5°C, gündüz/gece)
25 µM Karnitin (25/20°C, gündüz/gece)	Soğuk + 25 µM Karnitin (9/5°C, gündüz/gece)

4.1. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkileri

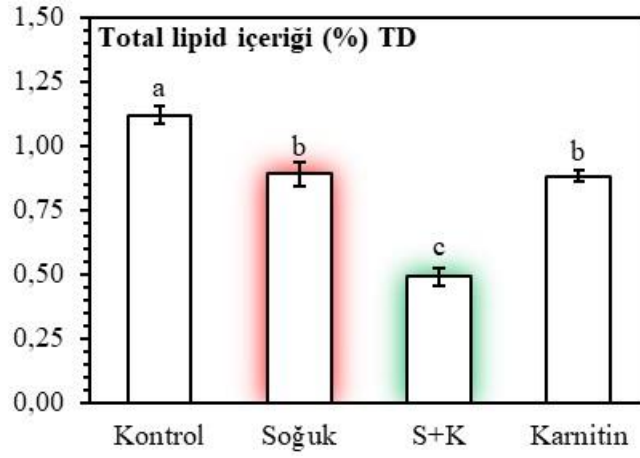
Kontrol grubu bitkilerinde lipaz aktivitesinin 525 U.min⁻¹.mg protein⁻¹ değerinde olduğu, soğuk grubunda ise %84'lük artışla 966 U.min⁻¹.mg protein⁻¹ değerine ulaştığı kaydedildi. S+K grubunda, kontrol grubu bitkilerine kıyasla lipaz aktivitesinin %228 oranında bir artışa yol açarak 1722 U.min⁻¹.mg protein⁻¹ değerlerine ulaştığı belirlendi. Karnitin uygulamasının ise kontrol grubuna göre lipaz aktivitesini %74,9 oranında artırdığı ve 918 U.min⁻¹.mg protein⁻¹ değerine kadar çıkardığı tespit edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Mısır bitkilerinde lipaz enzim aktivitesi ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

4.2. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Total Lipid İçeriği Üzerine Etkileri

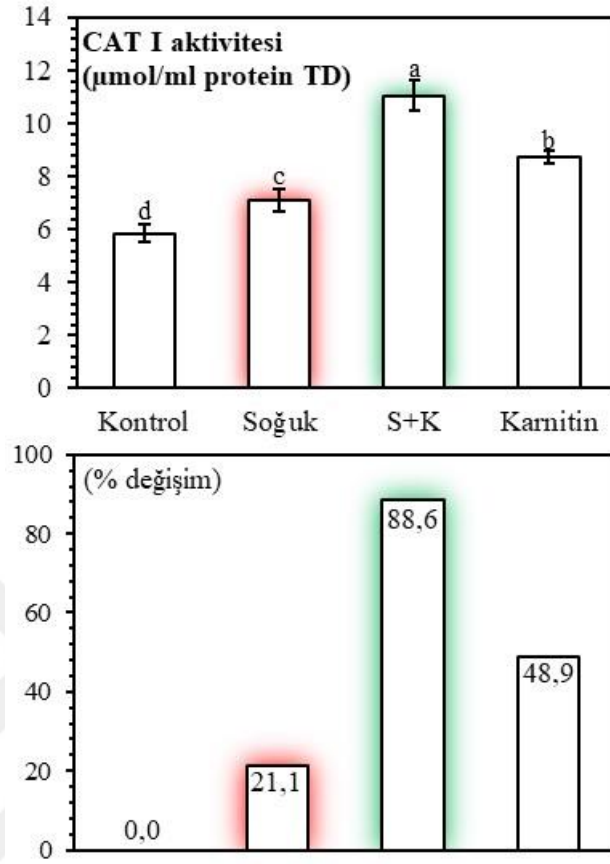
Total lipid içeriği sokslet ekstraksiyon sistemi ile dietil eter kullanılarak elde edilen yağ içeriklerinin gravimetrik yöntemle belirlenmesi esasına dayanır. Kontrol bitkilerinde total lipid içeriği %1,12 iken bu değer soğuk uygulamasında kontrole kıyasla azalma sergileyerek %0,89 olarak ölçülmüştür. S+K uygulamasında kontrole kıyasla azalma göstererek %0,49 olarak kaydedilmiştir. Karnitin uygulamasında ise %0,88 değeri kaydedilmiştir. Soğuğun meydana getirdiği bu inhibisyon karnitin uygulamaları ile önemli oranda iyileştirilebilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Mısır bitkilerinde total lipid içeriği üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

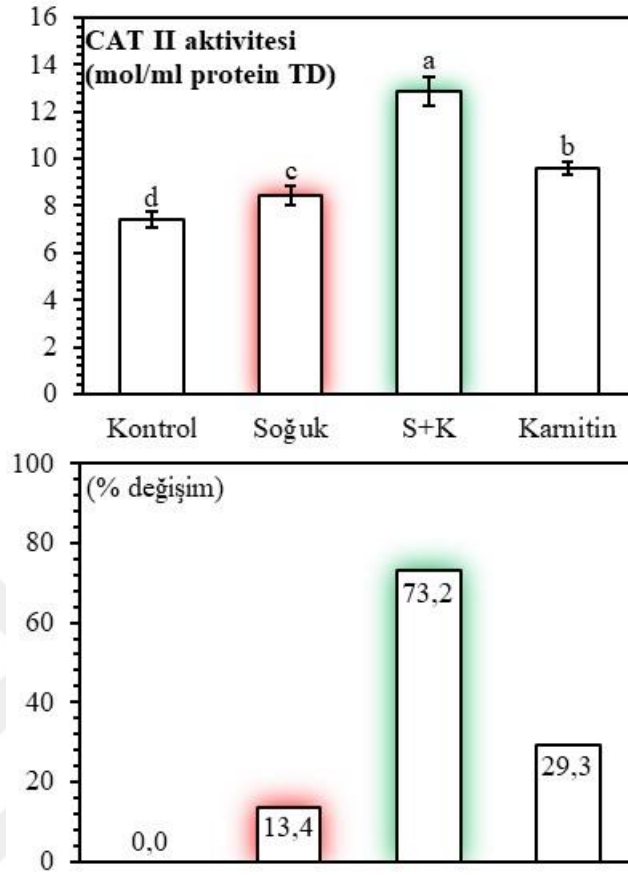
4.3. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının CAT I ve CAT II Aktiviteleri Üzerine Etkileri

Kontrol grubunda karnitin açıl transferaz I aktivitesinin $5,861 \mu\text{mol/ml protein}^{-1}$ olduğu, soğuk grubunda ise aktivitenin %21,1 oranında artarak $7,100 \mu\text{mol/ml protein}^{-1}$ olduğu kaydedildi. S+K grubunda kontrol bitkilerine kıyasla %88,6 oranında bir artışla söz konusu aktivitenin $11,056 \mu\text{mol/ml protein}^{-1}$ değerine ulaştığı belirlendi. Karnitin grubunda ise, kontrol grubuna göre aktivitenin %48,9 oranında artış göstererek $8,725 \mu\text{mol/ml protein}^{-1}$ olarak kaydedildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Mısır bitkilerinde CAT I enzim aktivitesi ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

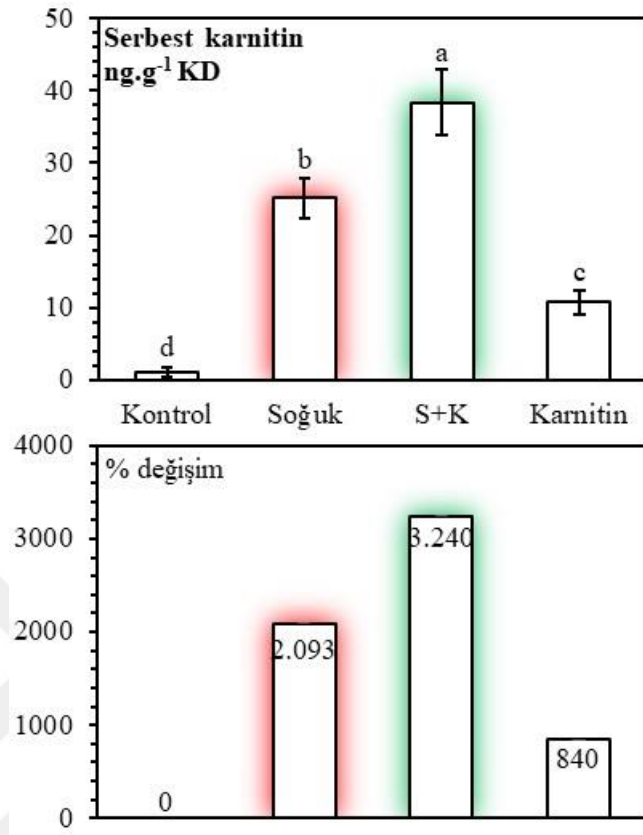
Kontrol grubunda karnitin açıl transferaz II aktivitesi $7,427 \text{ mol/ml protein}^{-1}$ olarak bulunurken, soğuk grubu bitkilerinde %13,4 gibi bir artışla bu değerin $8,423 \text{ mol/ml protein}^{-1}$ olduğu saptandı. S+K uygulanan bitki gruplarında kontrol bitkilerine kıyasla %73,2 oranında artış sağlayarak söz konusu aktivitenin $12,862 \text{ mol/ml protein}^{-1}$ değerine ulaştığı belirlendi. Karnitin grubunda ise, kontrol grubuna göre %29,3 oranında artışla bu enzimin aktivite değerinin $9,601 \text{ mol/ml protein}^{-1}$ olduğu tespit edildi (Şekil 4.4).



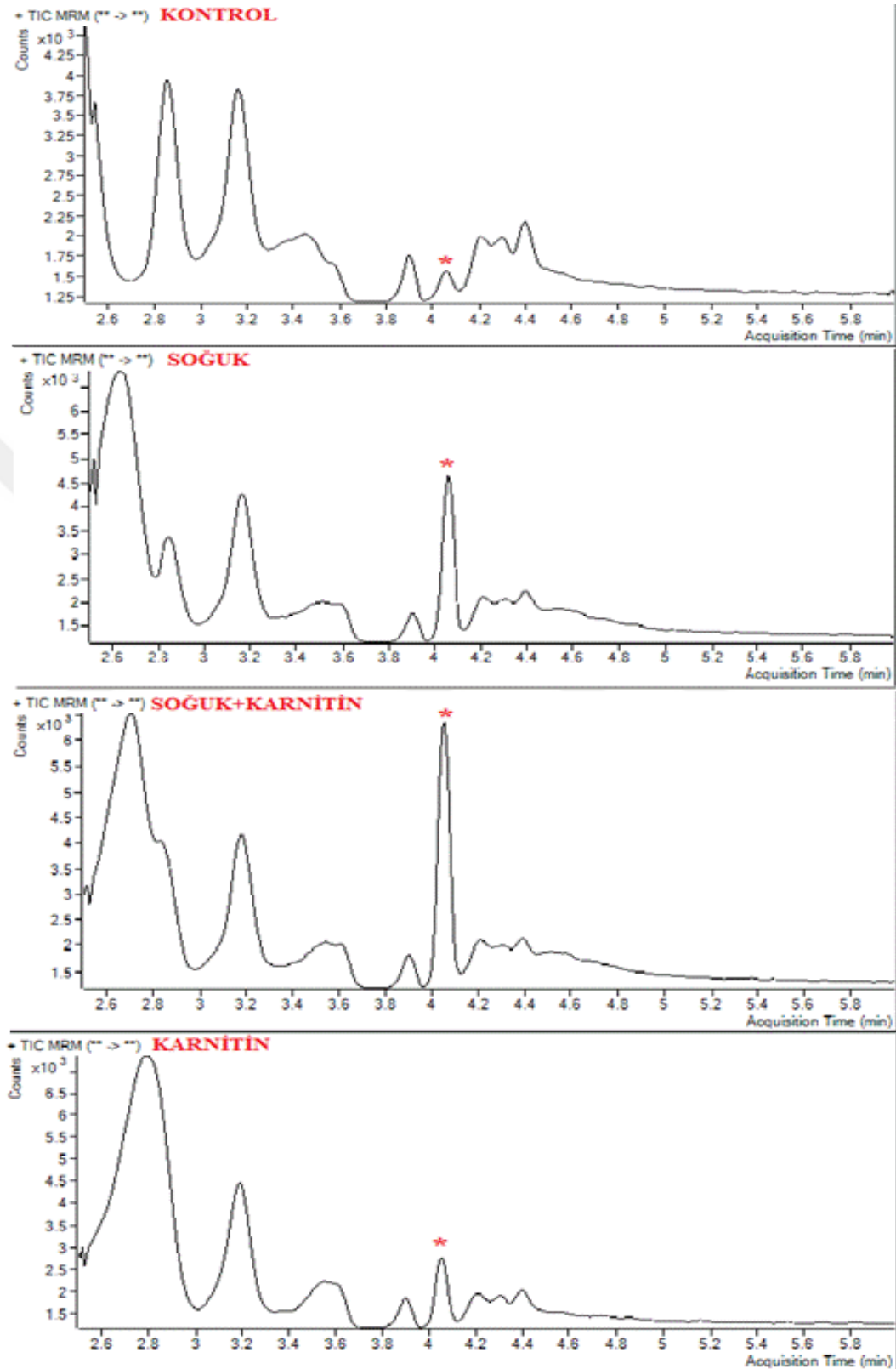
Şekil 4.4. Mısır bitkilerinde CAT II enzim aktivitesi ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

4.4. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Serbest Karnitin ve Açıl Karnitin İçerikleri Üzerine Etkileri

L-karnitin içeriği LC/MSMS cihazında ng.g^{-1} KD (kuru doku) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu bitkisinde L-karnitin içeriği $1,15 \text{ ng.g}^{-1}$ iken, soğuk uygulamasında %2093 artışla $25,21 \text{ ng.g}^{-1}$ olarak ölçüldü. Kontrol uygulamasına kıyasla S+K uygulamasında %3240,4 oranında önemli bir artış olduğu saptandı ve bu içeriğin değeri $38,40 \text{ ng.g}^{-1}$ olarak belirlendi. Kontrol bitkisine kıyasla Karnitin uygulamasında ise %840,4 oranında artışla $10,81 \text{ ng.g}^{-1}$ değeri bulundu. L-karnitin kromatogramda R_t 'si (retention time) 4,06 olarak bulundu (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Mısır bitkilerinde serbest L-karnitin (ng.g⁻¹ KD) içeriği ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri



Şekil 4.6. Uygulama gruplarında L-karnitin varlığını ve miktarını gösteren kromatogram
 (* işareti karnitin verdiği piki göstermektedir.)

Açıl karnitin içerikleri LC/MSMS cihazında ng.g^{-1} KD olarak belirlendi. Propionyl-L-Carnitine, Hexanoyl-L-Carnitine, Decanoyl-L-Carnitine, Lauroyl-L-Carnitine, Myristoyl-L-Carnitine ve Stearoyl-L-Carnitine içeriklerine bakıldı.

Kontrol grubunda 3 karbonlu açıl karnitin bileşiği olan Propionyl-L-Carnitine içeriği $1,61 \text{ ng.g}^{-1}$ iken, soğuk grubunda $2,59 \text{ ng.g}^{-1}$ olarak ölçüldü. Kontrol uygulamasına kıyasla S+K grubunda istatistiki olarak önemsiz bir artışla $1,66 \text{ ng.g}^{-1}$ olarak belirlendi. Kontrole kıyasla Karnitin grubunda ise $1,78 \text{ ng.g}^{-1}$ değeri ile önemsiz bir artış olduğu kaydedildi (Şekil 4.8).

Kontrol grubunda 6 karbonlu açıl karnitin bileşiği olan Hexanoyl-L-Carnitine içeriği $4,62 \text{ ng.g}^{-1}$ iken, soğuk grubunda $6,65 \text{ ng.g}^{-1}$ olarak ölçülmüştür. Kontrole kıyasla S+K grubunda önemli bir azalış sergileyerek söz konusu içeriğin $3,11 \text{ ng.g}^{-1}$ olduğu belirlendi. Kontrol bitkisine kıyasla Karnitin uygulamasında ise $1,78 \text{ ng.g}^{-1}$ değeri ile istatistiki olarak önemli bir azalış olduğu kaydedildi (Şekil 4.8).

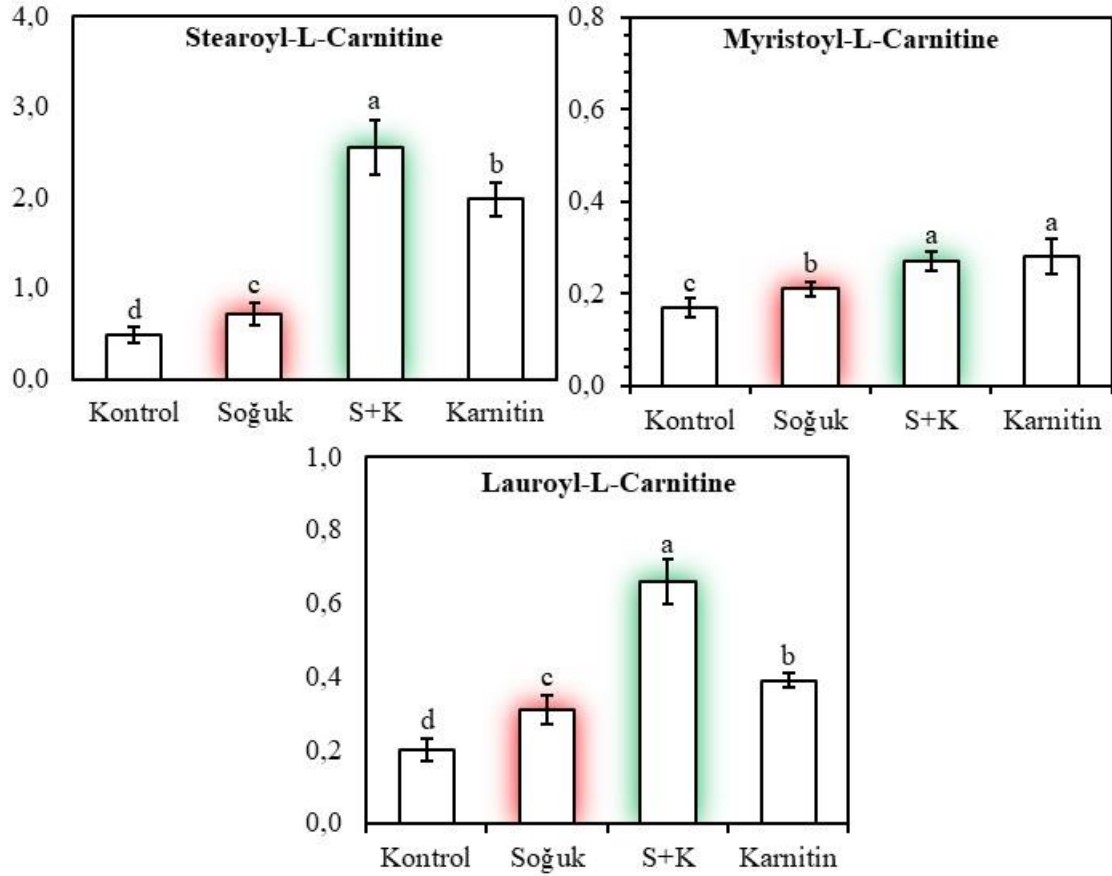
Kontrol grubunda 10 karbonlu açıl karnitin bileşiği olan Decanoyl-L-Carnitine içeriği $3,41 \text{ ng.g}^{-1}$ iken, soğuk grubunda $3,63 \text{ ng.g}^{-1}$ olarak ölçülmüştür. Kontrole kıyasla soğuk grubunda artış gözlenirse de bu artışın istatistiki olarak önem arz etmediği, kontrole kıyasla S+K uygulamasında $7,32 \text{ ng.g}^{-1}$ değeriyle önemli bir artışa yol açtığı, yine bu söz konusu içeriğin Karnitin grubunda ise $3,61 \text{ ng.g}^{-1}$ olduğu saptandı (Şekil 4.8).

Kontrol grubunda 12 karbonlu açıl karnitin bileşiği olan Lauroyl-L-Carnitine içeriği $0,2 \text{ ng.g}^{-1}$ iken, soğuk grubunda $0,3 \text{ ng.g}^{-1}$ olarak ölçülmüştür. Kontrol uygulamasına kıyasla S+K grubunda önemli bir artış saptanmış ve $0,7 \text{ ng.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Kontrole kıyasla Karnitin uygulamasında ise $0,4 \text{ ng.g}^{-1}$ değeri bulunmuştur (Şekil 4.7).

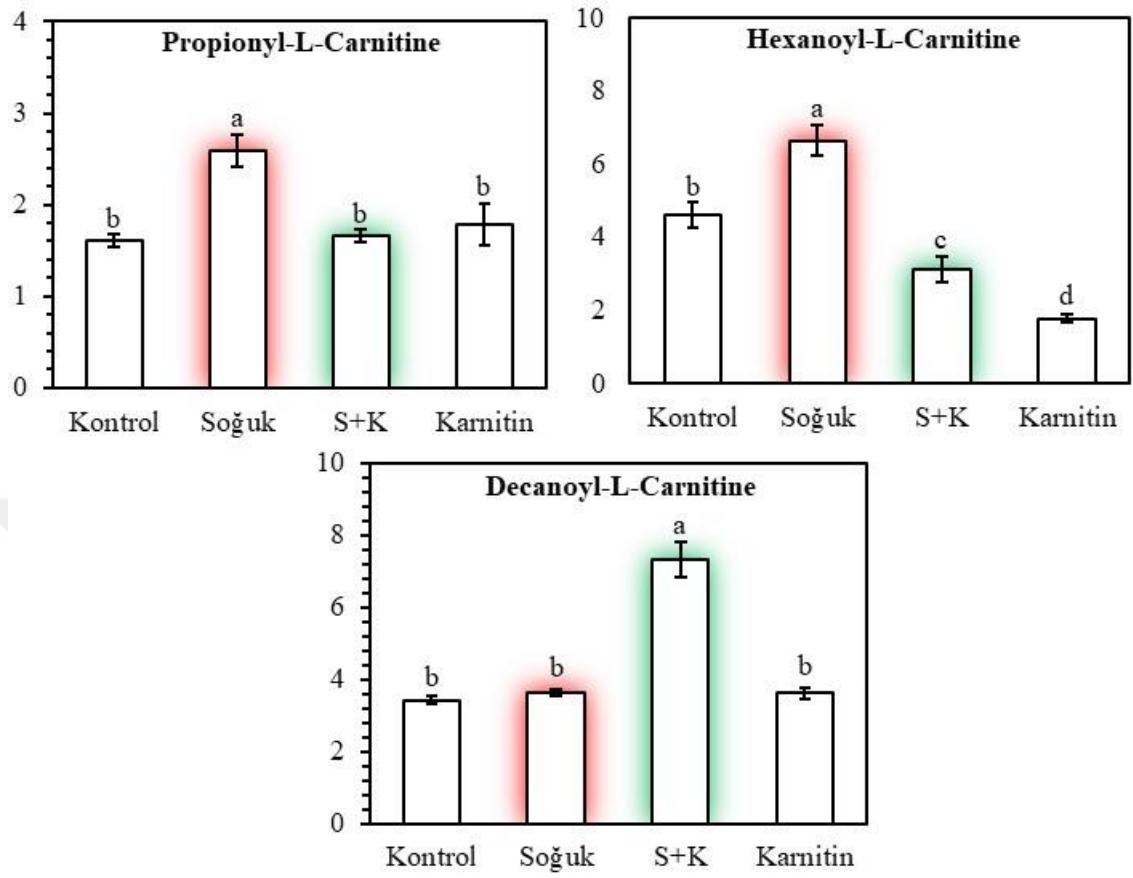
Kontrol grubu bitkisinde 14 karbonlu açıl karnitin bileşiği Myristoyl-L-Carnitine içeriği $0,17 \text{ ng.g}^{-1}$ iken, soğuk uygulamasında kontrole göre artış sağlanarak $0,21 \text{ ng.g}^{-1}$ olarak ölçülmüştür. Kontrol uygulamasına kıyasla S+K uygulamasında önemli bir artış

saptanmış ve $0,27 \text{ ng.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Kontrol bitkisine kıyasla Karnitin uygulamasında ise $0,28 \text{ ng.g}^{-1}$ değeri bulunmuştur (Şekil 4.7).

Kontrol grubu bitkisinde 18 karbonlu açıl karnitin bileşiği Stearoyl-L-Carnitine içeriği $0,48 \text{ ng.g}^{-1}$ iken, soğuk uygulamasında kontrole göre önemli bir artış sağlanarak $0,72 \text{ ng.g}^{-1}$ olarak ölçülmüştür. Kontrol uygulamasına kıyasla S+K uygulamasında dikkate değer bir artış saptanmış ve $2,55 \text{ ng.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Kontrol bitkisine kıyasla Karnitin uygulamasında ise $1,98 \text{ ng.g}^{-1}$ değeri bulunmuştur (Şekil 4.7).

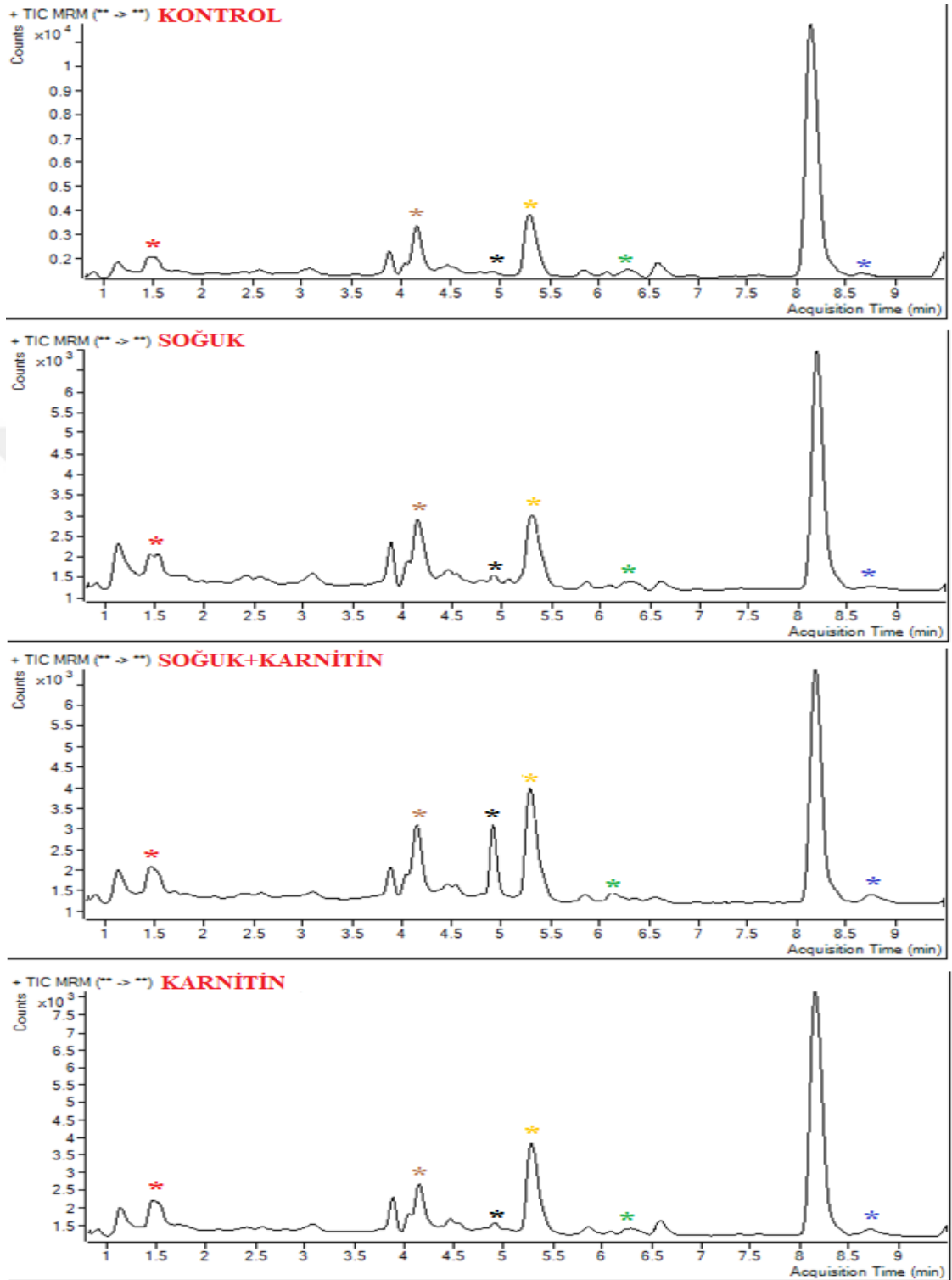


Şekil 4.7. Mısır bitkilerinde uzun zincirli açıl karnitin (Stearoyl-L-Carnitine, Myristoyl-L-Carnitine ve Lauroyl-L-Carnitine) içerikleri üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri (Değerler ng.g^{-1} KD cinsinden ifade edilmiştir.)



Şekil 4.8. Mısır bitkilerinde kısa (Propionyl-L-Carnitine) ve orta zincirli açıl karnitin (Hexanoyl-L-Carnitine ve Decanoyl-L-Carnitine) içerikleri üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

(Değerler ng.g⁻¹ KD cinsinden ifade edilmiştir.)

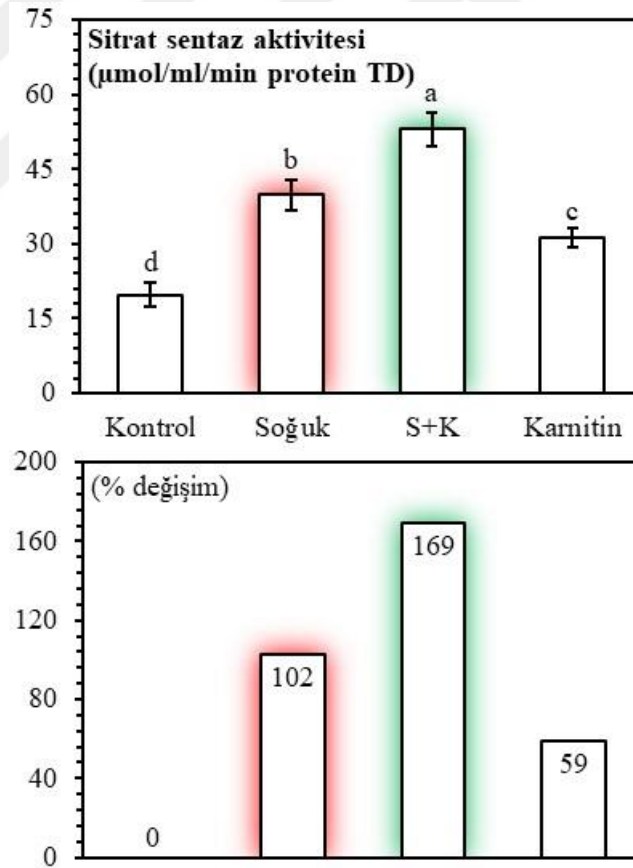


Şekil 4.9. Uygulama gruplarında açıl karnitinlerin varlığını ve miktarını gösteren kromatogram

(* işareti Propionyl-L-carnitine, * işareti Hexanoyl-L-carnitine, * işareti Decanoyl-L-carnitine, * işareti Lauroyl-L-carnitine, * işareti Myristoyl-L-carnitine, * işareti Stearoyl-L-carnitine'in verdiği pikleri göstermektedir.)

4.5. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Sitrat Sentaz Aktivitesi Üzerine Etkileri

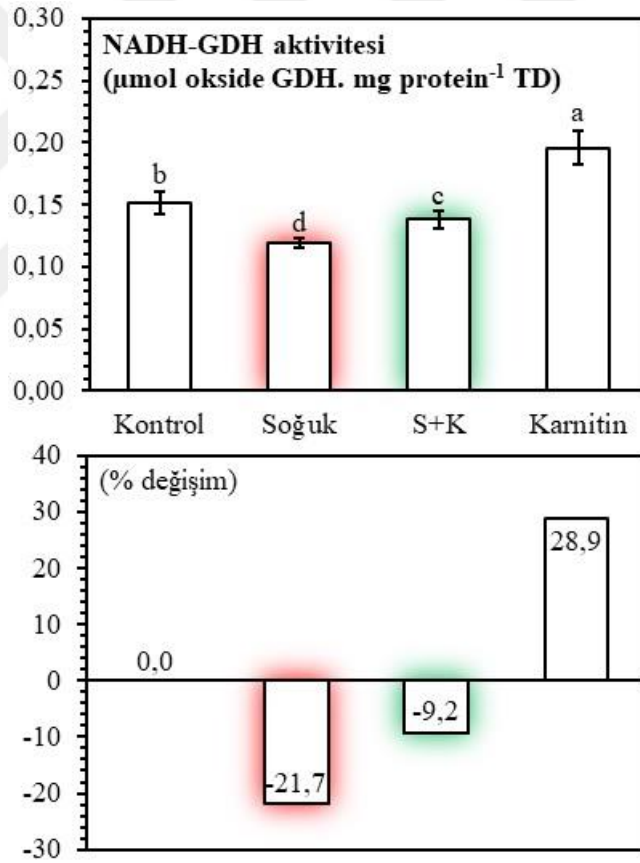
Mısır bitkisinin soğuk stresine maruz kalması sitrat sentaz aktivitesinde artışa neden olmuştur. Kontrol grubunda sitrat sentaz aktivite değeri $19,68 \mu\text{mol/ml/min}$ protein iken, soğuk grubunda bu değerin %102,4'lük bir artış gösterdiği ve aktivitenin $39,83 \mu\text{mol/ml/min}$ protein değerine ulaştığı tespit edildi. Oysa S+K grubunda kontrol bitkilerine kıyasla %169'luk bir artışla sitrat sentaz aktivitesinin $52,94 \mu\text{mol/ml/min}$ protein değerinde olduğu kaydedildi. Diğer taraftan Karnitin grubunda ise, kontrol grubuna göre sitrat sentaz aktivitesinin %58,5 oranında bir artışla $31,2 \mu\text{mol/ml/min}$ protein değerlerine ulaştığı belirlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Mısır bitkilerinde sitrat sentaz enzim aktivitesi ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

4.6. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının NADH bağımlı Glutamat Dehidrogenaz Aktivitesi Üzerine Etkileri

Kontrol grubu bitkilerinde NADH-GDH aktivitesi 0,152 okside $\mu\text{mol GDH mg protein}^{-1}$ olarak bulunurken, soğuk grubunda %21,7 azalışla bu değerin 0,12 okside $\mu\text{mol GDH mg protein}^{-1}$ olduğu belirlendi. S+K grubunda kontrol grubu bitkilerine kıyasla söz konusu aktivitenin %9,2 oranında bir azalış göstererek 0,138 okside $\mu\text{mol GDH mg protein}^{-1}$ değerinde olduğu belirlendi. Karnitin grubunda ise, kontrol grubuna göre %28,9 oranında bir artışla 0,196 okside $\mu\text{mol GDH mg protein}^{-1}$ olduğu kaydedildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Mısır bitkilerinde NADH-GDH enzim aktivitesi ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

4.7. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Total Solunum ve Alternatif Solunum Yolları Üzerine Etkileri

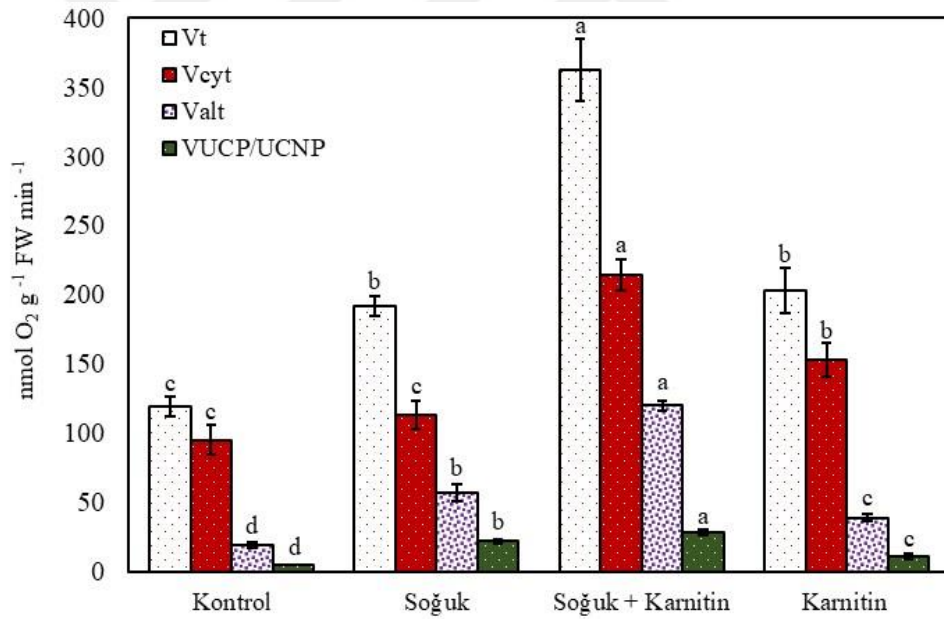
Hücreesel solunum hızı, mitokondride cereyan eden sitokrom yolu ve beraberinde alternatif solunum yollarında tüketilen oksijen miktarı belirlenerek hesap edilir. Total solunum, sitokrom yolu ve alternatif solunum yollarının belirlenmesi için yaprak dokusundan izole edilmiş mitokondriler kullanılmıştır. Bu metotda oksijen tüketimi, bir cihaz yardımı ile belirlenmektedir. Detaylı bilgi için, Materyal ve Yöntem bölümünde “3.3.16.Total Solunum, Sitokrom Yolu ve Alternatif Solunum Yolları Aktivitelerinin Belirlenmesi” başlığı altında verilen bilgilere bakılabilir.

Kontrol grubunda birim zamanda (1 dk.) 119 nmol O₂ olarak ölçülen total solunum hızının, soğuk grubunda kontrole kıyasla önemli bir artış göstererek 192 nmol O₂ olduğu kaydedildi. S+K uygulamasında hem kontrole hem de soğuğa göre daha da önemli bir artış göstererek total solunum hızının 362 nmol O₂ olduğu belirlendi. Karnitin uygulamasında ise kontrole göre yine artış sergileyerek bu değerin 203 nmol O₂ olduğu kaydedildi (Şekil 4.12). Kontrol grubunda sitokrom yolu hızı 95 nmol O₂ iken, soğuk grubunda 113 nmol O₂ olarak saptandı. S+ K uygulanan bitkilerde sitokrom yolu hızı 214 nmol O₂ gibi önemli bir artış sağlayarak hem kontrole hem de soğuğa göre ciddi bir artış gösterdi. Karnitin uygulamasında ise kontrol grubuna göre önemli bir artış göstererek sitokrom yolu hızının 153 nmol O₂ olduğu kaydedildi (Şekil 4.12).

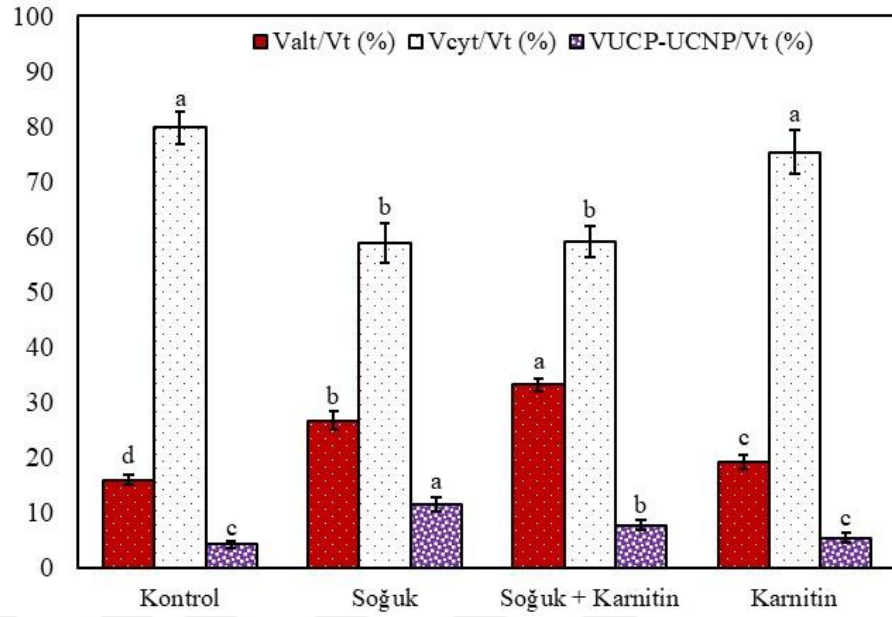
Alternatif solunum hızı kontrol grubunda 19 nmol O₂ olarak belirlendi. Soğuk grubunda ise bu hızın kontrole göre yaklaşık 3 katı, yani 57 nmol O₂ olduğu belirlendi. S+ K grubunda kontrol ve soğuk grubuna kıyasla, istatistiki olarak önemli derecede ($p<0.05$) artışla 120 nmol O₂ olduğu kaydedildi. Yine Karnitin grubunda kontrole kıyasla 39 nmol O₂ değeri ile bu yolun yaklaşık 2 kat daha fazla aktifleştigi belirlendi. Eşleşme önleyici proteinik ve non-proteinik faktörlerin hızı ($V_{UCP/UCNP}$) kontrol uygulamasında 5 nmol O₂ olarak ölçüldü, oysa soğuk uygulanan mısır bitkilerinde bu değerin yaklaşık 4 kat artışla 22 nmol O₂ olduğu kaydedildi. S+K grubunda bu değerin kontrol ve soğuk grubuna

kıyasla önemli derecede artış göstererek 28 nmol O₂ olduğu, Karnitin grubunda ise yine kontrole göre yaklaşık 2 katı kadar bir artış (11 nmol O₂) olduğu belirlendi (Şekil 4.12).

Valt/Vt (%) değeri kontrolde %15,97 iken, soğuk grubunda yaklaşık 2 kat daha fazla olacak şekilde bu oranın %26,69, yine kontrole kıyasla söz konusu oranın S+K grubunda %33,15, K grubunda ise %19,21 olduğu belirlendi. Vcyt/Vt (%) değeri, kontrolde %79,83 olarak belirlenmiş olup, bu değer soğuk uygulamasında %58,85, S+K grubunda soğuk grubundakine yaklaşık olacak şekilde %59,12, Karnitin grubunda %75,37 olarak belirlendi. V_{UCP-UCNP}/Vt değerinin kontrol bitkilerinde %4,20 iken, bu değer soğuk grubunda %11,46, S+K grubunda, soğuk grubuna kıyasla daha düşük olacak şekilde %7,73, Karnitin grubunda ise kontrole kıyasla %5,42 olduğu belirlendi (Şekil 4.13).



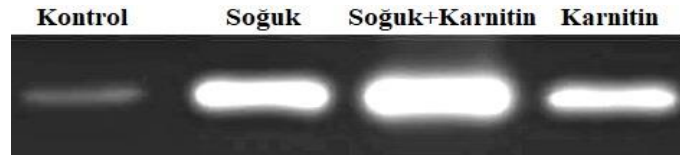
Şekil 4.12. Mısır bitkilerinde Vt, Vcyt, Valt ve V_{UCP-UCNP} değerleri üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri



Şekil 4.13. Mısır bitkilerinde Valt/Vt (%), Vcyt/Vt(%) ve VUCP-UCNP/Vt (%) değerleri üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

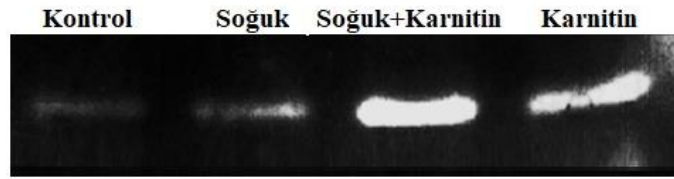
4.8. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının AOX ve COX Proteinlerinin İfadeleri Üzerine Etkileri

Mısır bitkilerinden saflaştırılan mitokondrilerinde AOX protein ifade düzeyleri araştırılmış ve aşağıdaki resimde görüldüğü gibi kontrol grubuna kıyasla soğuk uygulaması ile AOX proteinin ifadesinde belirgin bir artış olduğu belirlenmiştir. S+K uygulaması ile hem kontrole hem de soğuğa kıyasla ciddi bir artış gözlenirken, Karnitin uygulanan bitkilerde de kontrole göre önemli bir artış belirlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Mısır bitkilerinde AOX proteinin ifadesi üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

Mısır bitkilerinin saflaştırılan mitokondrilerinden bakılan COX proteini ifadesinde aşağıda yer alan görselde görüldüğü gibi kontrol grubuna kıyasla soğuk uygulaması ile COX proteininin ifadesinde artış gözlenmiştir. S+K uygulaması ile hem kontrole hem de soğuğa kıyasla ciddi bir artış gözlenirken, Karnitin uygulanan bitkilerde ise kontrole göre önemli bir artış belirlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Mısır bitkilerinde COX proteininin ifadesi üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

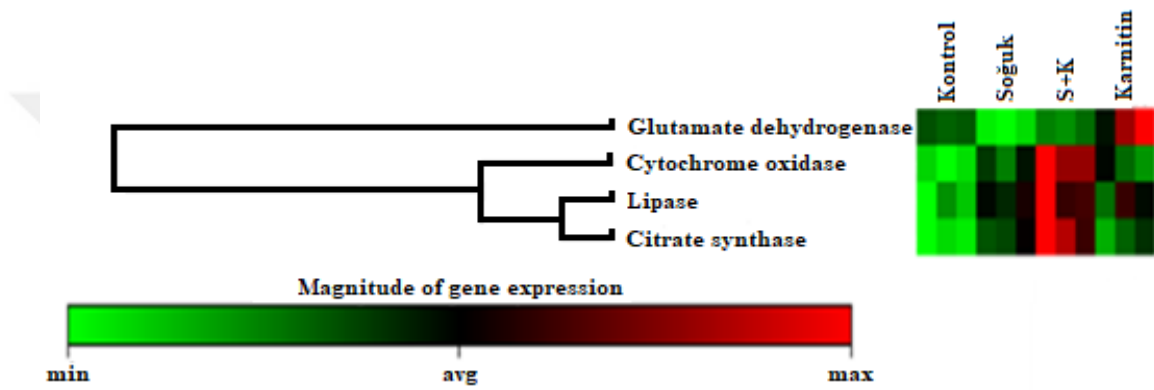
4.9. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının AOX, COX, Lipaz, NADH-GDH ve CS Gen İfadeleri Üzerine Etkileri

Bu enzimleri kodlayan genlerin ifade düzeyleri Real-Time PCR ile belirlendi. AOX ve AOX precursor için çalışılan referans gen 18S rRNA iken, COX, Lipaz, NADH-GDH ve CS için çalışılan referans gen β -actin olduğundan clustergramlar ayrı olarak verilmiştir. Aşağıda yer alan clustergramda görüldüğü üzere (Şekil 4.17), AOX1 ve AOX precursor enzimlerinin gen ifadelerinde kontrol bitkilerine göre soğuk grubunda önemli bir artış belirlenirken, bu artış S+K uygulaması ile daha da dikkate değer bir artış göstermiştir. Karnitin uygulamasında ise, kontrole kıyasla her iki enziminde gen ifadesinde artış belirlenmiş olup bu artışlar aktiviteler ile benzerlik göstermektedir.

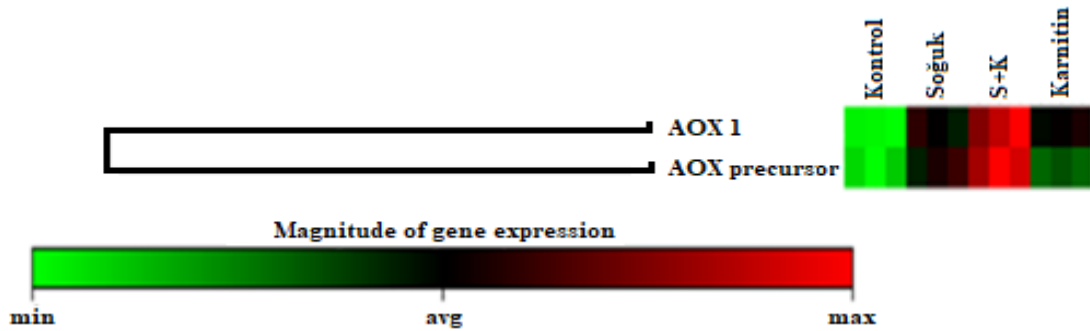
Şekil 4.16'da görüldüğü üzere COX, Lipaz ve CS enzimlerinin gen ifadelerinde kontrol bitkilerine oranla soğuk grubunda önemli bir artış belirlendi. S+K uygulaması ile soğuğa kıyasla COX, Lipaz ve CS enzimlerinin gen ifadelerinde dikkate değer bir artış kaydedildi. Karnitin uygulaması ile kontrole kıyasla COX, Lipaz ve CS enzimlerinin gen ifadelerinde önemli bir artış belirlendi. Bu genlerin aksine GDH enziminin gen ekspresyonunda kontrole göre bir azalış kaydedilirken, S+K uygulaması ile soğuğa göre

artış, kontrole göre ise azalış olduğu kaydedildi. Karnitin uygulamasında ise kontrole göre bu genin ekspresyon seviyesinde önemli bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.16).

Bu enzimlerin gen ifadelerinde soğuk ve karnitin uygulamaları ile meydana gelen azalış ve artışlar, bu enzimlerin aktivitelerindeki meydana gelen değişimlerle paralelik göstermektedir.



Şekil 4.16. Mısır bitkilerinde lipaz, sitrat sentaz, glutamat dehidrogenaz ve sitokrom oksidaz proteinlerinin gen ekspresyonları üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkisinin clustergram ile ifadesi

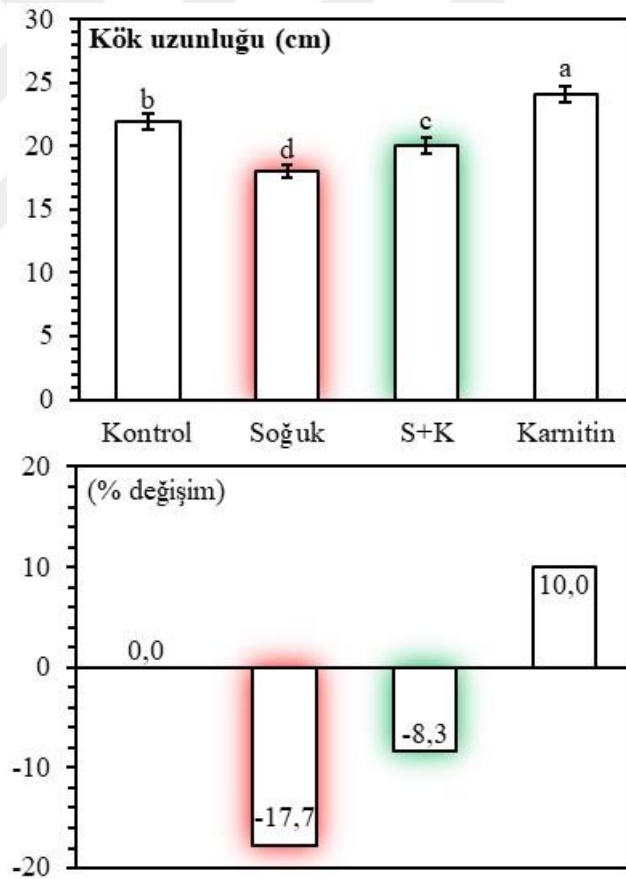


Şekil 4.17. Mısır bitkilerinde AOX1 ve AOX precursor proteinlerinin gen ekspresyonları üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkisinin clustergram ile ifadesi

4.10. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Kök Uzunluğu Üzerine Etkileri

Kontrol bitkilerinde de ortalama kök uzunluğu 21,89 cm olarak ölçülürken, soğuk uygulamasında %17,7'lik bir azalma ile 18,01 cm olarak ölçüldü. S+K uygulamasında ise ortalama kök uzunluğu 20,07 cm olarak ölçüldü ve kontrole kıyasla %8,3 oranında azalma olduğu belirlendi. Soğuk uygulanmayan Karnitin uygulamasında ortalama kök uzunluğu kontrole kıyasla %10 oranında artış sağlayarak 24,07 cm olduğu kaydedildi.

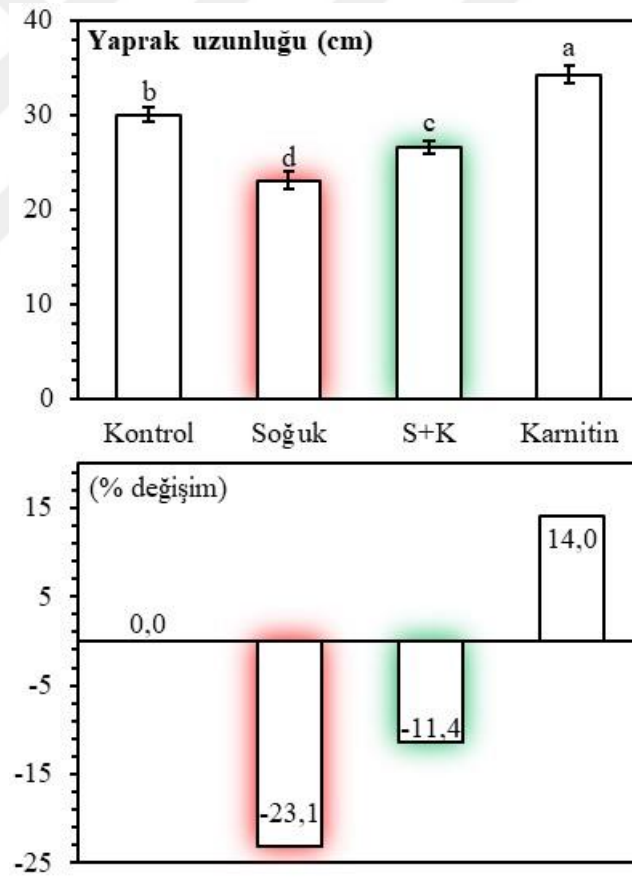
Bu bulgular, karnitinin mısır bitkilerinin kök uzunluğu üzerine normal ve stresli şartlar altında uyarıcı bir etkiye sahip olduğunu gösterdi (Şekil 4.18).



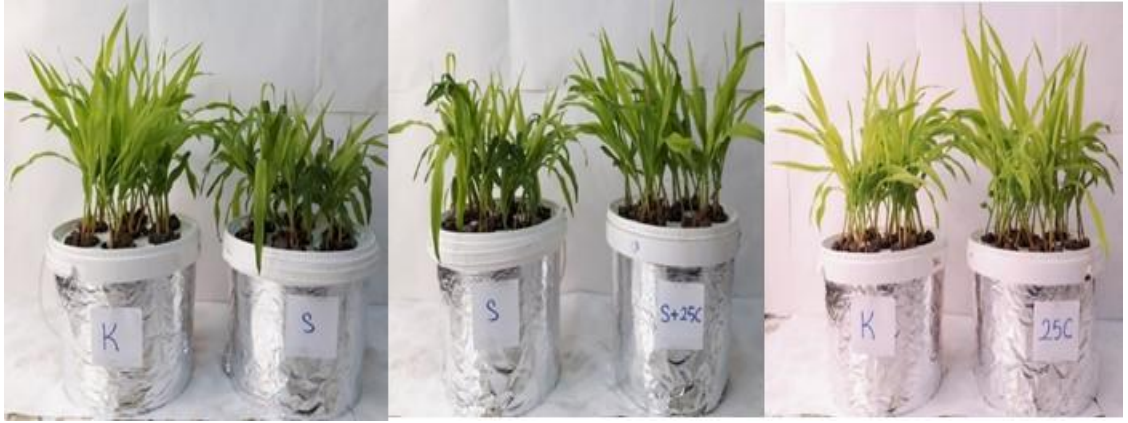
Şekil 4.18. Mısır bitkilerinde kök uzunluğu ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

4.11. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Yaprak Uzunluğu Üzerine Etkileri

Kontrol bitkilerinde ortalama yaprak uzunluğu 30,07 cm olarak ölçülürken, soğuk uygulamasında %23,1 oranında azalışla 23,11 cm olarak belirlendi. S+K uygulanan bitkilerin ortalama yaprak uzunlukları kontrol uygulamasına kıyasla %11,4 oranında azalış göstererek 26,63 cm olduğu belirlendi. Öte yandan Karnitin uygulamasında ortalama yaprak uzunluğunun kontrol bitkisine kıyasla %14 oranında artışla 34,28 cm olduğu tespit edildi. Sonuç olarak, karnitin uygulamalarının mısır bitkilerinin yaprak uzunluğu üzerine de belirgin bir uyarıcı etkiye sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Mısır bitkisinde yaprak uzunluğu ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

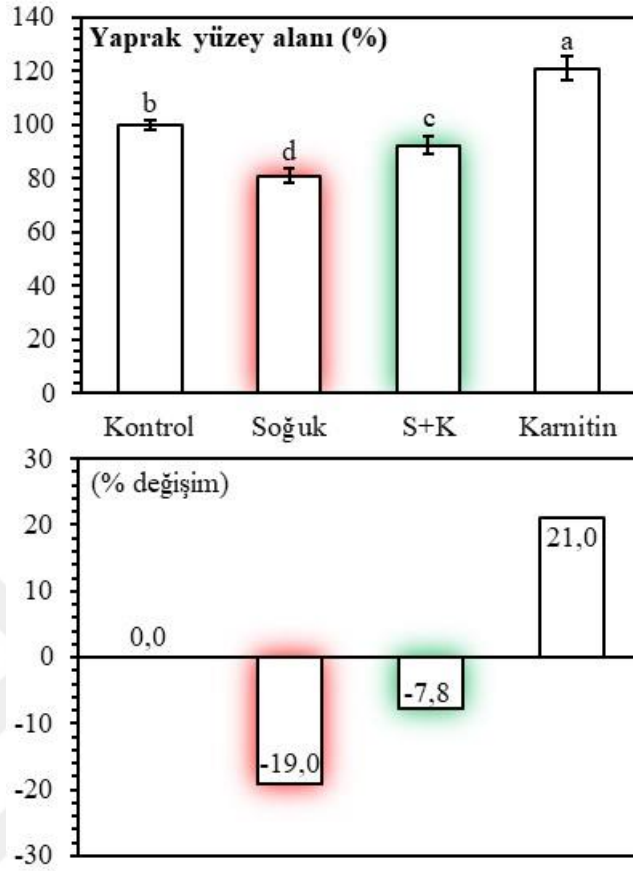


Şekil 4.20. 12 günlük mısır bitkilerinin genel görünümü

4.12. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Yaprak Yüzey Alanı Üzerine Etkileri

Bir stres indikatörü olan yaprak yüzey alanları ölçülerek, kontrol bitkilerinin yaprak alanı %100 olarak kabul edildi ve müteakiben diğer gruplardan alınan değerler kontrolle kıyaslandı.

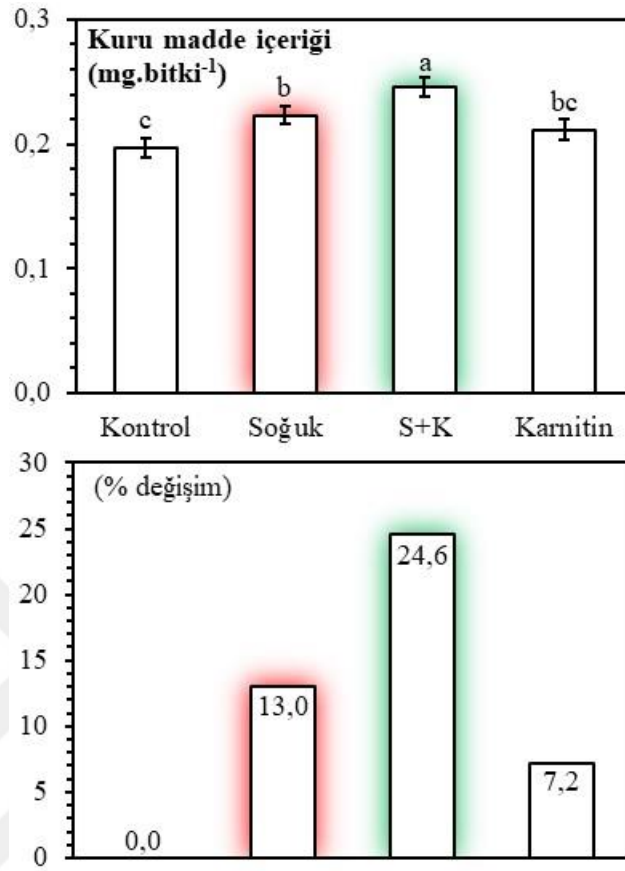
Yapılan ölçümler ve hesaplamalar sonucunda, soğuk uygulamasının kontrol bitkilerine kıyasla yaprak yüzey alanında %19'luk (81 birim), S+K uygulamasında ise %7,8'lik (92,2 birim) bir düşüşe yol açtığı saptandı. Kontrol bitkilerine kıyasla Karnitin uygulanan bitkilerin yapraklarında ise, bu değer %21 oranında artışla 121 birim olduğu kaydedildi (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Mısır bitkilerinde yaprak yüzey alanı ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

4.13. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Toplam Kuru Madde İçeriği Üzerine Etkileri

Mevcut araştırmada toplam kuru madde içeriği bir bitki başına düşen mg madde olacak şekilde hesaplandı. Kontrol grubunda kuru madde içeriği 0,1974 mg olarak belirlenirken, soğuk uygulaması ile bu değerin %13 artışla 0,223 mg olduğu belirlendi. S+K uygulamasında kontrol grubuna kıyasla %24,6'lık artışla, 0,246 mg değerinde olduğu kaydedildi. Karnitin uygulamasında kuru madde içeriği kontrol bitkisine kıyasla %7,2 oranında artış gösterdiği ve 0,2116 mg değerinde olduğu kaydedildi (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Mısır bitkilerinde kuru madde içeriği ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

4.14. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Yağ Asidi Profili Üzerine Etkileri

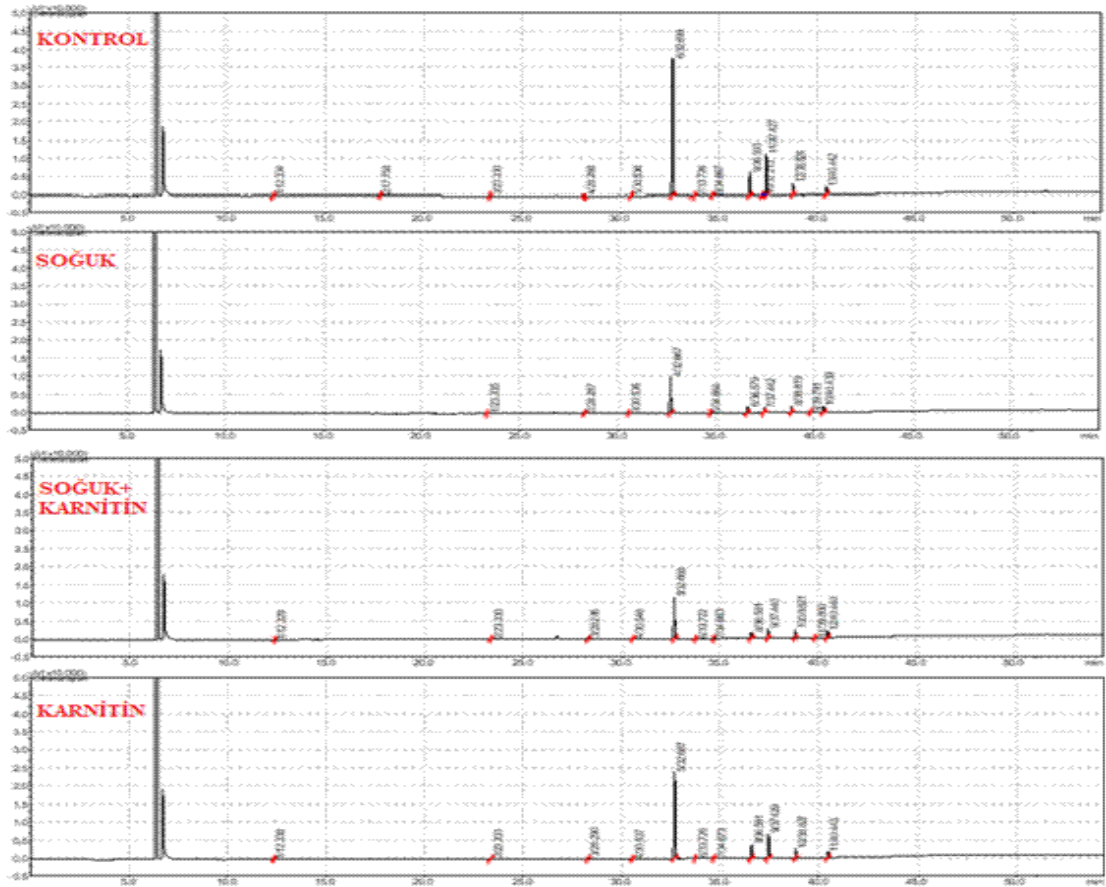
Yapılan analiz sonucunda kontrol grubuna göre soğuk stresi uygulaması bitkilerde doymuş yağ asitlerinde genel bir azalmaya neden olurken, doymamış yağ asitlerinin miktarını önemli oranda artırmıştır. Karnitin ise soğuk kaynaklı olan doymuş yağ asidi kompozisyonunun doymamış yağ asitlerine doğru değişmesini artırdığı ve böylece düşük sıcaklıklara karşı membranların daha kararlı hale gelmesine sebebiyet vermiştir. Tek başına uygulanan karnitin uygulamasının da kontrol bitkilerine kıyasla özellikle doymamış yağ asitlerinin içeriğinde artış sağlamıştır (Çizelge 4.1).

Aşağıda tabloda verilen doymuş ve doymamış yağ asitlerinin haricinde membran yapısına katılan diğer yağ asitlerinin içeriğine de bakılmış olup %1'lik değerin altında olduklarından tabloda yer verilmemiştir.

Çizelge 4.1. Ayrı ayrı ve kombine olarak uygulanan karnitin ve soğuk uygulamalarının mısır fidelerinin yaprak lipid kompozisyonları üzerine etkileri.

	<i>Doymuş yağ asitleri</i>			<i>Doymamış yağ asitleri</i>		
	<i>Palmitik asit</i>	<i>Stearik asit</i>	<i>Miyristik asit</i>	<i>Oleik asit</i>	<i>Linoleik asit</i>	<i>Eikosenoik asit</i>
Kontrol	62,03±1,45a	9,5±0,18a	1,54±0,40a	7,82±0,70c	4,82±0,28c	3,17±0,18c
Soğuk	58,52±0,53b	9,95±0,48a	1,28±0,32bc	17,85±1,31a	11,14±0,31a	10,82±0,67a
Soğuk + Karnitin	55,03±0,92c	7,54±0,30b	1,19±0,46c	18,72±0,71a	12,20±0,54a	9,60±0,33a
Karnitin	60,12±0,99ab	9,65±0,40a	1,40±0,46b	13,39±0,52b	6,24±0,38b	4,59±0,27b

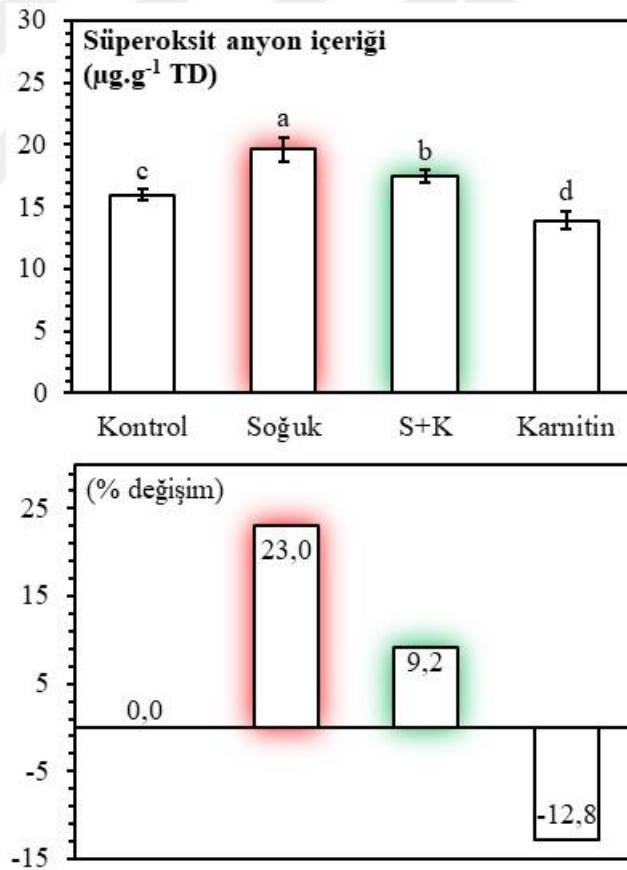
Değerler % olarak ifade edilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları belirtmektedir ($p<0.05$).



Şekil 4.23. Uygulama gruplarında yağ asidi profilini gösteren kromatogram

4.15. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Süperoksit Anyon ($O_2^{\cdot-}$) İçeriği Üzerine Etkileri

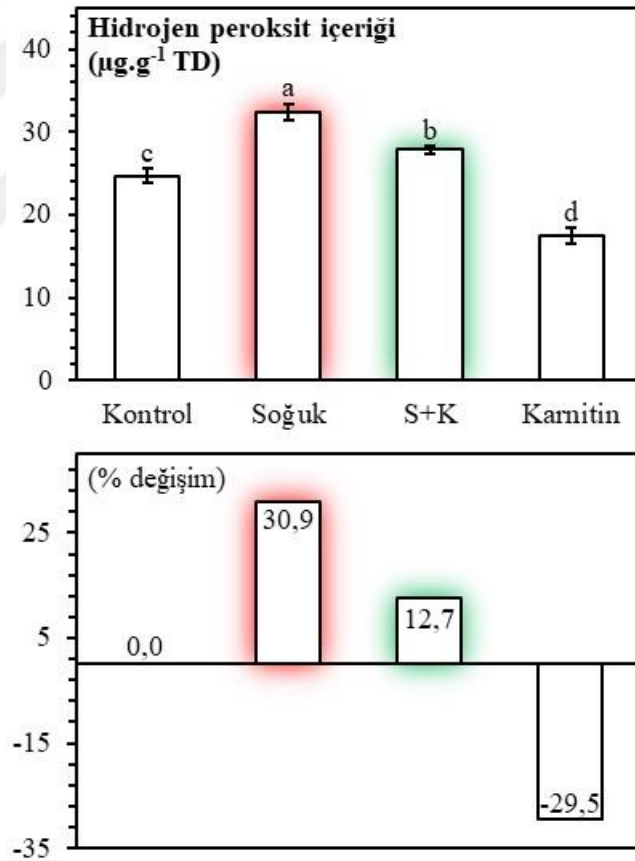
Kontrollü ve stresli şartlar altında mısır bitkilerinin yapraklarında biriken ROT miktarındaki soğuk ve/veya karnitin tarafından neden olunan değişimleri belirlemek için ilk olarak $O_2^{\cdot-}$ anyon içeriği belirlendi. Kontrol grubu bitkilerinde $15,95 \mu\text{g.g}^{-1}$ olarak ölçülen $O_2^{\cdot-}$ anyon içeriğinin soğuk uygulama grubunda %23'lük artışla $19,62 \mu\text{g.g}^{-1}$ olduğu kaydedildi. Kontrol grubuna kıyasla, S+K grubunda %9,2'lik bir artışla söz konusu değerin $17,42 \mu\text{g.g}^{-1}$ olduğu belirlendi. Soğuk uygulanmayan Karnitin grubunda ise, kontrole nispeten süperoksit içeriği %12,8'lik bir azalışla $13,91 \mu\text{g.g}^{-1}$ olduğu saptandı (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Mısır bitkilerinde $O_2^{\cdot-}$ içeriği ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

4.16. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının H_2O_2 İçeriği Üzerine Etkileri

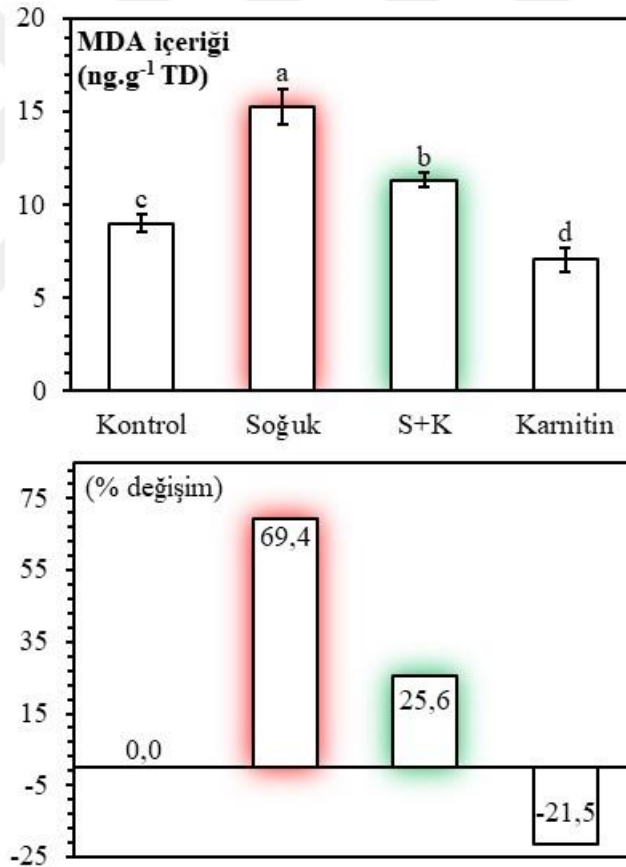
$O_2^{\cdot-}$ anyon içeriğinin yanı sıra, H_2O_2 miktarı da ölçülmek suretiyle mısır bitkilerinin yapraklarında biriken ROT miktarındaki soğuk ve/veya karnitin indüklü değişimler tespit edildi. Mısır bitkisinin kontrol grubunda H_2O_2 içeriği $24,74 \mu g.g^{-1}$ olarak bulunmuşken, soğuk grubunda %30,9 oranında artışla, bu değerin $32,38 \mu g.g^{-1}$ 'e yükseldiği belirlendi. Kontrol bitkilerine göre S+K grubunda H_2O_2 içeriğinin, soğuk grubuna kıyasla daha düşük olacak şekilde, %12,7'lik bir artış göstererek $27,89 \mu g.g^{-1}$ olduğu belirlendi. Kontrol bitkilerine kıyasla Karnitin uygulamasında ise, H_2O_2 içeriğinin %29,5'lik bir azalışla $17,43 \mu g.g^{-1}$, olduğu kaydedildi (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Mısır bitkilerinde H_2O_2 içeriği ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

4.17. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının MDA İçeriği Üzerine Etkileri

Kontrollü ve stresli şartlar altında yetiştirilen mısır bitkilerinin yapraklarında meydana gelen membran hasarlarını belirlemek için lipid peroksidasyonunun önemli bir indikatörü olan MDA içerikleri ölçüldü. Kontrol grubunda MDA içeriği $9,014 \text{ ng.g}^{-1}$ iken soğuk uygulamasında bu değerin %69,4 oranında artışla $15,268 \text{ ng.g}^{-1}$ olduğu kaydedildi. Kontrol uygulamasına kıyasla MDA içeriğinde, S+K grubunda %25,6 artışla $11,325 \text{ ng.g}^{-1}$ olduğu belirlendi. Kontrole oranla Karnitin grubunda ise MDA içeriğinin %21,5 azalışla $7,08 \text{ ng.g}^{-1}$ olduğu tespit edildi (Şekil 4.26).



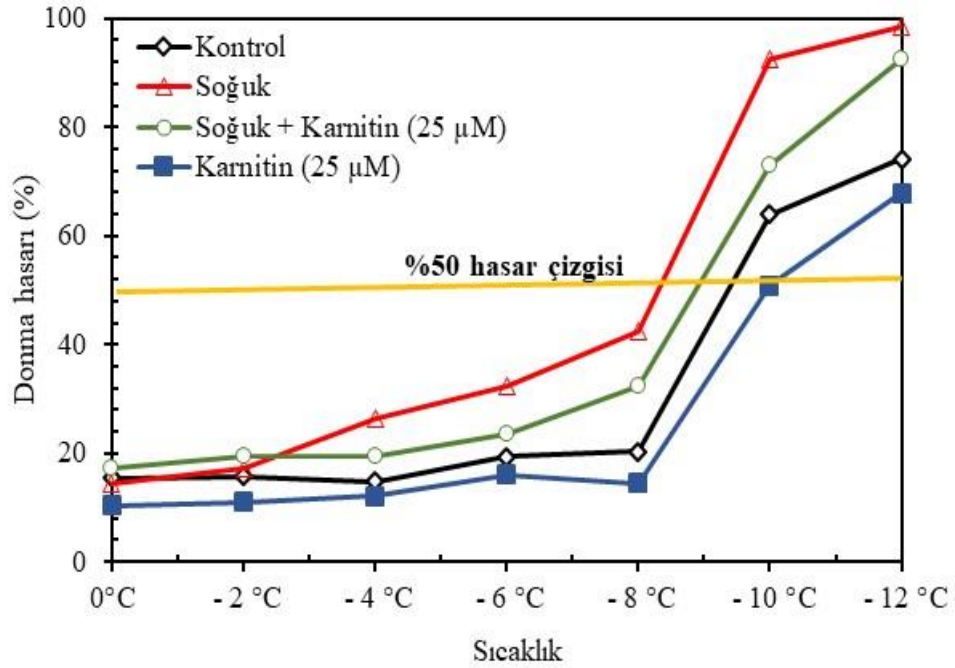
Şekil 4.26. Mısır bitkilerinde MDA içeriği ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

4.18. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının İyon İletkenliği ve % Donma Hasarı Üzerine Etkileri

MDA içeriğinin yanı sıra, yapraklarda meydana gelen hasar miktarını belirlemek ve soğuk ve/veya karnitin uygulamalarının membran hasarı üzerine etkilerini değerlendirebilmek için iyon iletkenliği ve % donma hasarı oranları da belirlendi. Kontrol grubuna kıyasla soğuk grubunda -8°C 'den sonra %50'lere ulaşan donma hasarının, S+K uygulaması ile %32,23 değerine indirgenerek donma noktasının geciktirildiği, Karnitin uygulaması ile de kontrole kıyasla donma hasarının %20,26'dan %14,50'lere düşürerek istatistiki olarak önemli ölçüde azaltıldığı belirlendi (Şekil 4.27 ve Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Soğuk ve karnitin uygulamalarının mısır bitkisinde iyon iletkenliği üzerine etkileri

Uygulamalar	İyon iletkenliği ($\mu\text{S}/\text{cm}$)						
	0°C	$- 2^{\circ}\text{C}$	$- 4^{\circ}\text{C}$	$- 6^{\circ}\text{C}$	$- 8^{\circ}\text{C}$	$- 10^{\circ}\text{C}$	$- 12^{\circ}\text{C}$
Kontrol	72 $\pm$ 5,8	74 $\pm$ 7,5	69 $\pm$ 3,6	90 $\pm$ 6,6	94 $\pm$ 10,7	298 $\pm$ 33	346 $\pm$ 17
Soğuk	67 $\pm$ 6,6	80 $\pm$ 9,6	122 $\pm$ 15,9	151 $\pm$ 15,6	198 $\pm$ 15,6	431 $\pm$ 45	459 $\pm$ 38
Soğuk + Karnitin	80 $\pm$ 5,3	91 $\pm$ 11,8	91 $\pm$ 4,4	109 $\pm$ 9,6	150 $\pm$ 7,7	339 $\pm$ 22	432 $\pm$ 21
Karnitin	49 $\pm$ 8,5	51 $\pm$ 5,3	56 $\pm$ 8,2	75 $\pm$ 11,5	68 $\pm$ 9,9	236 $\pm$ 18	317 $\pm$ 12

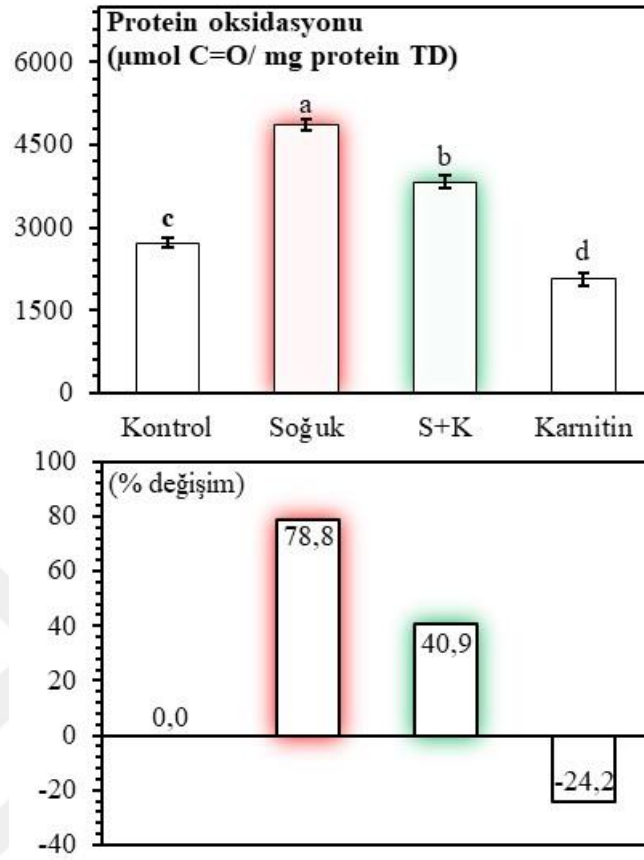


Şekil 4.27. Mısır bitkilerinde % donma hasarı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

4.19. Soğuk ve Eksojen Karnitin Uygulamalarının Protein Oksidasyonu Üzerine Etkileri

Kontrollü ve stresli şartlar altında proteinlerin yapısında meydana gelen bozunmayı belirlemek için karnitin uygulaması yapılan ve yapılmayan mısır bitkilerinin yapraklarında protein oksidasyon seviyeleri belirlendi.

Protein oksidasyonu sonucu oluşan karbonil içeriği kontrol bitkilerinde $2716 \mu\text{mol.mg}^{-1}$ iken soğuk grubunda bu değerin %78,8'lik artışla $4856 \mu\text{mol.mg}^{-1}$ olduğu kaydedildi. Kontrol uygulamasına kıyasla karbonil içeriğinde, S+K grubunda, soğuk grubuna nispeten daha düşük olmak kaydıyla, %40,9'luk bir artışla $3827 \mu\text{mol.mg}^{-1}$ olduğu saptandı. Kontrole kıyasla Karnitin uygulama grubunda ise; karbonil içeriğinin %24,2 azalışla $2058 \mu\text{mol.mg}^{-1}$ değerinde olduğu tespit edildi (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Mısır bitkilerinde protein oksidasyonu ve % değişim oranı üzerine soğuk ve karnitin uygulamalarının etkileri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tüm canlı organizmalarda olduğu gibi, bitkilerde de büyüme ve gelişmenin devamlılığı ve metabolik faaliyetlerin sürdürülebilmesi için solunum reaksiyonları hayati önem arz etmektedir. Metabolik faaliyetler için gerek duyulan enerjiyi sağlamasının yanı sıra, çok sayıda biyosentez reaksiyonu için gerekli olan karbon iskeletlerinin de bu reaksiyonlar esnasında üretiliyor olması, solunumu tüm hücrel faaliyetlerin bir kavşak noktası haline getirmektedir. Dolayısıyla solunum hızında meydana gelebilecek en ufak dalgalanmalar bile üretilen enerji, ara metabolitler ve indirgen madde miktarlarını doğrudan etkileyeceğinden, büyüme ve gelişme hızının düzenlenmesinden savunma stratejilerinin geliştirilmesine kadar farklı metabolik yolların modülasyonu solunum reaksiyonları ile güçlü bir koordinasyon halinde yürütülmektedir (Vanlerberghe *et al.* 2009; Akhmedov *et al.* 2010; Sharkey 2012).

Çok değişken özelliklere sahip olan bitki solunumu, hücredeki substrat miktarı ve ihtiyaç duyulan enerji miktarı gibi bir takım içsel etmenlere bağlı olmakla birlikte; sürekli değişim halinde olan çevresel faktörlere karşı da çok hızlı cevaplar geliştirmek suretiyle hücrelerde cereyan eden metabolik faaliyetlerin hızını ve yönünü düzenleyerek hücrel olayları kontrol altında tutma özelliğine sahiptir (Atkin and Tjoelker 2003; Atkin *et al.* 2005; Sharkey 2012). Çevresel stres faktörleri, bitkilerde büyüme ve gelişmeye odaklı metabolizmalar ile savunma ve adaptasyonuna yönelik farklı stratejilerin yeniden düzenlenmesine yol açtığından, stres koşullarına maruz kalan bitkilerde solunum metabolizmasının etkinliği ve önemi çok daha büyük bir önem arz etmektedir. Bu bağlamda, başta düşük sıcaklıklar olmak üzere bitki gelişimi ve verimliliğini sınırlandıran olumsuz çevre koşullarına maruz kalan bitkilerin solunum metabolizmalarının modülasyonu, bir taraftan savunma sistemlerinin aktivasyonunu sağlamanın yanı sıra, diğer taraftan da tüm olumsuzluklara rağmen bitki büyüme ve gelişmesinin de teşvik edilmesine katkı sağlayabilir (Baena-Gonzalez and Sheen 2008; Sharkey 2012).

Bitkilerde özellikle düşük sıcaklık stresi söz konusu olduğunda, solunumun tüm alternatif yolları da dikkate alınarak, düşük sıcaklığa direnç sağlanabilmesi yolunda hücrel

solunumun regülasyonu üzerine bir savunma stratejisinin oluşturulması çok daha işe yarar ve uygulanabilir bir çare olabilir. Nitekim son yıllarda alternatif solunum yollarının aktivasyonuna dayalı çalışmalar neticesinde, düşük sıcaklığa karşı bitki dirençlerinde belirli bir dereceye kadar artış sağlanabildiği rapor edilmiştir (Finnegan *et al.* 2004; Matos *et al.* 2007; Erdal *et al.* 2015). Ancak bilinmektedir ki, tek başına alternatif solunumun aktive edilmesi, ATP üretiminde önemli bir azalma meydana getirdiği için, özellikle biyosentez reaksiyonları başta olmak üzere çok sayıda metabolik yolun da sekteye uğramasına yol açmaktadır (Borecky and Vercesi 2005). Ayrıca, gerek alternatif solunum yolunun aktivasyonu, gerekse stres nedeniyle oluşan mitokondriyal hasarlar neticesinde ATP üretiminde meydana gelen azalmaya ilaveten, strese karşı koyabilmek için, savunmaya yönelik bileşiklerin üretimi için de ciddi oranlarda enerji harcanması, stres şartları altındaki bitkilerde enerji kıtlığı oluşmasına ve nihayetinde büyüme ve gelişmesinin inhibisyonuna neden olur. Dahası, düşük sıcaklıklar fotosentez verimliliğini de önemli oranda düşürdüğünden, solunum için ciddi bir substrat sıkıntısı da ortaya çıkar (Huner *et al.* 1993; Atkin and Tjoelker 2003; Atkin *et al.* 2005). Hücrenel solunumda yaşanan düşük sıcaklık kaynaklı tüm bu problemler ve baş gösteren enerji kıtlığı sorununun çözülebilmesi, şekerlere ilave olarak, farklı substratların solunuma dâhil edilmesiyle en azından belirli bir dereceye kadar mümkün gözükmektedir. Bu bilgilerden yola çıkarak, hücrenin önemli bileşenlerinden olan lipidlerin krebsin başlangıç aşamasından itibaren solunuma dâhil oldukları göz önüne alındığında, depo formundaki lipidlerin solunuma dâhil olmalarının teşvik edilmesiyle, solunuma önemli bir ilave substrat kazandırılmış olacağı, yine lipidlerin krebs, ETS ve diğer yan yolların ekstra-aktivasyonu ile düşük sıcaklık stresine maruz kalan bitkilerde, enerji üretimi yetersizliğinin ortadan kaldırılabilceği ve enerji dengesinin büyüme ve gelişme lehine değiştirilebileceği kanaatini taşımaktayız. Ayrıca lipidlerin solunuma dahil edilmesinin daha fazla teşvik edilmesi halinde, söz konusu yan yollardan biri olan alternatif solunum yolunun normalden daha fazla aktif hale geçeceğine, potansiyel enerjinin bir kısmı hücrede ısı enerjisine dönüşürken, geri kalan kısmının ise ATP enerjisine dönüşeceğine ve böylelikle, bitki için gerekli olan hem biyosentez olaylarının, enerji ve yapıtaşlarının ortamda sürekli ve yeterli olmasından dolayı, sekteye uğramaksızın devam edebileceğine, hem de oluşan ısı sayesinde, bitkinin maruz kaldığı düşük sıcaklığın hücrelerde neden olduğu fiziksel bozulma (membranların katı-jel durumuna geçmesi, yırtılması gibi) ve

enzimlerin aktivitelerinde yol açtığı azalma gibi olumsuzlukların azaltılabileceğini düşünmekteyiz.

Bu varsayımdan hareketle mevcut araştırmada, lipid metabolizmasında çok önemli role sahip olan karnitin adı verilen bileşiğin, mısır bitkisinin hem büyüme ve gelişmesi hem de soğuğa direnci üzerine etkileri araştırılmıştır. Lizin ve metiyonin aminoasitlerinden sentezlenen ve hidrofilik dördü amin grubu olan karnitin hücredeki temel görevi, sitoplazmadaki uzun zincirli yağ asitlerinin β -oksidasyon olayı için mitokondriye taşınmasını sağlamaktır. Bunun yanı sıra, karnitin matriks ve sitosol arasındaki CoA havuzunun dengesinin sürekliliğinin sağlanmasından, peroksizomlarda meydana gelen β -oksidasyon ürünlerinin mitokondriye taşınmasına, az da olsa kısa ve orta zincirli yağ asitlerinin matrikse taşınmasından, osmoprotektan olarak rol oynamaya kadar metabolizmada birçok farklı görevler de üstlenmektedir (Sharma and Black 2009; Çebi 2014; Çancıoğlu 2014; Longo *et al.* 2016).

Bu araştırmada, karnitinin gerek normal koşullar altında büyütülen, gerekse düşük sıcaklık stresine maruz kalan mısır bitkilerinde lipid metabolizması ve hücre solunum üzerine etkilerini belirlemek amacıyla, hücrelerde lipid katabolizması reaksiyonlarının ilk basamağını teşkil eden ve trigliseridlerin yağ asitlerine degradasyonunu katalizleyen lipaz aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Karnitin uygulanan bitkilerin yapraklarındaki lipaz aktivitesinde, kontrol bitkilerine kıyasla %75'e varan artışlar belirlendi (Şekil 4.1). Lipaz aktivitesinin yaklaşık olarak iki katına kadar artmış olması, karnitin, bitkilerde lipid katabolizması üzerine net bir etkiye sahip olduğunu açıkça gösterir niteliktedir. Soğuk stresine maruz kalan bitkilerde ise karnitin uygulanan bitkilerden daha yüksek oranda (%84) artış belirlenmesi, soğuk stresine maruz kalan bitkilerde de lipid katabolizmasının hızlandığına işaret etmektedir. Soğukla birlikte karnitin uygulanan bitkilerde ise %228'e varan artışın meydana gelmesi, karnitin soğuk stresi altında lipaz aktivitesini çok daha yüksek oranda artırdığını göstermektedir. Ancak lipaz aktivitesindeki bu artışlar, lipidlerin süratle parçalandığı ve yağ asitlerine dönüştürüldüğü anlamına gelmekte olup, bu artışların lipidlerin solunuma girmesini teşvik etmek amacıyla mı, yoksa hücre yapılarının bozulmasından dolayı mı kaynaklandığının belirlenmesi gerekmektedir.

Çünkü lipaz aktivitesi, sadece yağ asitlerinin solunuma girebilmeleri için değil, aynı zamanda membran lipid metabolizmasında da önemli role sahiptir ki; artan lipaz aktivitesine bağlı olarak membranların permeabilitesi ile birlikte peroksidasyonları ve degradasyonları da artış gösterir. Yapılmış olan bir çalışmada yeni doğan ratların ilk 20 saatlik sürecinde soğuk stresine maruz bırakılması sonucunda kahverengi adipoz dokudaki lipaz enziminin mRNA seviyesinin soğukla %250 oranında indüklendiği rapor edilmiş (Obregon *et al.* 1989), yine ratlarla yapılmış olan başka bir çalışmada aç bırakılıp soğuğa maruz bırakılan ratlarda %24, glukozla beslenerek soğuğa maruz bırakılan ratlarda ise %107 oranında bu enzimin aktivitesinde artış kaydedilmiştir (Rogers and Robinson 1974). Literatürde bitkilerde lipaz aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalara bakılacak olunursa, düşük sıcaklıklarda depo edilen armutlarda, lipaz aktivitesi ve gen ekspresyonunda artış belirlenmişken (Shi *et al.* 2018), aksine düşük sıcaklıkta depolama süresince çam fıstığının (Cai *et al.* 2017), bambunun (Song *et al.* 2013) ve domatesin (Kmiecik and Lisiewska 2000) lipaz aktivitelerinde önemli düşüşler meydana geldiği ve azalan lipaz aktiviteleri sayesinde, bu ürünlerin yaşlanma (olgunlaşma) süreçlerinin de yavaşladığı rapor edilmiştir. Öte yandan kadmiyum stresine maruz kalan kolza bitkilerinin tohum çimlenmesi ve fide büyümesi aşamalarında, artan kadmiyum stresi ile birlikte lipaz aktivitesinin de azaldığı rapor edilmiştir (Meng *et al.* 2009). Ayrıca lipazın bitkilerde olgunluktan senesense geçişle de ilgili olduğu bildirilmiştir (Shi *et al.* 2018). Bitkilerde düşük sıcaklığın lipaz aktivitesi üzerine etkileri ile ilgili yapılan araştırmalar oldukça sınırlı olup, yapılan araştırmalar, yukarıda verilen örneklerde olduğu gibi, ekseriyetle bitkilerin depolanan meyveleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Düşük sıcaklıklarda tutulan meyvelerde görülen lipaz aktivitesindeki değişimlerin, direnç ile alakalı değil de, sadece olgunlaşma veya çürüme olaylarıyla alakalı olabileceğini, dolayısıyla bizim sonuçlarımızla kıyaslamamızın pek doğru olmayacağı kanaatindeyiz. Bağlantılı olarak, kadmiyum stresi uygulanan kolza fidelerinde lipaz aktivitesinin azaldığı belirlenmiş olmasına karşın, bir ağır metal olan kadmiyumun bitkilerde zehir etkisi yapması ve enzim aktiviteleri üzerinde genel bir inhibisyon etkisi göstermesi dikkate alındığında, lipaz aktivitesini düşürmüş olmasının beklenen bir sonuç olduğu söylenebilir. Bu sebeple, bu araştırmadan elde edilen lipaz aktivitesiyle ilgili bulguyu, kendi sonuçlarımızla mukayese edebilmek uygun gözükmemektedir.

Artan lipaz aktivitesini doğru bir şekilde yorumlayabilmek için mevcut araştırmada mısır bitkilerinin yapraklarındaki total lipid seviyeleri de belirlendi. Şekil 4.2’de görüldüğü gibi, kontrol bitkilerinde %1,12 olan total lipid oranı, kontrole kıyasla soğuk uygulanan bitkilerde ortalama %20’lik düşüş (%0,89), karnitin uygulanan bitkilerde %21’lik düşüş (%88), soğuk+karnitin uygulanan bitkilerde ise %56’ya varan düşüş (%0,49) gösterdi. Bu sonuçlar, ayrı ayrı soğuk ve karnitin uygulanan bitkilerde total lipid içeriklerinde önemli azalmaların meydana geldiğini, bu azalmanın, soğuk+karnitin uygulanan bitkilerde ise kontrole kıyasla daha fazla olduğunu ortaya çıkarmıştır. Lipidleri parçalayarak yağ asiti oluşumunu katalizleyen lipaz enzimi aktivitesinin yüksek olması ve beraberinde total lipid içeriklerinin ise düşük olması lipidlerin lipaz enzimi ile katabolize edildiğini ve β -oksidasyon için mitokondriye gönderildiğini göstermektedir. Şayet lipid içeriklerinde artışlar gözlenmiş olsaydı, lipidlerin katabolizma yoluna değilde yeni lipidlerin sentezi için biyosenteze katıldıklarını söylemek doğru olacaktı.

Mevcut araştırmada belirlenen lipaz aktivitesine ilaveten, Şekil 4.16’da görüldüğü gibi lipaz enzimini kodlayan gen ekspresyon seviyesindeki değişimler de araştırılmış ve aktivitedeki değişime benzer olarak, gen ekspresyonunun da ayrı ayrı karnitin ve soğuk uygulamalarıyla arttığı, hatta soğuk+karnitin uygulaması ile bu artışın çok daha yüksek seviyelere taşındığı belirlenmiştir. Literatür açısından bir ilk olan bu bulgu, karnitin lipid katabolizması üzerindeki aktive etkisinin sadece enzimatik düzeyde değil, gen ekspresyon düzeyinde de olduğunu, yani karnitin bir şekilde (direkt ya da dolaylı olarak) lipaz enziminin sentezi ile ilgili genin ekspresyonunu etkilediği sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Artan lipaz aktivitesi ile yüksek seviyelere ulaşan serbest yağ asitleri, açıl-CoA sentaz enzimi tarafından aktifleştirilirler. Bu biyoaktif yağ asiti metabolitleri (yağ açıl-CoA’lar) protein transportu, enzim aktivasyonu, protein açılasyonu, transkripsiyonal kontrol gibi fonksiyonlarının yanı sıra, temel olarak ya lipid biyosentezinde ya da solunumda substrat olarak da kullanılırlar (Weimar *et al.* 2002). İster lipid biyosentezi isterse solunum için substrat olarak kullanılsınlar, her iki durumda da hücre büyüme ve gelişmesi için pozitif etki ortaya koyarlar. Mevcut araştırmanın amacı doğrultusunda, aktifleşen yağ asitlerinin

yani açıl-CoA'ların lipid biyosentezinden ziyade mitokondriye taşınıp solunuma dâhil olup olmadığının açıkça ortaya konulması ve konunun daha anlaşılabilir olması için, bu konudaki bilgileri şu şekilde biraraya getirme ihtiyacı söz konusudur. Kısa ve orta zincirli yağ asitleri (açıl-CoA'lar), iç mitokondriyal membrandan difüzyonla kolayca geçip matrikse ulaşabildikleri halde, uzun zincirli yağ asitleri mitokondri iç zarından geçemezler. Bu durumda, gerek hayvan gerekse bitki hücrelerinde, uzun zincirli yağ açıl-CoA'ların matrikse taşınmasında bir aracı-taşıyıcı moleküle ihtiyaç vardır ki, bu molekül karnitindir (Fritz and Marquis 1965). Şekil 1.7'de de açıkça görülebileceği gibi, uzun zincirli açıl-CoA'ların iç zardan geçebilmesi ve matrikse taşınmasında iki enzim (CATI ve CATII) ile bir taşıyıcı protein (CACT) görev yapmaktadır. İlk enzim olan CATI mitokondri iç ve/veya dış zarının sitosol tarafında lökaleze olmuş olup, açıl-CoA'dan açıl grubunu ayırarak karnitin hidrosil grubuna bağlanmasını katalizler (Şekil 1.7). Böylece açıl-karnitin bileşiği oluşurken açığa çıkan CoA ise sitosole geri gönderilir. Oluşan açıl karnitin bileşiği iç mitokondri zarında bulunan bir taşıyıcı protein olan CACT aracılığı ile mitokondri matriksine geçer ve orada bulunan ikinci bir enzim olan CATII tarafından karnitinden ayrılarak açıl grubu tekrar farklı bir CoA'ya aktarılır. Böylelikle matrikste yeni bir açıl-CoA bileşiği meydana getirilmiş olur (Kunau *et al.* 1995). Serbest kalan karnitin ise aynı taşıyıcı protein tarafından tekrar bir karnitin/açıl-karnitin takası ile dışarıya taşınır. Aynı zamanda bahsedilen bu mekanizma sayesinde, matriks ve sitoplazmada bulunan CoA havuzlarının birbirlerine karışması da önleendiğinden, her iki tarafta var olan CoA havuzu yoğunluğunun değişmeksizin sürekli aynı kalması sağlanmış olur.

Bitkilerde CAT enzimlerinin varlığı ve aktiviteleri üzerine yapılmış çok sınırlı sayıda çalışma bulunmakta olup, bu çalışmalar kapsam ve içerik bakımından da son derece yetersizdir. 1986 yılında yapılmış olan bir çalışmada bezelyede sağlam ve bozunmuş mitokondrilere asetilkarnitin transferaz aktivitelerine bakılarak oluşan asetil-CoA miktarlarındaki değişimler belirlenmiştir (Burgess and Thomas 1986). Yine aynı yıl yapılan farklı bir çalışma da, saflaştırılan mitokondrilere karnitin palmitoltransferaz aktivitelerine bakılmış ve mitoplastlarda ki (iç zarı sağlam dış zarı çıkarılmış mitokondri) bu enzimin aktivitelerinin bozunmuş mitokondrilere kıyasla daha fazla olduğu

bildirilmiştir (Thomas and Wood 1986). Fasulye hipokotillerinin mitokondrilerinde substrat olarak farklı yağ asitlerinin kullanıldığı araştırmada, yağ asitlerinin zincir uzunluğu arttıkça CAT aktivitelerinin de arttığı belirlenmiştir. Ancak bu çalışmada mitokondrilerde sadece tek bir tane karnitin açıl transferaz enziminin var olduğu iddia edilmiştir (Gerbling and Gerhardt 1988). Sonraki yıllarda, yine fasulye bitkilerinin mitokondrilerinde CAT I aktivitesi için asetil bileşiğinin, CAT II aktivitesi için ise palmitolün substrat olarak kullanıldığı çalışmada, mitokondrilerde CAT II enziminin aktivitesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada, çalışılan enzimler memeli dokularındaki enzimlerle karakteristik olarak farklılıkları olsa da genel olarak CPT (karnitin palmitol transferaz) olarak sınıflandırılmıştır (Schwabedissen Gerbling and Gerhardt 1995). Diğer bir çalışmada ise karanlıkta çimlendirilen kolza bitkilerinin etiyole fideciklerinden saflaştırılan organeller incelenmiş ve erken çimlenme döneminde β -oksidasyon olayında mitokondrilerin rolü olmadığı ve bu nedenle CAT aktivitelerinin belirlenemediği rapor edilmiştir (Hoppe and Theimer 1997). Öte yandan, kloroplastlar üzerine yapılan çalışmalar sonucunda, kloroplastlarda da CAT varlığı belirlenmiş, ancak bu enzimlerin kloroplastlardaki temel fonksiyonlarının mekanizmaları bilinmese de desatüre yağ asitlerinin taşınmasıyla ilgili olduğu rapor edilmiştir (Masterson *et al.* 1997). CAT'lar ile ilgili günümüze kadar yapılan bu çalışmalar gözönüne alındığında, bu araştırmaların hiçbirinin stres altındaki bitkiler üzerinde yapılmadığı, dolayısıyla önceki araştırmalar ile bulgularımızın mukayese imkanı olmadığı, fakat bu araştırmada edinilen bulguların tamamının literatür açısından yeni olma özelliği taşıdığı söylenilebilir.

Mevcut araştırmada, kontrol bitkilerine kıyasla ayrı ayrı soğuk ve karnitin uygulanan bitkilerde hem CAT I hem de CAT II aktivitelerinde önemli artışlar kaydedilmiştir (Şekil 4.3/4.4). Soğuk stresi altındaki bitkilerin CAT I aktivitesinde kontrole kıyasla %21 oranında artış belirlenmiştir. Bu durum, soğuk stresi altındaki bitkilerin de strese karşı savunma mekanizmalarını aktive edebilmek için lipid katabolizmasını kullandıklarını ortaya koyması bakımından çok büyük önem taşımaktadır. Benzer şekilde soğuk uygulanan bitkilerin CAT II aktivitelerinde de %13,4'lük artışın olması, bu iki enzimin sinergistik bir biçimde çalışarak, soğuk stresi altındaki bitkide yağ asitlerinin solunuma dahil olmasını sağladıklarını göstermektedir. Öte yandan tek başına karnitin uygulaması

yapılan bitkilerin hem CAT I hem de CAT II aktivitelerinde önemli artışlar kaydedilmiş ve bu artışların, soğuk stresinde belirlenen artışlardan çok daha fazla olduğu (sırasıyla %49 ve %29) tespit edilmiştir. Bu bulgu, stres koşulları olmasa dahi karnitin lipidler solunuma dahil etmek kaydıyla büyüme ve gelişme hızının artmasına çok büyük bir katkı sağladığını gözler önüne sermektedir. CAT I ve CAT II üzerine ayrı ayrı uyarıcı etkiye sahip olan soğuk ve karnitin, bitkiye birlikte uygulandığında, enzim aktivitelerindeki artışın çok daha yüksek seviyelere ulaştığı tespit edilmiş olup, bu bulgular, bitkilerin hem savunma sistemlerini hem de büyüme ve gelişme hızlarını artırmak için lipidlerin solunuma sokulmasını teşvik ettiklerini ortaya koyucu niteliktedir.

Mevcut araştırmada, gerek yukarıda verilen bulguları desteklemek, gerekse lipid katabolizmasında kaydedilen artışın doğrudan karnitin tarafından kaynaklandığından emin olmak için serbest ve açıl karnitin içeriklerinde meydana gelen değişimler de belirlenmeye çalışılmıştır. Bitkilerde karnitin varlığı belirlendikten sonra yapılan ilk çalışmalar karnitin içeriklerinin belirlenmesine yönelikken, özellikle son yıllarda hem total karnitin hem de açıl karnitin seviyelerindeki değişimlerle ilgili olan çalışmalar da yapılmaya başlanmıştır. Farklı bitkilerin karnitin içeriklerini belirlemeye yönelik yapılan bir çalışmada buğday, arpa, ıspanak, kabak, yer fıstığı, avokado ve karnabahar bitkilerinin karnitin içerikleri tespit edilerek birbirleri arasında kıyaslama yapılmıştır (Panter and Mudd 1969). L-karnitin ve D-karnitin kullanılarak yapılan farklı bir araştırmada ise farklı yağ asitlerinin oksidasyon seviyeleri belirlenmiş, L-karnitin çok daha etkin olduğu tespit edilmiştir (Panter and Mudd 1973). 2007 yılında bu kez farklı bitkilerin hem total hem de serbest karnitin içerikleri bakımından kıyaslamaları yapılmış ve çalışılan meyve ve sebzelerin 1g kuru ağırlıklarında 4 mg'dan daha az miktarda karnitin bulunduğ u tespit edilmiştir (Seline and Johein 2007). Arabidopsis'te yapılan bir çalışmada ise, kök sistemi ve rozetlerde bulunan total karnitin ve açıl karnitin içerikleri belirlenmiş; total karnitin köklerde daha fazla bulunduğ u, açıl karnitinlerden palmitoil-L-karnitin, stearoil-L-karnitin, linoleil-L-karnitin, araşidonoil-L-karnitin içeriklerinin yüksek seviyelerde olduğ u, oktanoil-L-karnitin, dekanoil-L-karnitin, miyristoil-L-karnitin ve lauroil-L-karnitin içeriklerinin ise daha düşük seviyelerde bulunduğ u belirlenmiştir (Bourdin *et al.* 2007). Yine Arabidopsis'de yapılan diğ er bir çalışmada ise, eksojen

karnitin uygulamasının tuz stresi altında içsel karnitin içeriğini artırdığı belirlenmiş ve karnitinin tıpkı prolin gibi osmoprotektan rol oynayarak bitki direncinin artırılmasına katkı sağladığı bildirilmiştir (Charrier *et al.* 2012). Günümüze kadar yapılan çalışmalardan farklı olarak mevcut çalışmada, hem normal koşullarda yetiştirilen hem de karnitin ve soğuk uygulamalarının ayrı ayrı ve birlikte yapıldığı bitkilerde serbest karnitin ve açıl karnitin içeriklerindeki değişimler belirlenerek literatürde çok önemli bir boşluğun doldurulmasına katkı sağlanmıştır. Mevcut araştırmada soğuk ve karnitin uygulamaları kontrol bitkilerine kıyasla serbest karnitin içeriklerinde sırasıyla %2093 ve %840 artışa sebep oldu (Şekil 4.5). Karnitin içeriklerinde belirlenen bu yüksek artışlar önceki çalışmalarda elde edilen bulgular tarafından desteklenmektedir. Arabidopsis ile yapılan bir çalışmada 5 μ M karnitin verilen bitkilerin içsel karnitin içeriklerine bakılmış ve kontrole göre %4000'ler civarında bir artış belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada sadece tuz stresi (150 mM) altındaki bitkilerin içsel karnitin içeriklerinin kontrole kıyasla %1600 civarında daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Charrier *et al.* 2012). Yüksek CAT aktivitelerine rağmen, serbest karnitin içeriklerinde belirlenen bu aşırı yükselmeler soğuk stresi altında karnitin biyosentezinde önemli bir artışın meydana geldiği, karnitin uygulanan bitkilerde ise biyosentezdeki artışla birlikte uygulanan karnitin hücrelerde biriktiği şeklinde yorumlanabilir. Karnitin uygulanan bitkiler stres koşullarına maruz kalmadığından, karnitin biyosentez hızında soğuk stresi kadar artışa ihtiyaç olmamış ve serbest karnitin seviyesi soğuk stresine nazaran daha düşük kalmıştır. Ayrıca stres altındaki bitkilere kıyasla tek başına karnitin uygulanan bitkilerin serbest karnitin içeriklerinin yüksek olmamasının bir sebebi de, bu bitkilerdeki açıl karnitin seviyelerinin daha yüksek olmasıyla açıklanabilir (Şekil 4.7/4.8). Nitekim mevcut araştırmada soğuk uygulanan bitkilerin açıl karnitin içeriklerinin, sadece karnitin uygulanan bitkilere kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmesi bu varsayımı desteklemektedir. Bu durum soğuk stresi altında karnitin biyosentez hızı artmış olsa da, onların lipid metabolizmasına katılma oranının karnitin uygulanan bitkilere nazaran daha düşük olduğunu göstermektedir. Öte yandan uzun zincirli açıl karnitin içeriklerinin (steoril-L-karnitin, miyristol-L-karnitin ve lauril-L-karnitin) aksine, kısa ve orta zincirli açıl karnitin (propionil-L-karnitin, hekzanoil-L-karnitin, dekanol-L-karnitin) içeriklerinin en yüksek değeri soğuk uygulanan bitkilerde kaydedilmesi, karnitin kısa ve orta zincirli yağ açillerinden ziyade uzun zincirli yağ açillerinin taşınmasında görev aldığını bir kez daha açıkça gözler önüne

sermiştir. Çünkü bitki hücrelerinde kısa ve orta zincirli yağ asitlerinden ziyade uzun zincirli yağ asitleri bol miktarda bulunmakta ve solunum metabolizmasında esas olarak uzun zincirli yağ asitlerinin kullanılması tercih edilmektedir. Dahası, kısa ve orta zincirli yağ asitlerinin enerji metabolizmasından ziyade hücrel sinyal fonksiyonlarında görev aldığı da bilinmektedir (Schönfeld and Wojtczak 2016). Soğuk ve karnitinin birlikte uygulandığı bitkilerde ise hem serbest karnitin hem de açıl karnitin içeriklerinin en yüksek değerlerinin kaydedilmiş olması, yukarıda da izah edildiği gibi, hem savunma stratejileri hem de büyüme ve gelişme için ihtiyaç duyulan enerji miktarının daha yüksek olması sebebiyle substrat olarak yağ asitlerine olan ihtiyacın artmasından kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak, lipaz ve CAT aktivitelerinde kaydedilen değişimlerle serbest ve açıl karnitin içeriklerindeki belirlenen pozitif korelasyon, lipid katabolizması hızı ile karnitin içeriği arasında güçlü bir bağlantının olduğunu göstermektedir.

Mitokondriyal matrikste CAT II katalizörlüğünde oluşan yağ açıl-CoA'ların TCA döngüsüne dahil olabilmesi için 2C'lu asetil-CoA'lara ayrışması gerekmektedir. Yağların β -oksidasyonu olarak adlandırılan ve birden fazla reaksiyondan oluşan bu süreç sonucunda, reaksiyona giren yağ açıl-CoA'lar ikişer karbon kısalarak asetil-CoA'lar meydana getirilir. Ayrıca bu süreçte enerji metabolizması için çok önemli olan $\text{NADH}+\text{H}^+$ ve FADH_2 'ler de üretilir. Bitkilerde β -oksidasyon reaksiyonları mitokondrilerin yanı sıra peroksizomlarda da meydana gelir. Ancak orta ve uzun zincirli yağ-açıl-CoA'lar mitokondrilerde β -oksidasyona uğrarken, peroksizomlarda çok uzun zincirli yağ-açıl-CoA'ların β -oksidasyonu gerçekleşir (Schönfeld and Wojtczak 2016). Bu nedenle yağ-açillerinin enerji metabolizmasına dâhil olduğu temel yer mitokondriyal matriks olarak ifade edilebilir. β -oksidasyon sonucunda oluşan asetil-CoA'lar, tıpkı pirüvik asitten oluşan asetil-CoA'lar gibi sitrat sentaz enziminin katalizörlüğünde OAA ile birleşerek sitrik asitin oluşumuna katılmak suretiyle solunuma TCA döngüsünden dahil olurlar (Lambers and Ribas-Carbo 2005).

TCA döngüsünde yer alan tüm enzimler gibi, sitrat sentazın aktivitesinde meydana gelecek artış veya azalışlar doğrudan TCA'nın ve dolayısıyla tüm mitokondriyal solunumun hızını etkiler (Schmidtman *et al.* 2014). Bu bağlamda, mevcut araştırmanın

temel hedefi olan karnitin-indüklü lipid katabolizması sonucunda matrikse kadar taşınarak β -oksidasyonla asetil-CoA'ları oluşturan yağ asitlerinin TCA'ya dâhil olmasıyla, döngünün ilk enzimi olan sitrat sentaz aktivitesinde önemli artışların olması beklenmektedir. Nitekim mevcut çalışmada elde edilen bulgular da, beklenildiği gibi karnitin uygulanan bitkilerin sitrat sentaz aktivitelerinde kontrol bitkilerine kıyasla %60'lara varan artışların meydana geldiğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.10). TCA siklusundaki hızlanma, paralelinde biyosentez reaksiyonlarında ve enerji üretiminde de artışlara sebebiyet vereceğinden, bitki büyüme ve gelişme hızının önemli oranda artmasını sağlayacaktır. Bu bulguyu destekleyecek şekilde, karnitin uygulanan bitkilerin büyüme parametrelerinde de belirgin artışlar kaydedildi (Büyüme parametreleri ileride detaylı olarak tartışılmıştır). Yalnız aşırı substrat seviyeleri, diğer kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi TCA reaksiyonların da sürekli olarak hızlanacağı ve devam edeceği anlamına gelmemektedir. TCA reaksiyonlarının da çeşitli kontrol mekanizmaları bulunmaktadır. Bunlardan sitrat sentaz enzimi ile ilgili olanlar ATP: ADP, Asetil CoA: CoA ve NADH: NAD oranlarında meydana gelen değişimlerdir. ATP, Asetil-CoA ve NADH'ın yüksek konsantrasyonlara ulaşması hücrelerde enerji ihtiyacının yeterli seviyelerde olduğu anlamına geldiğinden, sitrat sentaz aktivitesinin inhibisyonuna neden olmaktadır. Bu durum, sitrat sentaz aktivitesinin metabolit seviyesiyle yakından ilgili olduğunu gösterir. Bu nedenle inhibisyona yol açan maddelerin miktarındaki aşırı yükselmelerin önlenmesi, onların sürekli olarak kullanılmasıyla mümkün olabilir. Bu da stressiz koşullarda büyüme ve gelişmenin hızlanması ile gerçekleşebilir. Ayrıca mitokondriyal matrikste oluşan sitrat, dikarboksilat taşıyıcıları tarafından sitosole taşınarak konsantrasyonu belirli seviyelerde tutulabilir. Sitosole taşınan sitrat, orada 2-oksoglutarata kadar parçalanarak, kendisi glutamati oluşturmak suretiyle fotorespirasyon sürecinde görevli olan glioksilatın glisine dönüşmesinde de görev alır (Araujo *et al.* 2012).

Soğuk stresi ise ilginç bir şekilde sitrat sentaz aktivitesini, tek başına karnitin uygulamalarından daha fazla artırdı (Şekil 4.10). Sitrat sentaz aktivitesindeki bu artış, kontrol bitkilerine kıyasla %100'den, karnitin uygulanan bitkilere kıyasla ise %40'dan daha fazlaydı. Bu durum, strese maruz kalan bitkilerin büyüme ve gelişmeden ziyade

savunma ve adaptasyon mekanizmalarını aktifleştirmeleri için enerjiye ve TCA bağlantılı çeşitli yolların aktivasyonuna olan ihtiyaçlarındaki artışla izah edilebilir.

Literatürde sitrat sentaz enzimi ile ilgili yapılan çalışmalar özellikle bitki-toprak etkileşimi temelinde, bu enzimin köklerden sitrat salınımı, fosfat alınımı ve alüminyum toleransı üzerine etkileri ile ilgilidir (Anoop *et al.* 2003; Kochian *et al.* 2004; Sienkiewicz-Porzucek *et al.* 2008). Son yıllarda, sitrat sentazın metabolik ve fizyolojik rollerini ortaya çıkarmaya yönelik transgenik bitkiler kullanılarak yapılan çalışmalarda; bitkilerin büyüme hızı, solunum hızı, azot metabolizması, fotosentez, aminoasit içerikleri, primer metabolizmada rol oynayan çeşitli enzimler, nitrat içeriği ve pigment içeriği gibi çok farklı metabolik yollar üzerine sitrat sentazın doğrudan etkisinin olduğu belirlenmiştir (Bassi *et al.* 1997; Studart-Guimaraes *et al.* 2007; Sienkiewicz-Porzucek *et al.* 2008). Bu araştırmalar, özellikle mitokondriyal sitrat sentaz eksikliğinde peroksizomal sitrat sentazın etkinliğinin ve gen ekspresyonunun artırıldığını ve bu enzimin mitokondriyal sitrat sentaz gibi etkiye sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (Sienkiewicz-Porzucek *et al.* 2008). Yine bu çalışmalar neticesinde, sitrat sentaz enziminin özellikle karbon-azot etkileşiminin düzenlenmesi (azot asimilasyonu) üzerine çok önemli bir etkiye sahip olduğu da belirlenmiştir (Gaude *et al.* 2007). Sitrat sentaz enzimi üzerine yapılan diğer çalışmalarda; patatesin çiçeklenme zamanında ve soğukta depo edilen tuberlerinde aktivitesinin ciddi derecede arttığı (Landschutze *et al.* 1995), soğukta depo edilen salatalık bitkilerinde zamana bağlı olarak aktivitesinin değiştiği (Tsuchida *et al.* 2010), brokolide çevresel streslere karşı toleransı artırdığı (Eason *et al.* 2007), Arabidopsis'e transfer edilen bu enzimle ilgili genin demire karşı toleransı artırdığı (Han 2017), fasulye, pirinç ve tütünde alüminyum toleransını artırdığı (Mugai *et al.* 2000; Han *et al.* 2009; Wang *et al.* 2012), mısır tohumlarının glioksizomlarında yüksek aktivite gösterdiği (Barbareschi *et al.* 1974) belirlenmiştir. Mevcut çalışmaya paralel olarak sitrat sentaz enzim aktivitesi üzerine karnitin ya da soğuk stresi ile ilgili literatürde bilinen herhangi bir çalışma olmamasına karşın, yine de farklı stres koşulları altında ve soğuk depolamalarında bu enzimin aktivitelerinde genel bir artış belirlenmiş olması ve metabolizmanın hızı ve biyosentez reaksiyonları ile ilgili uyarıcı etkiye sahip olduğunun tespit edilmesi, mevcut araştırmada elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir.

Yine mevcut araştırmada soğuk ve karnitinin birlikte uygulaması sonucunda sitrat sentaz aktivitesindeki en yüksek değerler elde edilmiştir. Kontrol bitkilerine kıyasla %169'a varan artışa sebep olan soğuk+karnitin uygulaması açıkça göstermektedir ki; TCA'nın hızı üzerine tek başına karnitin uygulamasının büyüme ve gelişmeyi uyarıcı etkisi ile tek başına soğuk uygulamasının savunma stratejilerini geliştirici etkisi harmanlanmış ve böylelikle sitrat sentaz üzerinden TCA'nın hızı artırılmak kaydıyla hem ihtiyaç duyulan ekstra enerjinin üretimi hem de savunma ile ilgili metabolitlerin yeterli derecede sentezi sayesinde bitkilerin soğuğa karşı toleransları önemli oranda artırılmıştır. Mevcut araştırmada sitrat sentaz aktivitesine ek olarak, Şekil 4.16'de görüldüğü gibi gen ekspresyon seviyesindeki değişimler de araştırılmış ve aktivitedeki değişime benzer olarak gen ekspresyonunda ayrı ayrı karnitin ve soğuk uygulamalarıyla arttığı, beraber uygulanması ile bu artışın çok daha ileri seviyelere taşındığı belirlenmiştir. Karnitinin soğukla beraber uygulanmasının sitrat sentaz geni üzerindeki etkisi, literatür açısından bir ilk olması karnitinin TCA devri üzerindeki etkisinin sadece enzim düzeyinde değil gen düzeyinde de olduğunu açıkça ortaya koymuştur.

Solunumun fotosentez üzerine etkisi, ona sadece süktroz sentezi için ATP sağlamasından ibaret değildir. TCA'daki belirli reaksiyonlar sitosolik nitrat birikimi için elzemdir. Artan nitrat konsantrasyonu ise fotosentez verimini önemli oranda artırır. Bu da demek oluyor ki, TCA'nın hızındaki artış aynı zamanda fotosentez verimliliğinin artmasını da sağlayarak büyüme ve gelişmeye dolaylı olarak da katkı sağlamaktadır. Dahası solunum, hücresel redoks durumunun dengelenmesi için metabolit dağılımının düzenlenmesi, enerji metabolizmasının koordinasyonu için sinyal rolü oynaması, fotorespirasyon süreci ile metabolizmanın tamponlanması gibi rolleri ile de fotosentez üzerine önemli etkilere sahiptir (Nunes-Nesi *et al.* 2011). Ayrıca TCA enzimleri ve ETS elemanlarının aktivitelerinin fotosentez verimliliği üzerine önemli etkilere sahip olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (Araujo *et al.* 2012). Mevcut araştırmada, karnitin-indüklü yüksek TCA hızının belirlenmiş olması (sitrat sentaz aktivitesinde %60'a varan artış), fotosentez verimliliğinde de önemli artışların meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir. Ancak karnitinin fotosentez verimliliği üzerine etkisi hakkında kesin

bir yargıda bulunabilmek için pigment içeriğinden fotosentezle ilgili enzimlerin aktivitelerinin belirlenmesine kadar çeşitli çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Solunumla yakın ilişkili olan diğer önemli bir metabolik yol ise azot asimilasyonudur. Azot asimilasyonu için, topraktan alınan amonyumun bir karbon iskeletine ilave edilmesi gerekmektedir. TCA'da oluşan ara ürünlerden olan 2-oksoglutarat, azot asimilasyonu için gerekli olan karbon iskeletini sağlar. Bu yolda görev yapan enzimler glutamat dehidrogenaz (GDH), glutamin sentaz (GS) ve glutamat sentaz (GOGAT)'dır. GS ve GOGAT üzerinden azot asimilasyonu, bitkilerde azotlu bileşiklerin biyosentezi için ihtiyaç duyulan primer amino donörler olan glutamin ve glutamati üretir. GS aktivitesi için doğrudan ATP'ye, GOGAT aktivitesi için ise hem karbon iskeletlerine hem de 2-oksoglutaratın oluşumu için indirgeyici güçlere (ferrodoksin veya NADH) ihtiyaç duyulduğundan, azot asimilasyonu ile solunum arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır. Öte yandan azot asimilasyonu için diğer bir yol, GDH enzimi tarafından katalizlenen ve doğrudan azot özümlemesinin gerçekleştiği yoldur. Bu yol için, TCA'dan hem karbon iskeleti olarak 2-oksoglutarat hem de indirgeyici güç olarak NADH'a ihtiyaç duyulduğundan TCA'nın hızının azot asimilasyonu üzerine doğrudan etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Mevcut araştırmada, karnitinin azot asimilasyonu üzerine etkisini belirlemek amacıyla, GS yolundan ziyade hem C iskeleti hem de ATP'ye ihtiyacı nedeniyle TCA'yla sıkı bir ilişki içerisinde olan GDH yolunun aktivitesindeki değişimler araştırılmıştır. GDH enzimi iki yönlü aktivite gösterdiğinden onun azot asimilasyonu (glutamat sentezi) için olan aktivitesini belirlemek için mevcut araştırmada NADH-GDH aktivitesi ölçüldü (Şekil 4.11). Soğuk stresi GDH aktivitesinde kontrol bitkilerine kıyasla %22'ye varan bir azalmaya neden oldu. Literatürde düşük sıcaklıklar altında GDH aktivitesinin azaldığını bildiren çalışmalarda mevcuttur (Lu *et al.* 2005; Yan *et al.* 2006). Bu durum, soğuk stresi altında azot asimilasyon hızının yavaşladığını gösterebilir. Oysaki mevcut araştırmamızda soğuk stresi sitrat sentaz aktivitesi üzerinde %100'den fazla bir artışa neden olmuştur (Şekil 4.10). Bu iki bulgu birlikte değerlendirildiğinde, TCA hızındaki artışın aminoasit yapılı olan osmoprotektanların biyosentezinden ziyade farklı savunma

stratejileri için kullanıldığı söylenebilir. Zaten soğuk stresi altında, su ve element alınımında meydana gelen azalmaya bağlı olarak içsel amonyak ve amonyum miktarlarında da azalmalar meydana geldiği çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Atkin and Cummins 1994; Goel and Singh 2015). Dolayısıyla mevcut araştırmada elde edilen bu bulgu önceki araştırmada elde edilen bulgular tarafından desteklenmektedir. Öte yandan, literatürde soğuk stresi altında prolin ve arginin gibi aminoasit yapısındaki osmoprotektanların seviyesinde bariz yükselmeler olduğu rapor edilmiştir (Nanjo *et al.* 1999; Kumar *et al.* 2008; Janska *et al.* 2010; Erdal 2012; Liu *et al.* 2017). Mevcut bulgular gösteriyor ki, bu durum aminoasitlerin biyosentezinden ziyade birbirleri arasındaki dönüşümlerden ve proteinlerin soğuk-indüklü oksidasyonundan kaynaklanmış olabilir.

Soğuk stresinin aksine, karnitinin tek başına ve soğuk ile birlikte kombine uygulamaları GDH aktivitesinde önemli artışlar meydana getirdiği belirlendi (Şekil 4.11). Tek başına karnitin uygulanan bitkilerin GDH aktivitelerinde kontrol bitkilerine kıyasla %29'a varan artış belirlenirken, soğukla birlikte kombine olarak uygulandığında GDH aktivitesinde meydana gelen soğuk (yaklaşık %22) kaynaklı inhibisyonu %9'lara kadar hafiflettiği belirlendi. Bu durum, TCA hızındaki artışla paralel bir şekilde azot asimilasyonunun da karnitin tarafından uyarıldığını ve böylelikle prolin, arginin, γ -aminobütirik asit ve poliaminler gibi soğuk toleransında önemli rol oynayan maddelerin sentezi için öncül olan glutamatın asimilasyonundaki artış sayesinde bitki direncinin belirli bir dereceye kadar desteklendiğini göstermektedir (Liu *et al.* 2017). Dahası azot metabolizması, solunumla olan sıkı koordinasyonu kadar fotosentez reaksiyonlarıyla da ilişkilidir. Yapraklarda bulunan azotun yarıdan fazlası fotosentetik aygıtlarda bulunur ve bu yüzden fotosentetik kapasite yaprak azot içeriğiyle güçlü bir etkileşim halindedir (Hikosaka 2004). Birim yaprak alanında bulunan azot içeriği, düşük sıcaklıklara maruz kalan yapraklarda daha fazladır. Bu artış, düşük sıcaklıklarda azalan enzim aktivitelerini dengelemeye yönelik bir cevap olarak düşünülebilir (Yamori *et al.* 2009). Çünkü azot, klorofiller ve RuBisCo enzimi gibi fotosentezde rol oynayan çok önemli bileşenlerin yapısına katılmaktadır. Dolayısıyla azot asimilasyonunda belirlenen karnitin-indüklü artışın, bir taraftan aminoasitler ve azot içeren çeşitli bileşiklerin seviyelerindeki artışla

büyüme ve gelişmenin desteklenmesine, öte yandan prolin ve poliaminler gibi savunmaya yönelik bileşiklerin seviyelerindeki artışla bitki direncinin gelişmesine katkı sağladığı açıkça ifade edilebilir. Mevcut araştırmada NADH-GDH enziminin aktivitesinin belirlenmesine ek olarak, Şekil 4.16'da görüldüğü gibi gen ekspresyon seviyesindeki değişimler de araştırılmış ve aktivitedeki değişime benzer olarak gen ekspresyonunda karnitin uygulaması ile arttığı ve soğuk uygulaması ile azaldığı belirlenmiştir. Soğukla beraber karnitin kullanımının bu genin ekspresyon seviyesinde soğuğa göre daha yüksek bir seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Elde edilen bulgu literatürde karnitinin GDH üzerine etkisinin belirlediği ilk çalışma olması açısından büyük önem taşımakta ve karnitinin solunum ve azot metabolizması üzerindeki etkisinin sadece enzim düzeyinde değil gen ekspresyonu düzeyinde de olduğunu açıkça gözler önüne sermektedir. Ancak karnitinin azot asimilasyonu üzerine etkilerinin kesin bir şekilde ortaya konulması için ileriki çalışmalarda GS ve GOGAT yolu enzim ve gen ifadelerinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Solunumun üçüncü ve son aşaması sitokrom yolu ve alternatif solunum yollarını içeren ETS'dir. Literatürde soğuk stresinin bitkilerde mitokondriyal solunum hızı üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı bulgular elde edilmiştir (Lukatkin *et al.* 2012). Araştırmacılardan bazıları düşük sıcaklıkların mitokondriyal zarlara verdiği hasarlar, enzim aktivitelerinde meydana gelen inhibisyonlar ve hücre ve organel bütünlüğünün bozulması gibi etkenler nedeniyle total solunum hızının azaldığını rapor etmişlerdir (Prasad *et al.* 1994a; Lawrence and Holaday 2000; Munro *et al.* 2004). Bazı araştırmacılar ise düşük sıcaklıklara karşı tolerans mekanizmalarının aktive edilmesi için solunum hızının artırıldığını bildirmişlerdir (Stewart *et al.* 1990; Yadegari *et al.* 2008). Mevcut araştırmada ise yukarıdaki bulgularla uyumlu olarak, soğuk stresine maruz kalan bitkilerin total solunum hızlarında önemli bir artış (%61) belirlendi (Şekil 4.12). Karnitin uygulaması ise normal şartlar altında büyüyen bitkilerin total solunum hızlarını yaklaşık %70, soğuk stresine maruz kalan bitkilerde ise %200'den daha fazla oranda aktive etti. Bizim sonuçlarımıza benzer olarak mısır bitkisinde soğuk stresi ve progesteron uygulaması ile yapılan bir çalışmada, soğuk stresinde total solunum hızının %80, soğuk ile progesteron uygulamasının ise total solunum hızını %132 oranında artırdığı rapor

edilmiştir (Erdal and Genisel 2016). Bu durum karnitinin solunumu hızlandırmak suretiyle metabolizma üzerinde önemli bir düzenleyici rol oynadığını göstermektedir. Karnitin uygulanan bitkilerin gerek lipaz aktivitelerinde, gerek CAT aktivitelerinde, gerekse sitrat sentaz aktivitelerinde belirlenen artış solunum hızında kaydedilen bu yüksek aktivasyonla kuvvetli bir şekilde desteklenmiş ve karnitinin lipid metabolizmasını uyarak mitokondriyal solunumu hızlandırıldığını açıkça gözler önüne sermiştir.

Mevcut çalışmada ayrıca, sitokrom yolu ve alternatif solunum yollarının aktiviteleri ayrı ayrı belirlenmek suretiyle total solunum hızındaki artışın nedeni ve önemi vurgulanmaya çalışıldı (Şekil 4.13). Çünkü sitokrom yolunun aktivitesi hücrenin enerji durumunu gösterirken, alternatif solunum yollarının aktivitesi daha çok strese karşı toleransla ilgilidir (Del-Saz *et al.* 2018). Mevcut çalışmada, total solunum yolunda önemli bir artış kaydedilen stresli bitkilerde, sitokrom yolunda istatistiksel olarak önemli bir artış kaydedilemedi. Oysaki bu bitkilerin alternatif solunum hızları ile UCP/UCNP aktivitelerinde bariz yükselmeler meydana geldi. Bu durum, soğuk stresi altında artan total solunum yolunun, sitokrom yolundan değil de alternatif yolların aktivasyonundan kaynaklandığını göstermektedir. Nitekim V_{alt}/V_t oranı kontrol bitkilerinde %15,97 iken, bu oran stresli bitkilerde %26,69'a kadar yükseldi. Dahası, V_{cyt}/V_t oranında önemli bir düşüş (%79,83'ten %58,85'e) meydana geldi. Yani solunum metabolizmasındaki soğuk kaynaklı solunum artışın, büyüme ve gelişmenin sürdürülmesinden ziyade strese karşı tolerans ile ilgili olduğu belirlendi. Öte yandan $V_{UCP-UCNP}/V_t$ oranında da kontrole kıyasla yaklaşık 3 kata varan artışın meydana gelmiş olması, bitki solunumunun savunma stratejilerine yöneldiğini güçlü bir şekilde destekledi (Şekil 4.13).

V_{alt} ile $V_{UCP-UCNP}$ 'deki artışlar neticesinde zar üzerinde akışı devam eden elektronların enerjisi ATP yerine ısı enerjisi olarak açığa çıkar (Costa *et al.* 1999). İlk bakışta olumsuz olarak algılanabilecek bu durumun bitkiler için çok önemli faydaları bulunmaktadır. ETS'nin aşırı yüklenmesi durumunda gerek sistemde meydana gelen sızıntı ve kaçaklar, gerekse ubikinonun verimli bir şekilde indirgenemeyişinden kaynaklanan anormallikler nedeniyle oluşan ROT'ların üretimi, proton gradiyetinin azaltılmasıyla belirli dereceye kadar önlenabilir. Ayrıca yine aşırı yüklenme durumunda enerjinin bir kısmının ısıya

yönelmesi sağlanarak ADP'ye olan ihtiyaç azaltıldığından, mitokondrilerdeki ADP/ATP oranı da dengelenmiş olur. Ayrıca bu yolların aktivasyonu, hücre içi oksijen/su dengesinin sürdürülmesi de sağlanmış olur (Stewart *et al.* 1990; Lambers and Ribas-Carbo 2005; Erdal *et al.* 2015). Mevcut bulguları destekler şekilde, literatürde soğuk stresinin bitkilerde alternatif solunum yolunu aktive ederek adaptasyona katkı sağladığını bildiren çok sayıda çalışma mevcuttur. Tütün bitkisinde yapılan bir çalışmada soğuk stresinin AOX aktivitesini ilk 48 saat boyunca artırdığı (Rurek *et al.* 2015), salatalıkta yapılan bir çalışmada, AOX yolunun inhibe edilmesiyle fotoinhibisyonun şiddetinin arttığı (Hu *et al.* 2017), mısırdaki soğuk uygulaması ile AOX aktivitesinde önemli bir artışın meydana geldiği (Erdal and Genisel 2016), nohutta soğuk stresi altında artan AOX aktivitesiyle adaptasyon mekanizmasının güçlendiği (Erdal *et al.* 2015) gibi soğuk stresi altında alternatif solunumun aktivasyonunun arttığını belirten araştırmalar yapılmıştır.

Yine mevcut araştırmada karnitin uygulamalarının ETS üzerine etkisinin, soğuk stresinin neden olduğu değişimlerden çok daha farklı olduğu belirlendi. Karnitin uygulanan bitkilerde kontrol bitkilerine kıyasla total solunum yolunda kaydedilen %300'den fazla artışın, dengeli bir şekilde hem V_{cyt} , hem V_{alt} hem de $V_{UCP-UCNP}$ 'lerde meydana gelen yükselmelerden kaynaklandığı belirlendi (Şekil 4.12). Kontrol bitkilerine kıyasla, karnitin uygulanan bitkilerin V_{cyt}/V_t ile $V_{UCP-UCNP}/V_t$ oranlarında istatistiksel bir farklılık meydana gelmemekle birlikte, V_{alt}/V_t oranında önemli bir artış belirlendi (Şekil 4.13). Bu durum, karnitin bir yandan hücre büyüme ve gelişmesi için gerekli olan normal sitokrom yolunu aktivasyonunu sürdürürken, aynı zamanda alternatif solunum yollarının da aktivasyonunu sağlamak suretiyle bitki savunmasına da katkı sağladığı anlamına gelmektedir. Nitekim ileride detaylı bir şekilde bahsedilecek olan bitki büyüme parametrelerinde kaydedilen artışa paralel olarak oksidatif stress parametrelerinde belirgin iyileşmelerin gözlenmesi, solunumun karnitin indüklü modülasyonu ile doğrudan bağlantılı olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Soğuk stresi ile birlikte karnitin uygulanan bitkilerde de yine tüm solunum yollarının (V_{cyt} , V_{alt} ve $V_{UCP-UCNP}$) aktivasyonunda belirgin artışlar kaydedilmiş, ancak tek başına karnitin uygulamasına kıyasla stresli şartlarda V_{cyt}/V_t ile $V_{UCP-UCNP}/V_t$ oranlarında

azalmalar meydana gelirken, Valt/Vt oranı ise belirgin bir şekilde arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.13). Bu durum, karnitinin normal koşullar altında büyüme lehine module ettiği ETS reaksiyonlarını, stresli şartlar altında belirli bir dereceye kadar savunmaya yönlendirdiğini göstermektedir. Ancak oransal olarak Vcyt/Vt’de düşüş olduğu söylenebile, Vcyt tek başına yine çok yüksek değerlerde olduğundan, bitki bir taraftan savunmaya odaklı değişimlere yönelmişken, öte yandan büyüme ve gelişmesini sürdürdüğü de söylenebilir. Nitekim büyüme parametrelerinde belirlenen karnitin-indüklü artışlar bu varsayımı desteklemektedir.

Mevcut araştırmada AOX ve COX proteinlerinin western blot yöntemi kullanılarak protein ifadelerine de bakıldı. AOX ve COX proteinlerinin ayrı ayrı soğuk ve karnitin uygulaması ile arttığı, birlikte uygulanmasının ise daha da belirgin bir artış gösterdiği belirlendi (Şekil 4.14/4.15). Bu proteinlerin Şekil 4.17’de görüldüğü gibi AOX1 ve AOX prekürsörünün gen ekspresyon seviyesindeki değişimler de araştırılmış ve protein ifadesindeki değişime benzer olarak gen ekspresyonlarında da ayrı ayrı karnitin ve soğuk uygulamalarıyla arttığı, birlikte uygulanan bitkilerde ile bu artışın çok daha ileri seviyelere taşındığı belirlenmiştir. Şekil 4.16’da görüldüğü gibi, COX ekspresyon seviyesi de proteinde meydana gelen değişime benzer olarak ayrı ayrı karnitin ve soğuk uygulamalarıyla arttığı, birlikte uygulanan bitkilerde ile bu artışın çok daha yüksek seviyelere taşındığı belirlenmiştir. Literatür açısından bir ilk olan bu bulgu, karnitinin solunum üzerindeki etkisinin sadece enzim aktivitesi düzeyinde değil gen ekspresyonu düzeyinde de etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca lipid katabolizması ve solunum metabolizmasında görevli enzimlerin aktivitelerinde meydana gelen artışlar arasında belirlenen pozitif korelasyona benzer olarak, bu enzimleri kodlayan genlerin ifadeleri arasında da belirgin bir korelasyon tespit edilmiş olması literatür açısından bir ilk olma özelliği taşımaktadır.

Buraya kadar lipid metabolizması ve mitokondriyal solunum reaksiyonları üzerine karnitin ve soğuk uygulamalarının ayrı ayrı ve birlikte etkileri değerlendirildi. Bu aşamada ise karnitin tarafından modüle edilen solunumun, hem bitkilerin büyüme ve gelişme hızları ve savunma sistemleri üzerine neden olduğu etkilerini ortaya koymak hem

de şimdiye kadar ortaya koyduğumuz karnitin-indüklü sonuçları desteklemek üzere, mısır fidelerinde karnitinin yol açtığı büyüme ve oksidatif stres parametrelerindeki değişimler değerlendirilecektir.

Bitkilerin soğuk stresine verdiği en hızlı cevaplar arasında kök uzaması ve gövde büyümesinde meydana gelen inhibisyonlar gelmektedir. Bu organlardaki inhibisyonların derecesi, bitkilerin strese karşı toleranslarını gösteren önemli indikatörlerdendir. Kökler topraktan su ve besinleri alarak diğer organlara iletmenin yanı sıra, toprağın derinlerine doğru gelişerek bitkiye mekanik destek görevi görürler. Bilindiği gibi kök uzaması düşük sıcaklıklardan çok kolay etkilenir. Stresin şiddeti ve süresine bağlı olarak kök uzamasında bariz inhibisyonlar meydana gelebilir (Neumann and Römheld 2007). Literatürde soğuk stresinin kök büyümesi üzerine etkileri ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Soğuk stresine maruz kalan biber bitkilerinde kök büyümesinin yavaşladığı, kök uzaması ve genişlemesinin ise önemli derecede inhibe olduğu bildirilmiştir (Tang *et al.* 2007). Kışlık buğday bitkilerinde soğuğun etkisiyle kök uzamasının inhibe olduğu ve biyomasta önemli azalmaların meydana geldiği rapor edilmiştir (Liu and Yuan 2010). Literatürdeki bulgulara benzer olarak, mevcut araştırmada da 3 gün boyunca soğuk stresine maruz kalan mısır bitkilerinin kök uzunluklarında %18'e varan inhibisyon meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 4.18). Kök büyümesinde meydana gelen, soğuk kaynaklı bu inhibisyon, artan su viskozitesindeki artış ve azalan membran akışkanlığı nedeniyle su ve mineral alınımında meydana gelen azalmaya bağlanabilir. Bitkilerde su alınımı sadece pasif yolla olmayıp, topraktaki suyun miktarı ve bitkinin ihtiyacına göre aktif yollarla da yapılmaktadır (Taiz *et al.* 2015). Ancak soğuk stresi altında bitki solunumu ve enerji metabolizması adaptasyon stratejileri lehine işlediğinden, mısır fidelerinin enerjisinin büyük bölümünü strese karşı hayatta kalmak için savunma amaçlı kullandığı sonucu akla gelmektedir. Ayrıca hücre ve membranlarda meydana gelen soğuk kaynaklı bozulmalar ve enzim aktivitelerinde ortaya çıkan inhibisyonlar da köklerin uzama ve büyümesindeki inhibisyona katkı sağlamış olabilirler. Dahası, köklerin soğuk stresine cevaben üretmesi gereken ve su dengesinin ayarlanmasında önemli rolü olan osmoprotektanların, enerji azlığından dolayı yeterli oranda sentezlenememesi de yine bu inhibisyonun başlıca nedenlerinden biri olarak ifade edilebilir (Yoshida *et al.* 1997).

Büyüme ve gelişmenin hızlanması için, hem enerji hem de hammaddeye ihtiyaç vardır. Karnitin uygulanan bitkilerde kontrol bitkilerine kıyasla kök uzamasında meydana gelen %25'e varan artışların (Şekil 4.18), karnitinin solunum metabolizmasını hızlandırarak daha fazla enerji üretimine yol açmasından ve yine TCA döngüsüyle alakalı olan biyosentez mekanizmalarını daha fazla işler kılmasından kaynaklandığı söylenilebilir. Soğuk stresi altında karnitin uygulanan bitkilerde ise sadece soğuk uygulanan bitkilere kıyasla, kök büyümesinde görülen inhibisyonun hafiflemesi de bu yaklaşımla açıklanabilir. Karnitin-indüklü solunum artışı, bir taraftan hem üretilen enerji miktarındaki artış, hem de TCA'yla bağlantılı biyosentez reaksiyonlarının aktivasyonu ile bitki genelinde savunma mekanizmalarının geliştirilmesine, diğer taraftan da stres şartlarında olsa bile mısır bitkisinde büyüme ve gelişmenin devamlılığına katkı sağlamıştır. 1 mM karnitin verilen *Arabidopsis* bitkisinin yabanil tipi ile yapılan çalışmada, primer kök uzunluğunda önemli bir değişim kaydedilmemesine rağmen lateral kök uzunluğunda istatistiki olarak oldukça ciddi bir artış kaydedilmiştir (Lelandais-Brière *et al.* 2007). Bir başka çalışmada ise, tuz stresi altında büyütülen *Arabidopsis* bitkilerinin (Colombia ve ABA mutantlarında) hem karnitin hem de stresle kombine uygulamalarının kök uzunluğunda kontrole kıyasla artışlar kaydedilmiştir (Gökce 2015).

Köklere benzer olarak, soğuk stresine maruz kalan bitkilerin yaprak uzunluklarında ve yaprak yüzey alanlarında da belirgin inhibisyonların meydana geldiği görülmüştür (Şekil 4.19/4.21). Bu durum, köklerden su alınının azalmasıyla bağlantılı olarak, yapraklara taşınan su miktarındaki düşüşle birlikte turgorun azalması, stomaların kapanması ve neticede fotosentezin karbon reaksiyonlarının sekteye uğramasıyla ilgili olabilir (Bakht *et al.* 2006; Aghaee *et al.* 2011). Dahası, düşük sıcaklıklar tarafından enzim aktivitelerinde meydana gelen düşüşler de fotosentez verimini bir kat daha indirgeyerek şeker üretiminin azalmasına ve neticede kuru madde miktarının düşmesine neden olur. Ancak mevcut çalışmada soğuk uygulanan bitkilerin kuru madde içeriklerinde artış belirlenmiş olup (Şekil 4.22), bu artışın osmoprotektan maddelerin sentezindeki artıştan kaynaklandığı düşünülebilir. Karnitin uygulanan bitkilerde ise beklenildiği gibi hem yaprak uzunluklarında hem de yaprak yüzey alanlarında önemli artışların olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19/4.21). Karnitin ayrıca bu parametrelerde gözlenen soğuk

stresinin neden olduğu inhibisyonları da önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir. Öte yandan, karnitinin solunum mekanizmasında da izah edildiği gibi, fotosentez dahil çeşitli biyosentez mekanizmaları üzerine uyarıcı etkisi nedeniyle, bitki kuru madde içeriğinde önemli artış sağladığı da belirlenmiştir. Kuraklık stresi altında iki farklı arpa genotipinde (Cam/B1/CI ve Maresi) çalışılmış ve Cam/B1/CI’de bitki başına düşen kuru madde içeriğinin stres koşullarında arttığı belirlenmiştir (Bandurska *et al.* 2017). Su ve nitrojen stresine maruz kalan buğday bitkisi ile yapılan bir çalışmada kuru madde içeriğinde artışlar kaydedilmiştir (Shi *et al.* 2014). Başka bir çalışmada ise, *Arabidopsis thaliana*’nın yabanil kolombiya (Col-0) ekotipine kuraklık stresi altında tek başına karnitin uygulamasının kuru madde içeriğini kontrole kıyasla istatistiki olarak anlamlı olmasada artırdığı, stresle kombine uygulamasının ise ciddi artışlar sergilediği kaydedilmiştir (Çancıoğlu 2014). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ayrıca karnitinin osmoprotektan özelliğinin de olduğu belirlenmiş olup (Charrier *et al.* 2012; Çancıoğlu 2014; Çebi 2014), bu durum bize karnitin metabolizma üzerinde, sadece solunum reaksiyonlarının hızını artıran bir tür aktivatör değil, aynı zamanda osmoprotektan özelliğiyle de etkili olabileceğini göstermesi bakımından büyük önem arz etmektedir.

Bitkilerde köklerden su alınımının yanı sıra, bitki hücrelerinde gerçekleşen tüm metabolik olaylar ve fotosentez gibi temel metabolik olayların tamamı hücre zarları ve organel membranlarıyla doğrudan ya da dolaylı olarak irtibatlıdır. Bu nedenle membranların yapılarında meydana gelecek yapısal veya fonksiyonel değişimler metabolik reaksiyonların hızını ve sürdürülebilirliğini ciddi derecede olumsuz yönde etkileyecektir. Düşük sıcaklıklar hücre ve organel mebranlarında elastikiyeti indirgeme, yapılarındaki uyumu ve yeni lipidlerin yapıya dahil olmasını önleme, akıcılığı azaltma, fofolipidler, steroller ve proteinlerin lateral difüzyonunu artırma, zara bağlı proteinlerin işlevinde bozulma, seçici geçirgenliğin kaybolmasına bağlı olarak iyon kaçaklarında artma ve membran bağlı enzimlerin aktivitelerinde anormal derecelerde azalma gibi çok yönlü hasarlara neden olmaktadır (Bakht *et al.* 2006; Upchurch 2008; Lukatkin *et al.* 2012). Özellikle soğuk stresi altında, membranlarda meydana gelen akıcı-jel yapıdan katı-jel yapıya doğru olan faz değişimi nedeniyle, membranlarda gerçekleşen transport işlemleri sekteye uğrar. Yine enzimlerin aktivitelerinde inhibisyonların ortaya çıkmasıyla birlikte,

bitkide stresin ilk etkileri (primer etkiler) ortaya çıkmış olur. Stresin şiddeti ve süresine bağlı olarak ortaya çıkan bu hasarlar, stresin devamı halinde matlaşma, büzüşme, sararma, kararma ve çürüme gibi hasarların (sekonder etkiler) oluşmasını kaçınılmaz kılarak bitkinin ölümüne varan hasarlara sebebiyet verir. Primer etkiler oluşur oluşmaz stres şartları ortadan kalkar ise bitki normal yaşantısına devam edebilir. Ancak sekonder etkiler görüldükten sonra oluşan hasarların geriye dönüşü yoktur, yani ölüm kaçınılmaz olur. Şu da iyi bilinmektedir ki, stres altındaki bitkide primer etkiler ortaya çıkmadan sekonder etkiler oluşmaz. Bu nedenle primer etkilerin yaşandığı hücre ve organel zarlarının stres şartları altında yapı ve fonksiyonlarının bozulmaması, bitkinin direnç gösterebilmesi için hayati önem arz etmektedir. Hücresel zarların konumuzla ilgili öneminden dolayı zarların yapısı hakkında bazı bilgileri bir araya getirmek gerekirse; zarlar ikili lipid tabakasından meydana gelmektedir. Bunlar fosfolipid ve glikolipid tabiatında olup, zarların seçici geçirgenliğinden sorumludur. Yine bu lipid tabakları içerisinde gömülü halde olan çok değişik proteinler de vardır ki, bunlar da transport, enerji dönüşümü ve haberleşme gibi zar fonksiyonlarından sorumludurlar. Membranlardaki fosfolipid ve glikolipidler, doymuş ve doymamış yağ asitlerinden oluşmaktadır (Yadav 2010). Bu iki yağ asidinin birbirine oranları membranların akıcılığını belirler. Membranlardaki doymamış yağ asitlerinin oranının yüksek olması, geçiş sıcaklıklarında katı faza değişim hızını azaltır ve hücrelerin düşük sıcaklığa daha fazla tolerans göstermelerini sağlar (Yadav 2010). Bu bilgilerden hareketle, membranların hücre için, lipidlerin de membranların yapısı ve strese tolerans oluşturmaları için çok önemli olduğunu söylemek mümkündür. İşte bu sebeple bu araştırmada mısır bitkilerinin hem total lipid içerikleri, hem de doymuş ve doymamış yağ asitlerinin miktarları belirlenerek, karnitin ve soğuk uygulamalarının membranlar üzerine etkilerinin değerlendirilmesi nisbeten çalışmaya farklı bir bakış açısı katacaktır.

Solunum metabolizmasında da tartışıldığı gibi, soğuk stresi ve karnitin uygulamaları bitkilerin total lipid içeriklerini istatistiki olarak önemli düzeyde azaltıcı etki gösterdi. Ayrı ayrı soğuk ve karnitin uygulamalarında %21'lere varan bu inhibisyon, ikisi birlikte uygulandığında %56'lara kadar ulaştı (Şekil 4.2). Total lipid içeriğinde belirlenen bu inhibisyon, solunumdan elde edilen bulgularla ve artan lipaz aktivitesi ile birlikte

değerlendirildiğinde, soğuk stresi altında artan enerji talebini karşılayabilmek için lipidlerin solunuma girmelerinin teşvik edildiğini ve bu nedenle lipid içeriğinde azalmalar meydana geldiğini kolaylıkla söyleyebiliriz. Benzer şekilde karnitin uygulaması içinde aynı durum söz konusudur. Karnitin uygulanan bitkilerde büyüme ve gelişme hızını artırmak için lipid katabolizmasının hızlandığı ve böylelikle hücrelerdeki lipid içeriklerinin azaldığı söylenebilir. Nitekim karnitin ile birlikte soğuk uygulanan bitkilerde en düşük lipid içeriğinin belirlenmesi, stres altındaki bitkide hem savunmaya yönelik sentez olayları, hem de büyümenin sürdürülebilmesi için ihtiyaç duyulan enerji talebindeki artış nedeniyle, solunuma substrat olarak lipidlerin de sokulduğu anlamına gelmektedir.

Bu bağlamda, mevcut araştırmada gerek soğuk stresi gerekse karnitin uygulamalarının, doymuş ve doymamış yağ asidi içeriklerinde bariz değişimlere neden olduğu belirlendi (Çizelge 4.1). Soğuk stresi ve karnitin uygulamalarının genel olarak doymuş yağ içeriklerinde azalmaya ve doymamış yağ asidi içeriklerinde ise bir artışa yol açtığı tespit edildi. Bu durumun, membranların akıcılığını korumaya ve bitki toleransını artırmaya yönelik bir adaptasyon olduğu iyi bilinmektedir. Nitekim doymuş/doymamış yağ asidi içeriği üzerine karnitinin etkisinin soğukun etkisine kıyasla çok daha fazla olduğu belirlendi. Karnitin uygulanan bitkilerde, doymuş yağ asidi içeriklerinde çok daha büyük düşüşler belirlenmekle birlikte, doymamış yağ asidi içeriklerindeki artışların birbirlerine daha yakın olduğu tespit edildi. Ancak total lipid içerikleri göz önüne alındığında, karnitin uygulanan bitkilerdeki düşük lipid miktarına rağmen, çok yüksek oranda doymamış yağ asidi içeriğinin belirlenmiş olması, oran olarak karnitinin soğuğa dirençte çok önemli bir katkı sağlayıcı özellikte olduğunu açıkça ortaya koymuştur. Nitekim soğuk+karnitin grubunda en yüksek doymamış yağ asidi oranının kaydedilmiş olması, karnitinin soğuğa karşı direnci artırıcı etkisinin aydınlatılması yolunda önemli bir bulgu niteliği taşımaktadır. Doymuş yağ asitlerinin doymamış yağ asitlerine dönüşümünün desaturaz enzimlerinin katalizörlüğünde gerçekleştiği ve bu dönüşümde indirgeyici eşdeğerlere ihtiyaç duyduğu bilinmektedir (Yee *et al.* 2013). Bu nedenle, mevcut çalışmada soğuk ve/veya karnitin uygulamaları neticesinde doymuş yağ asitlerinin oranında azalma meydana gelirken doymamış yağ asitlerinin oranında artış kaydedilmiş olması, soğuk ve

karnitin uygulamaları tarafından uyarılan solunumdan veya glikolizle bağlantılı pentoz fosfat yolundan kaynaklanan indirgeyici güç miktarındaki artışlara bağlanabilir.

Soğuk stresinin yukarıda izah edilen mekanizmalar üzerinde yaptığı değişiklikler haricinde, ROT'ların üretimini ve birikimini arttırdığı da bilinen bir gerçektir. Bitkilerde metabolik yolların yan ürünü ya da sinyal bileşikler olarak düzenli üretiliyor olsalar da (Zelko *et al.* 2002; Halliwell and Gutteridge 2015), ROT'ların aşırı derecelerde üretilmesi, bitkilerde “oksidatif stres” olarak bilinen ve ölüme varan hasarların oluşumuna neden olan bir durumdur (Fridovich 1995). ROT üretiminin başlıca merkezleri kloroplast ve mitokondrilerdir (Suzuki and Mittler 2006). Oksijenin tek elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşan ilk ürün olan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), kloroplastlarda meydana gelen Mehler reaksiyonu ve/veya mitokondrideki elektron sızıntıları sonucu oluşur ve hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ve singlet oksijen gibi diğer reaktif oksijen türlerinin oluşmasını katalizler (Alscher *et al.* 1997). $O_2^{\cdot-}$ aslında çok fazla reaktif bir ROT türü değildir, ancak hidrojen peroksit (H_2O_2) ve $OH^{\cdot}$ radikallerinin öncülü olarak işlev görmesi nedeniyle çok tehlikelidir. $O_2^{\cdot-}$ anyonundan meydana gelen H_2O_2 non-radikal olup, DNA kırılmalarına, protein denatürasyonlarına ve aynı zamanda kloroplast stromasının tioredoksin enzimleri gibi tiol içeren enzimlerin inaktivasyonuna neden olmaktadır (Hagar *et al.* 1996). Mevcut çalışmada düşük sıcaklık stresine maruz bırakılan mısır bitkilerinde $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 içeriklerinde sırası ile %23 ve %30 oranında önemli artışlar kaydedilmiştir (Şekil 4.24/4.25). Bu sonuç, önceki araştırmacıların elde etmiş olduğu sonuçlarla da uyumluluk göstermektedir. Soğuk stresine maruz bırakılan buğday bitkilerinde hem $O_2^{\cdot-}$ hem de H_2O_2 içeriklerinde önemli artışların meydana geldiği bildirilmiştir (Turk *et al.* 2014). Buğday bitkisi ile yapılan başka bir çalışmada, soğuk stresinin $O_2^{\cdot-}$ içeriğinde artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Chu *et al.* 2010). Bu durum yukarıda da ifade edildiği gibi soğuk stresi altında artan solunum hızı ve ETS'ye aşırı elektron yüklemesi yapılması sonucunda radikal üretiminin aşırı artması şeklinde yorumlanabilir. $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 içeriklerinde soğuk kaynaklı artışlar, soğukla beraber karnitin uygulamaları ile yatıştırılmış ve bu reaktiflerin miktarında dikkate değer azalmaların olduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.24/4.25). ROT oranındaki bu azalma,

karnitinin antioksidan sistem üzerine aktive edici etkisi ile olabileceği gibi, karnitinin bizzat kendi antioksidan ve ozmolit özelliği göstermesi sayesinde vuku bulmuş olabilir. Nitekim karnitinin H_2O_2 süpürme kapasitesinin α -tokoferol ile aynı seviyede bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Gulcin 2006). Literatürde karnitinin ROT'lar üzerine etkilerini ortaya koyan araştırma bulguları mevcuttur. Bu çalışmalarda; karnitinin tuz stresine maruz kalan Arabidopsis'in ABA mutantlarında H_2O_2 içeriğini azalttığı ve antioksidan sistemi aktifleştirdiği (Gökce 2015); kuraklık stresi altında büyütülen Arabidopsis'te H_2O_2 miktarını ve MDA içeriğini azalttığını (Çebi 2014); yine Arabidopsis'te tuz ve ozmotik stres koşullarında yapılan bir çalışmada stres toleransını artırdığı bildirilmiştir (Charrier *et al.* 2012). Ayrıca karnitin uygulaması ile alternatif solunum yollarının aktivasyonunda meydana gelen artış da, ROT üretiminin indirgenmesine katkı sağladığı kuvvetle muhtemeldir. Bu bulguları destekleyici yönde, literatürde artan AOX aktivitesine bağlı olarak ROT seviyelerinde azalma meydana geldiğini bildiren çok sayıda araştırma bulguları mevcuttur (Mcintosh 1994; Purvis 1997; Atkin and Tjoelker 2003; Erdal *et al.* 2015; Erdal and Genisel 2016).

Soğuk stresinin hücre ve organel membranlarında yol açtığı fiziksel değişikliklerin, zar fonksiyonlarının bozulmasına, özellikle mitokondri ve kloroplast zarlarının hasar alması sonucunda, hücrede ROT üretiminin artışına neden olduğu ve bunların da hücrede ölüme kadar varabilen ciddi hasarlar meydana getirdiği bilinmektedir. Hücre ve organel membranlarının fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda, membran lipid yapısının değişmesine ve hücre yapı ve fonksiyonlarının bozulmasına neden olan “lipid peroksidasyonu (LPO)” meydana gelmektedir (Thomashow 1999). LPO'nun son ürünü ve önemli bir indikatörü olan MDA miktarının ölçülmesi, zarlardaki dönüşümsüz hasarlarının belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir (Balestrasse *et al.* 2010). Yapılan birçok çalışmada soğuk stresinde meydana gelen ilk hasarın, hücre zarlarının bütünlüğünü kaybetmesi olduğu bildirilmiştir (Turan ve Ekmekçi 2008). Bu sebeple soğuk stresinin bitkiler üzerinde meydana getirdiği hasarı belirlemek için MDA miktarının ölçülmesi önemli bir yaklaşımdır. Mevcut çalışmada soğuk stresine maruz kalan mısır bitkilerinde kontrole kıyasla MDA içeriğinde %69 oranında belirgin bir artış belirlenmiştir (Şekil 4.26). Bu bulgu, önceki

araştırmacıların rapor etmiş olduğu sonuçlarla da uyumludur. Şöyle ki; soğuk stresine maruz bırakılan buğday bitkisinden izole edilen membranlarda MDA içeriğinde ciddi artışlar belirlemiş (Pukachi *et al.* 1991), benzer şekilde soğuk stresine maruz bırakılan mısır bitkilerinin de MDA içerikleride önemli artışlar kaydedilmiştir (Turk and Erdal 2015). MDA’da belirlenen artışlar, soğuk stresi altında O_2^- ve H_2O_2 miktarında meydana gelen aşırı artış ile uyumluluk göstermektedir. Bununla birlikte, karnitin uygulaması ile O_2^- ve H_2O_2 içeriklerinde meydana gelen azalma ile MDA içeriğinde kaydedilen düşüş arasında pozitif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

Hücre zarlarında meydana gelen hasarın seviyesinin daha iyi anlaşılabilmesi için yapılan çalışmalardan biri de eletrolit kaçağı (EL) ve % donma hasarı seviyelerinin belirlenmesidir. Mevcut araştırmada soğuk stresi neticesinde iyon kaçağı ve % donma hasarında belirgin artışlar kaydedilmiştir (Şekil 4.27). Literatürde soğuk stresi altında EL’nin arttığını belirten çalışmalar mevcuttur. Bunlara örnek olarak; nohut bitkisi ile yapılan bir çalışmada soğuk stresi uygulanan nohut bitkisinde EL değerinin arttığı rapor edilmiştir (Genisel *et al.* 2013). Benzer şekilde, mısır bitkileri ile yapılan farklı bir çalışmada da soğuk stresinin zarlardaki EL oranını artırdığı bildirilmiştir (Erdal 2012). Bu araştırmada, karnitin uygulamasının soğuk kaynaklı EL artışını önemli derecede azalttığı belirlenmiştir. Böylelikle hem O_2^- ve H_2O_2 içeriklerinde meydana getirdiği azalma, hem MDA ve EL seviyelerini önemli oranda indirmesi, hem de membran yapısına katılan doymamış yağ asitlerinin içeriklerinde artış sağlaması nedeniyle, karnitin hücre zarlarının yapısının korunmasına katkı sağladığı ve bu parametreler üzerine gösterdiği olumlu etkisi ile soğuğa karşı direnç oluşturduğunu söylemek mümkündür.

Membranlar üzerine olumsuz etkilerinin yanı sıra; oksidatif stres, hücrelerde ayrıca protein karbonilasyonu, disülfid ve ditrozin köprülerinin oluşması ve hidrofobik etkileşimlerden dolayı protein yığılmalarına da neden olmaktadır (Tambussi *et al.* 2004). Protein oksidasyonu, proteinlerin ROT’lar ile reaksiyonu sonucu meydana gelen bir durumdur. Proteinlerin oksidasyonu sonucu, aromatik gruplarda ve alifatik amino asit yan zincirlerinde bazı değişimler meydana gelirken, bazı amino asit yapılarının da karbonil

türevlerine dönüştüğü görülmektedir (Stadtman and Levine 2003). Bu nedenle karbonil grubu içeriği, oksidatif protein hasarının genel bir indikatörü ve protein oksidasyonunun en yaygın kullanılan indikatörüdür (Lenz *et al.* 1989; Levine *et al.* 1990). Stres şartları altında reaktif karbonil bileşik içeriğinin arttığı bilinen bir durumdur (Levine *et al.* 1990; Çebi 2014). *Arabidopsis thaliana* bitkisinin tohum çimlenmesi sırasında oluşan ROT'ların, proteinler üzerinde neden olduğu oksidasyon sonucunda karbonil içeriğinde artış gözlemlendiği rapor edilmiştir (Job *et al.* 2005). Mevcut araştırmada da, soğuk uygulamasının, mısır bitkilerinin karbonil içeriklerinde %78 oranında artışa neden olduğu belirlenmiş, karnitin uygulamasının ise karbonil içeriğinde istatistiki olarak önemli bir azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir (Şekil 4.28). Bu hafifletici etkiyi, karnitinin ROT seviyelerinde neden olduğu indirgeyici etkiyle açıklamak mümkündür.

SONUÇLAR

- Eksojen olarak uygulanan karnitin, bitkiler tarafından absorbe edilerek hücre metabolizmasında aktif bir rol oynadı.
- Karnitin, bitkilerde lipid katabolizmasını hızlandırarak lipidlerin solunuma katılmasını teşvik etti.
- Karnitin hızlandırdığı lipid katabolizması neticesinde, mısır bitkilerinin total lipid içeriklerinde bariz azalmalar belirlendi.
- Karnitin tarafından lipidlerin solunuma sokulmasının teşvik edilmesiyle, TCA döngüsünün hızında önemli artış meydana geldi.
- TCA döngüsünün hızındaki artışa paralel olarak, azot asimilasyonunda (protein sentezi) da önemli bir artış meydana geldi.
- Artan azot asimilasyonu, hem osmoportektan özelliğinde olan azotlu bileşiklerin sentezini, hem de dolaylı olarak fotosentez verimliliğini uyardı.
- TCA döngüsünde üretilen, indirgen güçlerin miktarındaki artış, mitokondriyal ETS'nin önemli oranda aktive olmasını ve total solunum hızının da önemli düzeyde artmasını sağladı.
- Artan total solunum, hem sitokrom yolunun hem de alternatif solunum yollarının aktivasyonundan kaynaklandığı enzimatik ve moleküler düzeyde kanıtlandı.

- Artan sitokrom yolunun aktivasyonu ile hücresel enerji içeriğinde artış sağlandı.
- Alternatif solunum yolunda meydana gelen artış, mitokondriyal ETS'de oluşabilecek aksaklıkları (çevreye elektron saçılmaları) gidermek suretiyle ROT oluşumunun indirgenmesini sağladı.
- Azalan ROT içeriğiyle bağlantılı olarak, normal ve soğuk şartlarda bulunan bitkinin membran ve proteinlerinde meydana gelebilecek oksidatif hasarlar azaltıldı.
- Karnitin, doğrudan ya da dolaylı olarak membranların lipid kompozisyonlarını doymamış yağ asitlerinin lehine çevirerek doymamış yağ asiti içeriğini artırdı.
- Karnitin, hem solunum metabolizması üzerine uyarıcı etkileri, hem de sahip olduğu osmoprotektan etkisi sayesinde mısır bitkisinin soğuğa direncini artırdı.
- Karnitin tüm bu etkileri sayesinde kök ve gövde büyümesi üzerine, soğukun neden olduğu inhibisyonu azalttı.
- Karnitin hücrelerde lipid metabolizması üzerine sadece enzimatik veya translasyonel olarak değil, transkripsiyonel düzeyde de etki gösterdi.
- Yaptığımız moleküler düzeydeki analizler ile lipid metabolizması, solunum reaksiyonları ve azot özümlemesi olaylarının birbirleriyle sıkı bağlantı içerisinde olduklarını gösterdi.
- Soğuk stresine maruz kalan bitkilerde karnitinin uyarıcı rolü ile TCA, azot asimilasyonu ve ETS hızında önemli artışlar kaydedildi.
- Karnitinden kaynaklanan artan TCA hızı ve ATP üretimine bağlı olarak soğuğa karşı direnç artırıcı bileşiklerin biyosentezi hızlandı.
- Soğuk stresine cevaben alternatif solunum yolunda belirlenen artış, karnitin uygulamasıyla çok daha ileri seviyelere taşınarak, ROT üretiminin baskılanmasına yol açtı.
- Soğuk stresıyla hızı azalan sitokrom yolunun, karnitin tarafından belirli dereceye kadar stres altında dahi hızlandığı belirlendi.
- Normal şartlarda, ROT üretimini önemli seviyede baskılayarak, membran ve proteinlerin yapısında meydana gelmekte olan hasarları azaltıcı etki gösteren karnitin, soğuk stresi altındaki bitkilerde de bu etkisini gösterdi.
- Membran bileşenlerinde meydana gelen soğuk indüklü değişim, karnitin tarafından daha ileri seviyelere taşındı.

- Soğuk stresi altında adaptasyon stratejileri lehine değişen enerji dengesi, karnitinin etkisiyle büyüme ve gelişme yönünde yeniden düzenlenmek suretiyle, soğuk indüklü büyüme inhibisyonu belirli oranlarda yatıştırıldı.

Tüm bu sonuçlar açıkça göstermektedir ki; karnitin tarafından lipidlerin solunuma sokulmasının teşvik edilmesiyle hücrelerde gerçekleşen tüm metabolik reaksiyonların kavşak noktası olan mitokondriyal solunumun hızında, gerek normal şartlarda ve gerekse stresli şartlar altında önemli artışlar meydana gelmektedir. Bunun neticesinde, sentezlenen hücresel enerji miktarı ve solunumla bağlantılı olan, gerek büyüme ve gerekse soğuğa direnç mekanizması ile ilgili yan yolların aktivitesi de artmaktadır. Mevcut araştırmada, karnitin adı verilen bu özel bileşiğin, bitkilerin soğuğa direnci üzerindeki etkileriyle alakalı olarak, ilk kez bu araştırmada test edilmiş olduğundan, elde edilen tüm bulguların, literatür açısından bir ilk olma özelliği söz konusudur. Bu bakımdan, bu bulgular bitki bilimi ve özellikle bitki stres fizyolojisinde önemli bir boşluğu doldurma anlamında öncü olma niteliğinde olup, bu özelliğiyle mevcut araştırmadan elde edilen bulguların, ilerleyen süreçte bitki stres fizyolojisi ve lipid metabolizması ile alakalı daha birçok araştırmaya ilham kaynağı olacağı kanaatini taşımaktayız.

KAYNAKLAR

- Adrio, JL, Demain, AL., 2014. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules* 4 (1):117-139. doi:10.3390/biom4010117
- Aghaee, A., Moradi, F., Zare-Maivan, H., Zarinkamar, F., Irandoost, HP., Sharifi, P., 2011. Physiological responses of two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to chilling stress at seedling stage. *Afr J Biotechnol* 10 (39):7617-7621
- Akhmedov, D., Braun, M, Matak, C., Park, KS., Pozzan, T., Schoonjans, K., Rorsman, P., Wollheim, CB., Wiederkehr, A., 2010. Mitochondrial matrix pH controls oxidative phosphorylation and metabolism-secretion coupling in INS-1E clonal beta cells. *FASEB J* 24 (11):4613-4626. doi:10.1096/fj.10-162222
- Alonso, JR., Cardellach, F., Lopez, S., Casademont, J., Miro, O., 2003. Carbon monoxide specifically inhibits cytochrome C oxidase of human mitochondrial respiratory chain. *Pharmacol Toxicol* 93(3):142-146. doi:DOI 10.1034/j.1600-0773.2003.930306.x
- Alscher, RG., Donahue, JL., Cramer, CL., 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol Plantarum* 100 (2):224-233. doi:DOI 10.1111/j.1399-3054.1997.tb04778.x
- Alves, MH, Campos-Takaki, GM, Porto, ALF, Milanez, AI., 2002. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Braz J Microbiol* 33 (4):325-330
- Angelidis, AS., Smith, GM., 2003. Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Applied and Environmental Microbiology* 69(12):7492-7498. doi:10.1128/Aem.69.12.7492-7498.2003
- Anonymous, 2018a. <http://slideplayer.com/slide/5321314/>
- Anonymous, 2018b. http://proteopedia.org/wiki/index.php/Krebs_cycle_step_1
- Anonymous, 2018c. <http://www.mikeblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture36/Lecture36.htm>, Oxidative phosphorylation: Structure and function of ATP synthase, mitochondrial transport systems, and inhibitors of ox Phos. Bioc 460 Spring 2008 – Lecture. 16 Mayıs 2018’de erişildi.
- Anoop, VM., Basu, U., McCammon, MT., McAlister-Henn, L., Taylor, GJ., 2003. Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol* 132 (4):2205-2217. doi:10.1104/pp.103.023903
- Antonenkova, VD., Hiltunen, JK., 2012. Transfer of metabolites across the peroxisomal membrane. *Bba-Mol Basis Dis* 1822(9):1374-1386. doi:10.1016/j.bbadis.2011.12.011
- Araujo, WL., Nunes-Nesi, A., Nikoloski, Z., Sweetlove, LJ., Fernie, AR., 2012. Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. *Plant Cell Environ* 35 (1):1-21. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02332.x
- Arduini, A., 1992. Carnitine and Its Acyl Esters as Secondary Antioxidants. *American Heart Journal* 123 (6):1726-1727. doi:Doi 10.1016/0002-8703(92)90850-U

- Arnold, S., Kadenbach, B., 1997. Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase. *Eur J Biochem* 249 (1):350-354. doi:DOI 10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00350.x
- Aroca, R., Tognoni, F., Irigoyen, JJ., Sanchez-Diaz, M., Pardossi, A., 2001. Different root low temperature response of two maize genotypes differing in chilling sensitivity. *Plant Physiol Bioch* 39 (12):1067-1073. doi:Doi 10.1016/S0981-9428(01)01335-3
- Arrigoni-Martelli, E., Caso, V., 2001. Carnitine protects mitochondria and removes toxic acyls from xenobiotics. *Drugs under Experimental and Clinical Research* 27 (1):27-49
- Atkin, OK., Bruhn, D., Hurry, VM., Tjoelker, MG., 2005. Evans Review No. 2: The hot and the cold: unravelling the variable response of plant respiration to temperature. *Functional Plant Biology* 32 (2). doi:10.1071/fp03176
- Atkin, OK., Cummins, WR., 1994. The effect of root temperature on the induction of nitrate reductase activities and nitrogen uptake rates in arctic plant species. *Plant and Soil* 159 (2):187-197. doi:10.1007/bf00009280
- Atkin, OK., Tjoelker, MG., 2003. Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends Plant Sci* 8(7):343-351. doi:10.1016/S1360-1385(03)00136-5
- Aubert, S., Bligny, R., Douce, R., Gout, E., Ratcliffe, RG., Roberts, JKM., 2001. Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by C-13 and P-31 nuclear magnetic resonance. *J Exp Bot* 52 (354):37-45. doi:DOI 10.1093/jexbot/52.354.37
- Avin-Wittenberg, T., Tzin, V., Angelovici, R., Less, H., Galili, G., 2012. Deciphering energy-associated gene networks operating in the response of Arabidopsis plants to stress and nutritional cues. *Plant J* 70(6):954-966. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.04926.x
- Baena-Gonzalez, E., Sheen, J., 2008. Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci* 13 (9):474-482. doi:10.1016/j.tplants.2008.06.006
- Bakht, J., Bano, A., Dominy, P., 2006. The role of abscisic acid and low temperature in chickpea (*Cicer arietinum*) cold tolerance. II. Effects on plasma membrane structure and function. *J Exp Bot* 57 (14):3707-3715. doi:10.1093/jxb/erl120
- Balestrasse, KB., Tomaro, ML., Batlle, A., Noriega, GO., 2010. The role of 5-aminolevulinic acid in the response to cold stress in soybean plants. *Phytochemistry* 71 (17-18):2038-2045. doi:10.1016/j.phytochem.2010.07.012
- Bandurska, H., Niedziela, J., Pietrowska-Borek, M., Nuc, K., Chadzinikolau, T., Radzikowska, D., 2017. Regulation of proline biosynthesis and resistance to drought stress in two barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes of different origin. *Plant Physiology and Biochemistry* 118:427-437
- Barbareschi, D., Longo, GP., Servettaz, O., Zulian, T., Longo, CP., 1974. Citrate synthetase in mitochondria and glyoxysomes of maize scutellum. *Plant Physiol* 53 (6):802-807
- Bassi, R., Sandona, D., Croce, R., 1997. Novel aspects of chlorophyll a/b-binding proteins. *Physiol Plantarum* 100(4):769-779. doi:DOI 10.1034/j.1399-3054.1997.1000404.x

- Beisson, F., Tiss, A., Riviere, C., Verger, R., 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur J Lipid Sci Tech* 102 (2):133-153. doi:Doi 10.1002/(Sici)1438-9312(200002)102:2<133::Aid-Ejlt133>3.3.Co;2-O
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. *Biochemistry*. 5th edn. W. H. Freeman and Company, New York
- Berthold, D.A., Stenmark, P., 2003. Membrane-bound diiron carboxylate proteins. *Annu Rev Plant Biol* 54:497-517. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134915
- Binienda, ZK, Ali, S.F., 2001. Neuroprotective role of L-carnitine in the 3-nitropropionic acid induced neurotoxicity. *Toxicology Letters* 125(1-3):67-73. doi:Doi 10.1016/S0378-4274(01)00415-5
- Blaber, M., 2001. The TCA Cycle: Overview, <http://www.mikeblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture36/Lecture36.htm>, 16 Mayıs 2018'de erişildi.
- Bolouri-Moghaddam, M.R., Le, R., Xiang, L., Rolland, F., Van den Ende, W., 2010. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *Febs J* 277 (9):2022-2037. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07633.x
- Bourdin, B., Adenier, H., Perrin, Y., 2007. Carnitine is associated with fatty acid metabolism in plants. *Plant Physiol Biochem* 45(12):926-931. doi:10.1016/j.plaphy.2007.09.009
- Borecky, J., Vercesi, A.E., 2005. Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: energy metabolism and stress. *Bioscience Reports* 25:3-4
- Boyer, P.D., 1997. The ATP synthase - A splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66:717-749. doi:DOI 10.1146/annurev.biochem.66.1.717
- Bravo, L.A., Saavedra-Mella, F.A., Vera, F., Guerra, A., Cavieres, L.A., Ivanov, A.G., Huner, N.P.A., Corcuera, L.J., 2007. Effect of cold acclimation on the photosynthetic performance of two ecotypes of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *J Exp Bot* 58(13):3581-3590. doi:10.1093/jxb/erm206
- Bray, E.A., 2000. Response to abiotic stress. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*:1158-1203
- Bremer, J., (1962) Carnitine in intermediary metabolism. The metabolism of fatty acid esters of carnitine by mitochondria. *J Biol Chem* 237:3628-3632
- Brown, D.A., London, E., 1998. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membrane Biol* 164 (2):103-114. doi:DOI 10.1007/s002329900397
- Bruggemann, W., Dauborn, B., Klaucke, S., Linger, P., Maaskantel, K., Wenner, A., 1995. Chilling sensitivity of photosynthesis - ecophysiological studies in 2 *Lycopersicon* species of different chilling tolerance. *Acta Physiol Plant* 17 (2):113-122
- Budde, R.J.A., Fang, T.K., Randall, D.D., Miernyk, J.A., 1991. Acetyl-coenzyme-A can regulate activity of the mitochondrial pyruvate-dehydrogenase complex insitu. *Plant Physiol* 95 (1):131-136. doi:DOI 10.1104/pp.95.1.131
- Burgess, N., Thomas, D.R., 1986. Carnitine acetyltransferase in pea cotyledon mitochondria. *Planta* 167 (1):58-65. doi:Doi 10.1007/Bf00446369
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen-toxicity. *Annu Rev Biochem* 58:79-110. doi:DOI 10.1146/annurev.bi.58.070189.000455
- Cai, L., Cao, A., Luo, Z., Mao, L., Ying, T., 2017. Ultrastructure characteristics and quality changes of low-moisture Chilgoza pine nut (*Pinus gerardiana*) during the

- near-freezing-temperature storage. *CyTA - Journal of Food* 15(3):466-473. doi:10.1080/19476337.2017.1297962
- Caldana, C., Li, Y., Leisse, A., Zhang, Y., Bartholomaeus, L., Fernie, AR., Willmitzer, L., Giavalisco, P., 2013. Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 73 (6):897-909. doi:10.1111/tpj.12080
- Calhoun, MW., Thomas, JW., Gennis, RB., 1994. The cytochrome-oxidase superfamily of redox-driven proton pumps. *Trends Biochem Sci* 19 (8):325-330. doi:Doi 10.1016/0968-0004(94)90071-X
- Cambillau, C., Vantilbeurgh, H., 1993. Structure of hydrolases - lipases and cellulases. *Curr Opin Struc Biol* 3 (6):885-895. doi:Doi 10.1016/0959-440x(93)90152-B
- Canovas, M., Bernal, V., Sevilla, A., Torroglosa, T., Iborra, JL., 2007. Salt stress effects on the central and carnitine metabolisms of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 96 (4):722-737. doi:10.1002/bit.21128
- Charrier, A., Rippa, S., Yu, A., Nguyen, PJ., Renou, JP., Perrin, Y., 2012. The effect of carnitine on *Arabidopsis* development and recovery in salt stress conditions. *Planta* 235 (1):123-135. doi:10.1007/s00425-011-1499-4
- Chu, JZ., Yao, XQ., Zhang, ZN., 2010. Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress. *Biol Trace Elem Res* 136(3):355-363. doi:10.1007/s12011-009-8542-3
- Coleman, RA., Lewin, TM., Van Horn, CG., Gonzalez-Baro, MR., 2002. Do long-chain acyl-coa synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways?^{1,2} *American Society for Nutritional Sciences* 132(8): 2123–2126
- Correa, C., Amboni, G., Assis, LC., Martins, MR., Kapczinski, F., Streck, EL., Quevedo, J., 2007. Effects of lithium and valproate on hippocampus citrate synthase activity in an animal model of mania. *Prog Neuro-Psychoph* 31(4):887-891. doi:10.1016/j.pnpbp.2007.02.005
- Costa, ADT., Nantes, IL., Jezek, P., Leite, A., Arruda, P., Vercesi, AE., 1999. Plant uncoupling mitochondrial protein activity in mitochondria isolated from tomatoes at different stages of ripening. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31(5):527-533
- Covey-Crump, EM., Attwood, RG., Atkin, OK., 2002. Regulation of root respiration in two species of *Plantago* that differ in relative growth rate: the effect of short- and longterm changes in temperature. *Plant Cell Environ* 25 (11):1501-1513. doi:DOI 10.1046/j.1365-3040.2002.00932.x
- Çancıoğlu, E., 2014. Kuraklık stresi altında karnitinin ROS sinyali ve antioksidan sistem üzerindeki etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir
- Çebi, B., 2014. Kuraklık stresi altında karnitin teşvikli proteinlerin tanımlanması. Yüksek Lisans, Ege Üniversitesi, İzmir
- Del-Saz, NF., Ribas-Carbo, M., McDonald AE., Lambers, H., Fernie, AR., Florez-Sarasa, I., 2018. An in vivo perspective of the role(s) of the alternative oxidase pathway. *Trends in Plant Science* 23(3):206-219
- de Virville, JD., Cantrel, C., Bousquet, AL., Hoffelt, M., Tenreiro, AM., Pinto, VV., Arrabaca, JD., Caiveau, O., Moreau, F., Zachowski, A., 2002. Homeoviscous and functional adaptations of mitochondrial membranes to growth temperature in soybean seedlings. *Plant Cell Environ* 25 (10):1289-1297
- Derewenda, ZS., 1994. Structure and function of lipases. *Adv Protein Chem* 45:1-52

- Dudkina, NV., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., Boekema, EJ., Braun, HP., 2006. Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends Plant Sci* 11 (5):232-240. doi:10.1016/j.tplants.2006.03.007
- Dunning, KR., Anastasi, MR., Zhang, VJ., Russell, DL., Robker, RL., 2014. Regulation of fatty acid oxidation in mouse cumulus-oocyte complexes during maturation and modulation by PPAR agonists. *Plos One* 9(2):1-11 DOI: 10.1371/journal.pone.0087327
- Durmuş, N., 2003. Büyümeyi düzenleyici maddelerin oksidatif stres üzerine etkileri Doktora, Karadeniz Teknik Üniversitesi Trabzon
- Eason, JR., Ryan D., Page, B., Watson, L., Coupe, SA., 2007. Harvested broccoli (*Brassica oleracea*) responds to high carbon dioxide and low oxygen atmosphere by inducing stress-response genes. *Postharvest Biol Tec* 43 (3):358-365. doi:10.1016/j.postharvbio.2006.10.001
- Ellis, BA., Poynten, A., Lowy, AJ., Furler, SM., Chisholm, DJ., Kraegen, EW., Cooney, GJ., 2000. Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 279 (3):E554-E560
- Elstner, EF., Heupel, A., 1976. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium-chloride - simple assay for superoxide-dismutase. *Anal Biochem* 70 (2):616-620. doi:Doi 10.1016/0003-2697(76)90488-7
- Ensminger, I., Busch, F., Huner, NPA., 2006. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. *Physiol Plantarum* 126 (1):28-44. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00627.x
- Erbas, H., Aydogdu, N., Usta, U., Erten, O., 2007. Protective role of carnitine in breast cancer via decreasing arginase activity and increasing nitric oxide. *Cell Biology International* 31 (11):1414-1419. doi:10.1016/j.cellbi.2007.06.007
- Erdal, S., 2010. Memeli cinsiyet hormonlarının arpa ve nohut bitkilerinin büyüme ve gelişmeleri üzerine etkileri. Doktora, Atatürk Üniversitesi, Erzurum
- Erdal, S., 2012. Androsterone-induced molecular and physiological changes in maize seedlings in response to chilling stress. *Plant Physiol Bioch* 57:1-7. doi:10.1016/j.plaphy.2012.04.016
- Erdal, S, Genisel, M., 2016. The property of progesterone to mitigate cold stress in maize is linked to a modulation of the mitochondrial respiratory pathway. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 28 (4):385-393. doi:10.1007/s40626-016-0076-4
- Erdal, S., Genisel, M., Turk, H., Dumlupinar, R., Demir, Y., 2015. Modulation of alternative oxidase to enhance tolerance against cold stress of chickpea by chemical treatments. *J Plant Physiol* 175:95-101. doi:10.1016/j.jplph.2014.10.014
- Erdal, S., Turk, H., 2016. Cysteine-induced upregulation of nitrogen metabolism-related genes and enzyme activities enhance tolerance of maize seedlings to cadmium stress. *Environ Exp Bot* 132:92-99. doi:10.1016/j.envexpbot.2016.08.014
- Esim, N., Atici, O., 2015. Effects of exogenous nitric oxide and salicylic acid on chilling-induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum*). *Front Life Sci* 8 (2):124-130. doi:10.1080/21553769.2014.998299
- Finnegan, PM., Soole, K., Umbach, AL., 2004. Alternative mitochondrial electron transport proteins in higher plants. In: Day DA, Millar AH, Whelan J (eds) *Plant Mitochondria: From Genome to Function*. doi:10.1007/978-1-4020-2400-9_9

- Fox, GG, Ratcliffe, RG, Robinson, SA, Stewart, GR., 1995. Evidence for deamination by glutamate-dehydrogenase in higher-plants - Commentary. *Can J Bot* 73 (7):1112-1115. doi:DOI 10.1139/b95-120
- Foyer, CH., LopezDelgado, H., Dat, JF., Scott, IM., 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plantarum* 100 (2):241-254. doi:DOI 10.1111/j.1399-3054.1997.tb04780.x
- Fraenkel, G., 1951. Effect and distribution of vitamin BT. *Arch Biochem Biophys* 34 (2):457-467
- Franken, J., Kroppenstedt, S., Swiegers, JH., Bauer, FF., 2008. Carnitine and carnitine acetyltransferases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a role for carnitine in stress protection. *Current Genetics* 53 (6):347-360. doi:10.1007/s00294-008-0191-0
- Fraser, F., Corstorphine, CG., Price, NT., Zammit, VA., 1999. Evidence that carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) is expressed in microsomes and peroxisomes of rat liver - Distinct immunoreactivity of the N-terminal domain of the microsomal protein. *Febs Letters* 446 (1):69-74. doi:Doi 10.1016/S0014-5793(99)00179-9
- Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64:97-112. doi:DOI 10.1146/annurev.bi.64.070195.000525
- Friguet, B., Stadtman, ER., Szweda, LI., 1994. Modification of glucose-6-phosphate-dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal - formation of cross-linked protein that inhibits the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 269 (34):21639-21643
- Fritz, IB., Marquis, NR., 1965. The role of acylcarnitine esters and carnitine palmitoyltransferase in the transport of fatty acyl groups across mitochondrial membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54 (4):1226-1233
- Fritz, IB., Yue, KT., 1963. Long-chain carnitine acyltransferase and the role of acylcarnitine derivatives in the catalytic increase of fatty acid oxidation induced by carnitine. *J Lipid Res* 4:279-288
- Fulda, M., Schnurr, J., Abbadi, A., Heinz, E., Browse, J., 2004. Peroxisomal acyl-CoA synthetase activity is essential for seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16 (2):394-405. doi:10.1105/tpc.019646
- Galliard, T., 1980. Degredation of acyl lipids: hydrolitic and oxidative enzymes. In: *Lipids: Structure and Function*, Academic Press., New York, 4:85-116
- Garciahorsman, JA., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, JX., Gennis, RB., 1994. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J Bacteriol* 176 (18):5587-5600
- Gaude, N., Brehelin, C., Tischendorf, G., Kessler, F., Dormann, P., 2007. Nitrogen deficiency in *Arabidopsis* affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytyl esters. *Plant J* 49 (4):729-739. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02992.x
- Gechev, T., Gadjev, I., Van Breusegem, F., Inze, D., Dukiandjiev, S., Toneva V., Minkov, I., 2002. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59 (4):708-714. doi:DOI 10.1007/s00018-002-8459-x
- Genisel, M., Demir, Y., Gorcek, Z., Turk, H., Yanmis, D., Karaman, A., Genc, E., Khosroushahi, FK., 2015. Effect of lead stress on antioxidant mechanism and DNA profile in different wheat cultivars. *J Environ Prot Ecol* 16 (4):1282-1296

- Genisel, M., Turk, H., Erdal, S., 2013. Exogenous progesterone application protects chickpea seedlings against chilling-induced oxidative stress. *Acta Physiol Plant* 35 (1):241-251. doi:10.1007/s11738-012-1070-3
- Genişel, M., 2010. Kemik tozu solüsyonu, CaCl₂ ve IAA uygulamalarının tuz stresi altındaki fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin fizyolojik parametreleri üzerine etkileri Y. Lisans, Atatürk Üniversitesi, Erzurum
- Gerbling, H., Gerhardt, B., 1988. Carnitine-acyltransferase activity of mitochondria from mung-bean hypocotyls. *Planta* 174 (1):90-93. doi:Doi 10.1007/Bf00394878
- Ghanem, A., Aboul-Enein HY., 2004. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron-Asymmetr* 15(21):3331-3351. doi:10.1016/j.tetsey.2004.09.019
- Glevarec, G., Bouton, S., Jaspard E., Riou, MT., Cliquet, JB., Suzuki, A., Limami AM., 2004. Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germinative growth in the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* 219 (2):286-297. doi:10.1007/s00425-004-1214-9
- Goa, KL., Brogden, RN., 1987. L-Carnitine - a preliminary review of its pharmacokinetics, and its therapeutic use in ischemic cardiac disease and primary and secondary carnitine deficiencies in relationship to its role in fatty-acid metabolism. *Drugs* 34 (1):1-24. doi:Doi 10.2165/00003495-198734010-00001
- Goel, P., Singh, AK., 2015. Abiotic stresses downregulate key genes involved in nitrogen uptake and assimilation in *Brassica juncea* L. *Plos One* 10 (11). doi:ARTN e014364510.1371/journal.pone.0143645
- Golper, TA., Ahmad, S., 1992. L-Carnitine administration to hemodialysis-patients - has its time come. *Seminars in Dialysis* 5 (2):94-98. doi:DOI 10.1111/j.1525-139X.1992.tb00119.x
- Gomez-Amores, L., Mate, A., Miguel-Carrasco, JL., Jimenez, L., Jos, A., Camean, AM., Revilla, E., Santa-Maria, C., Vazquez, CM., 2007. L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18 (8):533-540. doi:10.1016/j.jnutbio.2006.10.004
- Gonzalez-Guzman, M., Apostolova, N., Belles, JM., Barrero, JM., Piqueras, P., Ponce, MR., Micol, JL., Serrano, R., Rodriguez, PL., 2002. The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* 14 (8):1833-1846. doi:10.1105/tpc002477
- Gorovits, R., Czosnek, H., 2007. Biotic and abiotic stress responses in tomato breeding lines resistant and susceptible to tomato yellow leaf curl virus. In: Czosnek H (ed) *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease*. Springer
- Gökalp, HY., Kaya, M., Tülek, Y., Zorba, Ö., 2010. Et ve ürünlerinde kalite kontrolü ve laboratuvar uygulama klavuzu (V. Baskı), Atatürk Üniv. Yayınları, Yayın No: 751, Ziraat Fak. Yayın No: 318, Ders Kitapları Seri No:69, Atatürk Üniversitesi, Ofset Tesisi, Erzurum.
- Grandhee, SK., Monnier, VM., 1991. Mechanism of formation of the maillard protein cross-link pentosidine - glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors. *J Biol Chem* 266 (18):11649-11653
- Griffith, M., Ala, P., Yang, DSC., Hon, WC., Moffatt, BA., 1992. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiol* 100 (2):593-596. doi:DOI 10.1104/pp.100.2.593

- Gulcin, I., 2006. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci* 78 (8):803-811. doi:10.1016/j.lfs.2005.05.103
- Gulewitsch, W., Krimberg, R., 1905. Zur kenntnis der extraktivstoffe der muskeln. II. Mitteilung. Über das carnitin. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, vol 45. doi:10.1515/bchm2.1905.45.3-4.326
- Gupta, R., Gupta, N., Rath P., 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biot* 64 (6):763-781. doi:10.1007/s00253-004-1568-8
- Güler, NS., 2008. *Ctenanthe setosa*'da yaprak kıvrılması sırasında apoplastik ve simplastik alanlarda antioksidan sistemde meydana gelen değişimler. Doktora, Karadeniz Teknik Üniversitesi Trabzon
- Ha, TY., Otsuka, M., Arakawa, N., 1991. The regulatory effect of ascorbate on the carnitine synthesis in primary cultured guinea pig hepatocytes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 37 (4):371-378
- Ha, TY., Otsuka, M., Arakawa, N., 1994. Ascorbate indirectly stimulates fatty acid utilization in primary cultured guinea pig hepatocytes by enhancing carnitine synthesis. *J Nutr* 124 (5):732-737
- Hagar, H., Ueda, N., Shah, SV., 1996. Role of reactive oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK1 cells. *Am J Physiol-Renal* 271 (1):F209-F215
- Halliwell, B., 1982. The toxic effects of oxygen on plant tissues. *Superoxide Dismutase* 1:89-123
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC., 2015. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, 1-905
- Han, YY., Zhang, WZ., Zhang, BL., Zhang, SS., Wang, W., Ming, F., 2009. One novel mitochondrial citrate synthase from *Oryza sativa* L. can enhance aluminum tolerance in transgenic tobacco. *Mol Biotechnol* 42 (3):299-305. doi:10.1007/s12033-009-9162-z
- Heidarvand, L., Millar, AH., Taylor, NL., 2017. Responses of the mitochondrial respiratory system to low temperature in plants. *Crit Rev Plant Sci* 36 (4):217-240. doi:10.1080/07352689.2017.1375836
- Heldt, HW., Piechulla, B., 2011. *Plant Biochemistry*. Fourth edition edn. Academic Press, USA
- Hikosaka, K., 2004. Interspecific difference in the photosynthesis-nitrogen relationship: patterns, physiological causes, and ecological importance. *J Plant Res* 117 (6):481-494. doi:10.1007/s10265-004-0174-2
- Hill, BC., 1994. Modeling the sequence of electron-transfer reactions in the single turnover of reduced, mammalian cytochrome-c-oxidase with oxygen. *J Biol Chem* 269 (4):2419-2425
- Hoefnagel, MHN., Atkin, OK., Wiskich, JT., 1998. Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. *Bba-Bioenergetics* 1366 (3):235-255. doi:Doi 10.1016/S0005-2728(98)00126-1
- Hoppe, A., Theimer, RR., 1997. Enzymes for lipolysis and fatty acid metabolism in different organelle fractions from rape seed cotyledons. *Planta* 202 (2):227-234. doi:DOI 10.1007/s004250050123

- Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D., 2004. Lipases and their industrial applications - An overview. *Appl Biochem Biotech* 118 (1-3):155-170. doi:Doi 10.1385/Abab:118:1-3:155
- Hu, WH., Yan, XH., Yu, JQ., 2017. Importance of the mitochondrial alternative oxidase (AOX) pathway in alleviating photoinhibition in cucumber leaves under chilling injury and subsequent recovery when leaves are subjected to high light intensity. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 92(1): 31-38
- Huner, NPA., Oquist, G., Hurry, VM., Krol, M., Falk, S., Griffith, M., 1993. Photosynthesis, photoinhibition and low-temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynthesis Research* 37 (1):19-39. doi:Doi 10.1007/Bf02185436
- Huner, NPA., Oquist, G., Sarhan, F., 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Sci* 3 (6):224-230. doi:Doi 10.1016/S1360-1385(98)01248-5
- Ishii, N., Ikenaga, H., Carmines, PK., Aoki, Y., Ogawa, Z., Saruta, T., Suga, T., 2004. High glucose augments arginase activity and nitric oxide production in the renal cortex. *Metabolism-Clinical and Experimental* 53 (7):868-874. doi:10.1016/j.metabol.2004.02.011
- Jaeger, KE., Eggert, T., 2002. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotech* 13 (4):390-397. doi:Doi 10.1016/S0958-1669(02)00341-5
- Jaeger, KE., Reetz, MT., 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* 16 (9):396-403. doi:Doi 10.1016/S0167-7799(98)01195-0
- Jaleel, CA., Sankar, B., Sridharan, R., Panneerselvam, R., 2008. Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turk J Biol* 32 (2):79-83
- Janska, A., Marsik, P., Zelenkova, S., Ovesna, J., 2010. Cold stress and acclimation - what is important for metabolic adjustment? *Plant Biol (Stuttg)* 12 (3):395-405. doi:10.1111/j.1438-8677.2009.00299.x
- Job, C., Rajjou, L., Lovigny, Y., Belghazi, M., Job, D., 2005. Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiol* 138 (2):790-802. doi:10.1104/pp.105.062778
- Jumrani, K., Bhatia, VR., 2018. Impact of combined stress of high temperature and water deficit on growth and seed yield of soybean. *Physiol Mol Biol Plants* 24(1):37-50
- Juszczuk, IM., Rychter, AM., 2003. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochim Pol* 50 (4):1257-1271
- Kang, HM., Saltveit, ME., 2002. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiol Plantarum* 115 (4):571-576. doi:DOI 10.1034/j.1399-3054.2002.1150411.x
- Kanneworff, WA., Vanderplas, LHW., 1994. Respiration of bulb scale fragments of tulip after storage at 5-degrees-C. *Plant Sci* 104 (1):31-38. doi:Doi 10.1016/0168-9452(94)90188-0
- Kayama, Y., Raaz, U., Jagger, A., Adam, M., Schellinger, IN., Sakamoto, M., Suzuki, H., Toyama, K., Spin, JM., Tsao, PS., 2015. Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Sci.* 16(10), 25234-25263
- Keha, EE., Küfrevioğlu, Öİ., 2014. *Biyokimya*. 10 edn. Aktif, İstanbul
- Kerner, J., Hoppel, C., 2000. Fatty acid import into mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1486 (1):1-17. doi:Doi 10.1016/S1388-1981(00)00044-5

- Kindl, H., 1987. β -Oxidation of fatty acids by specific organelles. In: Stumpf PK, Conn EE (eds) The biochemistry of plants, vol 9. Academic Press, London, pp 31-52
- Kmiecik, W., Lisiewska, Z., 2000. Studies on the morphological traits and chemical composition of the fruit of six tomato cultivars recommended as raw material for freezing. *Nahrung* 44 (5):349-353. doi:10.1002/1521-3803(20001001)44:5<349::AID-FOOD349>3.0.CO;2-P
- Kochian, LV., Hoekenga, OA., Pineros, MA., 2004. How do crop plants tolerate acid soils? - Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu Rev Plant Biol* 55:459-493. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141655
- Koeck, T., Kremser, K., 2003. L-Carnitine alters nitric oxide synthase activity in fibroblasts depending on the peroxisomal status. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35 (2):149-156. doi:Pii S1357-2725(02)00183-8
- Kratsch, HA., Wise, RR., 2000. The ultrastructure of chilling stress. *Plant Cell Environ* 23 (4):337-350. doi:DOI 10.1046/j.1365-3040.2000.00560.x
- Kufner, I., Koch, W., 2008. Stress regulated members of the plant organic cation transporter family are localized to the vacuolar membrane. *BMC Res Notes* 1:43. doi:10.1186/1756-0500-1-43
- Kumar, S., Kaur, G., Nayyar, H., 2008. Exogenous application of abscisic acid improves cold tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J Agron Crop Sci* 194 (6):449-456. doi:10.1111/j.1439-037X.2008.00335.x
- Kunau, WH., Dommès, V., Schulz, H., 1995. Beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: A century of continued progress. *Prog Lipid Res* 34 (4):267-342. doi:Doi 10.1016/0163-7827(95)00011-9
- Labboun, S., Terce-Laforgue, T., Roscher, A., Bedu, M., Restivo, FM., Velanis, CN., Skopelitis, DS., Moschou, PN., Roubelakis-Angelakis, KA., Suzuki, A., Hirel, B., 2009. Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase. I. in vivo Real Time Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Experiments (vol 50, pg 1761, 2009). *Plant Cell Physiol* 50 (11):1994-1994. doi:10.1093/pcp/pcp155
- Lal, S., Szwergold BS., Taylor AH., Randall WC., Kappler F., Wells-Knecht K., Baynes JW., Brown TR., 1995. Metabolism of fructose-3-phosphate in the diabetic rat lens. *Arch Biochem Biophys* 318 (1):191-199
- Lambers, H., Ribas-Carbo, M., 2005. Plant Respiration: From cell to ecosystem, vol 18. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer, USA
- Landschutze, V., Muller-rober, B., Willmitzer, L., 1995. Mitochondrial citrate synthase from potato - predominant expression in mature leaves and young flower buds. *Planta* 196 (4):756-764. doi:Doi 10.1007/Bf01106771
- Lastdrager, J., Hanson, J., Smeekens, S., 2014. Sugar signals and the control of plant growth and development. *J Exp Bot* 65 (3):799-807. doi:10.1093/jxb/ert474
- Lawand, S., Dorne, AJ., Long, D., Coupland, G., Mache, R., Carol, P., 2002. Arabidopsis a bout de souffle, which is homologous with mammalian carnitine acyl carrier, is required for postembryonic growth in the light. *Plant Cell* 14 (9):2161-2173. doi:10.1105/tpc.002485
- Lawrence, C., Holaday, AS., 2000. Effects of mild night chilling on respiration of expanding cotton leaves. *Plant Sci* 157 (2):233-244. doi:Doi 10.1016/S0168-9452(00)00291-0
- Lee, AT., Cerami, A., 1990. In vitro and in vivo reactions of nucleic acids with reducing sugars. *Mutat Res* 238 (3):185-191

- Lelandais-Briere, C., Jovanovic, M., Torres, GAM., Perrin, Y., Lemoine, R., Corre-Menguy, F., Hartmann, C., 2007. Disruption of AtOCT1, an organic cation transporter gene, affects root development and carnitine-related responses in Arabidopsis. *Plant J* 51 (2):154-164. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03131.x
- Lenz, AG., Costabel, U., Shaltiel, S., Levine, RL., 1989. Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium-borohydride. *Anal Biochem* 177 (2):419-425. doi:Doi 10.1016/0003-2697(89)90077-8
- LeonKloosterziel, KM., Gil, MA., Ruijs, GJ., Jacobsen, SE., Olszewski, NE., Schwartz, SH., Zeevaart, JAD., Koornneef, M., 1996. Isolation and characterization of abscisic acid-deficient Arabidopsis mutants at two new loci. *Plant J* 10 (4):655-661. doi:DOI 10.1046/j.1365-313X.1996.10040655.x
- Levine, RL., Garland, D., Oliver, CN., Amici, A., Climent, I., Lenz, AG., Ahn, BW., Shaltiel, S., Stadtman, ER., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186:464-478
- Levine, RL., Williams, JA., Stadtman, ER., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Method Enzymol* 233:346-357
- Lewit, J., 1980. Responses of plants to enviromental stresses. Academic Press, New York
- Liu, BY., Lei, CY., Liu, WQ., 2017. Nitrogen addition exacerbates the negative effects of low temperature stress on carbon and nitrogen metabolism in moss. *Front Plant Sci* 8:1328. doi:10.3389/fpls.2017.01328
- Liu, YJ., Yuan, GF., 2010. Impacts of climate change on winter wheat growth in Panzhuang irrigation district, Shandong province. *J Geogr Sci* 20 (6):861-875. doi:10.1007/s11442-010-0816-3
- Logan, BA., Kornyejev D., Hardison J., Holaday AS., 2006. The role of antioxidant enzymes in photoprotection. *Photosynthesis Research* 88 (2):119-132. doi:10.1007/s11120-006-9043-2
- Longo, N., Frigeni, M., Pasquali, M., 2016. Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1863 (10):2422-2435. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.01.023
- Lu, BB., Yuan, YZ., Zhang, CF., Ou, JQ., Zhou, W., Lin, QH., 2005. Modulation of key enzymes involved in ammonium assimilation and carbon metabolism by low temperature in rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Plant Sci* 169 (2):295-302. doi:10.1016/j.plantsci.2004.09.031
- Lukatkin, AS., Brazaityte, A., Bobinas, C., Duchovskis, P., 2012. Chilling injury in chilling-sensitive plants: a review. *Zemdirbyste-Agriculture* 99 (2):111-124
- Lyons, JM., 1973. Chilling Injury in Plants. *Annu Rev Plant Phys* 24:445-466. doi:DOI 10.1146/annurev.pp.24.060173.002305
- Lyons, JM., Raison, JK., 1970. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol* 45 (4):386-&. doi:DOI 10.1104/pp.45.4.386
- Mahajan, S., Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444 (2):139-158. doi:10.1016/j.abb.2005.10.018
- Marco, R., Pestana, A., Sebastian, J., Sols, A., 1974. Oxaloacetate metabolic crossroads in liver - enzyme compartmentation and regulation of gluconeogenesis. *Mol Cell Biochem* 3 (1):53-70. doi:Doi 10.1007/Bf01660077
- Martz, F., Kiviniemi, S., Palva, TE., Sutinen, ML., 2006. Contribution of omega-3 fatty acid desaturase and 3-ketoacyl-ACP synthase II (KASII) genes in the modulation

- of glycerolipid fatty acid composition during cold acclimation in birch leaves. *J Exp Bot* 57 (4):897-909. doi:10.1093/jxb/erj075
- Masclaux-Daubresse, C., Reisdorf-Cren, M., Pageau, K., Lelandais, M., Grandjean, O., Kronenberger, J., Valadier, MH., Feraud, M., Jouglet, T., Suzuki, A., 2006. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiol* 140 (2):444-456. doi:10.1104/pp.105.071910
- Masterson, C., Wood, C., 2000. Mitochondrial beta-oxidation of fatty acids in higher plants. *Physiol Plantarum* 109 (3):217-224. doi:DOI 10.1034/j.1399-3054.2000.100301.x
- Masterson, C., Wood, C., 2009. Influence of mitochondrial beta-oxidation on early pea seedling development. *New Phytologist* 181 (4):832-842. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02717.x
- Masterson, C., Wood, C., Miernyk, JA., 1997. Function of chloroplastic carnitine palmitoyltransferase. *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids*:78-80
- Masterson, C., Wood, C., Thomas, DR., 1990. L-Acetylcarnitine, a substrate for chloroplast fatty-acid synthesis. *Plant Cell Environ* 13 (8):755-765. doi:DOI 10.1111/j.1365-3040.1990.tb01091.x
- Matos, AR., Hourton-Cabassa, C., Cicek, D., Reze, N., Arrabaca, JD., Zachowski, A., Moreau, F., 2007. Alternative oxidase involvement in cold stress response of *Arabidopsis thaliana* fad2 and FAD3+ cell suspensions altered in membrane lipid composition. *Plant Cell Physiol* 48 (6):856-865. doi:10.1093/pcp/pcm061
- Maxwell DP., Wang, Y., McIntosh L., 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *P Natl Acad Sci USA* 96 (14):8271-8276. doi:DOI 10.1073/pnas.96.14.8271
- McIntosh, L., 1994. Molecular-Biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol* 105 (3):781-786. doi:DOI 10.1104/pp.105.3.781
- McKersie, BD., Leshem, YY., 1994. Freezing stress. *Stress and stress coping in cultivated plants*. Springer, 104-131
- Mclaren, I., Wood, C., Jalil, MNH, Yong, BCS., Thomas, DR., 1985. Carnitine acyltransferases in chloroplasts of *Pisum-Sativum*-L. *Planta* 163 (2):197-200. doi:Doi 10.1007/Bf00393506
- Mehta, S., 2011. Biochemistry notes. <https://pharmaxchange.info/2013/10/oxidation-of-fatty-acids/>, 16 Mayıs 2018'de erişildi.
- Melo-Oliveira, R., Oliveira IC., Coruzzi, GM., 1996. Arabidopsis mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (10):4718-4723
- Meng, H., Hua S., Shamsi, IH., Jilani, G., Li Y., Jiang, L., 2009. Cadmium-induced stress on the seed germination and seedling growth of *Brassica napus* L., and its alleviation through exogenous plant growth regulators. *Plant Growth Regul* 58 (1):47-59. doi:10.1007/s10725-008-9351-y
- Mifflin, BJ., Habash, DZ., 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J Exp Bot* 53 (370):979-987. doi:DOI 10.1093/jexbot/53.370.979

- Minibaeva, FV., Gordon, LK., 2003. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russ J Plant Physiol* 50 (3):411-416. doi:Doi 10.1023/A:1023842808624
- Mittler, R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9 (10):490-498. doi:DOI 10.1016/j.tplants.2004.08.009
- Moller, IM., Kristensen, BK., 2004. Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photoch Photobio Sci* 3 (8):730-735. doi:10.1039/b315561g
- Morsy MR., Jouve, L., Hausman, JF., Hoffmann, L., Stewart, JM., 2007. Alteration of ,oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. *J Plant Physiol* 164 (2):157-167. doi:10.1016/j.jplph.2005.12.004
- Mugai, EN., Agong, SG., Matsumoto, H., 2000. Aluminium tolerance mechanisms in *Phaseolus vulgaris* L.: Citrate synthase activity and TTC reduction are well correlated with citrate secretion. *Soil Sci Plant Nutr* 46 (4):939-950. doi:Doi 10.1080/00380768.2000.10409159
- Munro, KD., Hodges DM., DeLong JM., Forney CF., Kristie DN., 2004. Low temperature effects on ubiquinone content, respiration rates and lipid peroxidation levels of etiolated seedlings of two differentially chilling-sensitive species. *Physiol Plantarum* 121 (3):488-497. doi:10.1111/j.1399-3054.2004.00352.x
- Nadkarni, DV., Sayre LM., 1995. Structural definition of early lysine and histidine adduction chemistry of 4-hydroxynonenal. *Chem Res Toxicol* 8 (2):284-291. doi:DOI 10.1021/tx00044a014
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1999. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *Febs Letters* 461 (3):205-210. doi:Doi 10.1016/S0014-5793(99)01451-9
- Neill, S., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Wilson, I., 2008. Nitric oxide evolution and perception. *J Exp Bot* 59 (1):25-35. doi:10.1093/jxb/erm218
- Neumann, G., Römheld, V., 2007. The release of root exudates as affected by the plant physiological status. doi:10.1201/9781420005585.ch2
- Nguyen, PJ., Rippa, S., Rossez, Y., Perrin, Y., 2016. Acylcarnitines participate in developmental processes associated to lipid metabolism in plants. *Planta* 243 (4):1011-1022. doi:10.1007/s00425-016-2465-y
- Nicholls, P., Marshall, DC., Cooper, CE., Wilson, MT., 2013. Sulfide inhibition of and metabolism by cytochrome c oxidase. *Biochem Soc T* 41:1312-1316. doi:10.1042/Bst20130070
- Nishiyama, Y., Ikeda, H., Haramaki, N., Yoshida, N., Imaizumi, T., 1998. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J* 135 (1):115-120
- Nunes-Nesi A., Araujo WL., Fernie AR., 2011. Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis. *Plant Physiol* 155 (1):101-107. doi:10.1104/pp.110.163816
- Oaks, A., 1995. Evidence for deamination by glutamate-dehydrogenase in higher-plants - reply. *Can J Bot* 73 (7):1116-1117. doi:DOI 10.1139/b95-121

- Obregon, MJ., Jacobsson, A., Kirchgessner, T., Schotz, MC., Cannon, B., Nedergaard, J., 1989. Postnatal recruitment of brown adipose tissue is induced by the cold stress experienced by the pups. *Biochem. J.* 259:341-346
- Ohlrogge, J., Browse, J., 1995. Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7 (7):957-970. doi:DOI 10.1105/tpc.7.7.957
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, CR., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, VT., 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Bioc* 29:119-131
- Panter, RA., Mudd JB., 1969. Carnitine levels in some higher plants. *FEBS Lett* 5 (2):169-170
- Panter, RA., Mudd, JB., 1973. Some aspects of carnitine metabolism in avocado (*Persea-Americana*). *Biochem J* 134 (2):655-658. doi:DOI 10.1042/bj1340655
- Pardo, JM., 2010. Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Curr Opin Biotech* 21 (2):185-196. doi:10.1016/j.copbio.2010.02.005
- Pearce, RS., 1999. Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regul* 29 (1-2):47-76. doi:Doi 10.1023/A:1006291330661
- Peluso, C., Barbarisi, A., Savica, V., Reda, E., Nicolai, R., Benatti, P., Calvani, M., 2000. Carnitine: An osmolyte that plays a metabolic role. *Journal of Cellular Biochemistry* 80 (1):1-10
- Plaxton, WC., Tran HT., 2011. Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. *Plant Physiology*, 156: 1006-1015
- Prasad, TK., Anderson, MD., Martin, BA., Stewart, CR., 1994a. Evidence for chilling-Induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen-peroxide. *Plant Cell* 6 (1):65-74. doi:DOI 10.1105/tpc.6.1.65
- Prasad, TK., Anderson, MD., Stewart, CR., 1994b. Acclimation, hydrogen-peroxide, and abscisic-acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiol* 105 (2):619-627. doi:DOI 10.1104/pp.105.2.619
- Pu, XJ., Lv, X., Tan, TH., Fu, FQ., Qin, GW., Lin, HH., 2015. Roles of mitochondrial energy dissipation systems in plant development and acclimation to stress. *Annals of Botany* 116 (4):583-600. doi:10.1093/aob/mcv063
- Purvis ,AC., 1997. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiol Plantarum* 100 (1):165-170. doi:DOI 10.1111/j.1399-3054.1997.tb03468.x
- Rab, A., Saltveit, ME., 1996. Differential chilling sensitivity in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. *Physiol Plantarum* 96 (3):375-382
- Rebouche, CJ., 1992. Carnitine function and requirements during the life cycle. *FASEB J* 6 (15):3379-3386
- Reetz, MT., 2002. Lipases as practical biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* 6 (2):145-150. doi:Doi 10.1016/S1367-5931(02)00297-1
- Rihan, HZ., Al-Issawi, M., Fuller, MP., 2017. Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance. *J Plant Interact* 12 (1):143-157. doi:10.1080/17429145.2017.1308568
- Rippa, S., Zhao, Y., Merlie, F., Charrier, A., Perrin, Y., 2012. The carnitine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana* shares similar features with the pathway of mammals and fungi. *Plant Physiology and Biochemistry* 60:109-114
- Robinson, SA., Stewart, GR., Phillips, R., 1992. Regulation of glutamate-dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell-

- suspension cultures. *Plant Physiol* 98 (3):1190-1195. doi:DOI 10.1104/pp.98.3.1190
- Rodrigues, B., Hong, XA., Mcneill, JH., 1988. Effect of L-carnitine treatment on lipid-metabolism and cardiac-performance in chronically diabetic rats. *Diabetes* 37 (10):1358-1364. doi:DOI 10.2337/diabetes.37.10.1358
- Rodriguez, VM., Velasco, P., Garrido, JL., Revilla, P., Ordas, A., Butron, A., 2013. Genetic regulation of cold-induced albinism in the maize inbred line A661. *J Exp Bot* 64 (12):3656-3667. doi:10.1093/jxb/ert189
- Rogers, MP., Robinson, DS., 1974. Effects of cold exposure on heart clearing factor lipase and triglyceride utilization in the rat. *Journal of Lipid Research* 15:263-272
- Rolletschek, H., Weschke, W., Weber, H., Wobus, U., Borisjuk, L., 2004. Energy state and its control on seed development: starch accumulation is associated with high ATP and steep oxygen gradients within barley grains. *J Exp Bot* 55 (401):1351-1359. doi:10.1093/jxb/erh130
- Rurek, M., Woyda-Ploszczyca, AM., Jarmuszkiewicz, W., 2015. Biogenesis of mitochondria in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis) curds subjected to temperature stress and recovery involves regulation of the complexome, respiratory chain activity, organellar translation and ultrastructure. *Bba-Bioenergetics* 1847 (4-5):399-417. doi:10.1016/j.bbabbio.2015.01.005
- Sakemi, K., Hayasaka, K., Tahara, M., Sanada, Y., Takada, G., 1992. The effect of carnitine on the metabolism of valproic acid in epileptic patients. *Tohoku J Exp Med* 167 (2):89-92
- Saltveit, ME., Morris, LL., 1990. Chilling injury of horticultural crops. CRC Press. Inc, USA
- Sarwat, M., Ahmad, A., Abdin, MZ., 2013. Stress signaling in plants: Genomics and proteomics perspective, Volume 1. Springer. doi:10.1007/978-1-4614-6372-6
- Satchithanandam, S., Fritsche, J., Rader, JI., 2001. Extension of AOAC official method 996.01 to the analysis of standard reference material (SRM) 1846 and infant formulas. *Journal of AOAC International* 84: 805-813
- Schmidtman, E., Konig, AC., Orwat, A., Leister, D., Hartl, M., Finkemeier, I., 2014. Redox regulation of Arabidopsis mitochondrial citrate synthase. *Mol Plant* 7 (1):156-169. doi:10.1093/mp/sst144
- Schönfeld, P., Wojtczak, L., 2016. Short- and medium-chain fatty acids in the energy metabolism – the cellular perspective. *Journal of Lipid Research* 57 (6):943-954. doi:10.1194/jlr.R067629
- Schulz, H., 1991. Beta-Oxidation of fatty-acids. *Biochim Biophys Acta* 1081 (2):109-120. doi:Doi 10.1016/0005-2760(91)90015-A
- Schwabedissenberger, H., Gerhardt, B., 1995. Purification and characterization of carnitine acyltransferase from higher-plant mitochondria. *Phytochemistry* 39 (1):39-43. doi:Doi 10.1016/0031-9422(95)95267-X
- Seline, KG., Johein, H., 2007. The determination of L-carnitine in several food samples. *Food Chemistry* 105 (2):793-804. doi:10.1016/j.foodchem.2007.01.058
- Serdar, U., Demirsoy, H., 2006. Non-destructive leaf area estimation in chestnut. *Sci Horti-Amsterdam* 108 (2):227-230. doi:10.1016/j.scienta.2006.01.025
- Sharkey, TD., 2012. Advances in photosynthesis and respiration. *Photosynthesis Research* 111 (3):327-329. doi:10.1007/s11120-012-9722-0

- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, UC., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv* 19 (8):627-662. doi:Pii S0734-9750(01)00086-6 Doi 10.1016/S0734-9750(01)00086-6
- Sharma, S., Black, SM., 2009. Carnitine homeostasis, mitochondrial function, and cardiovascular disease. *Drug Discov Today Dis Mech* 6 (1-4):e31-e39. doi:10.1016/j.ddmec.2009.02.001
- Shekhawat, PS., Sonne, S., Carter, AL., Matern, D., Ganapathy, V., 2013. *J Crohns Colitis*. 7:197-205.
- Shen, WY., Nada, K., Tachibana, S., 1999. Effect of cold treatment on enzymic and nonenzymic antioxidant activities in leaves of chilling-tolerant and chilling-sensitive cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 68 (5):967-973
- Shi, F., Zhou, X., Zhou, Q., Tan, Z., Yao, MM., Wei, BD., Ji, SJ., 2018. Membrane lipid metabolism changes and aroma ester loss in low-temperature stored Nanguo pears. *Food Chem* 245:446-453. doi:10.1016/j.foodchem.2017.10.091
- Shi, J., Yasuor, H., Yermiyahu, U., Zuo, Q., Ben-Gal, A., 2014. Dynamic responses of wheat to drought and nitrogen stresses during re-watering cycles. *Agricultural Water Management* 146:163–172
- Siedow, JN., Moore, AL., 1993. A kinetic-model for the regulation of electron-transfer through the cyanide-resistant pathway in plant-mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1142 (1-2):165-174. doi:Doi 10.1016/0005-2728(93)90098-Z
- Sienkiewicz-Porzucek, A., Nunes-Nesi, A., Sulpice, R., Lisec, J., Centeno, DC., Carillo P., Leisse A., Urbanczyk-Wochniak E., Fernie AR., 2008. Mild reductions in mitochondrial citrate synthase activity result in a compromised nitrate assimilation and reduced leaf pigmentation but have no effect on photosynthetic performance or growth. *Plant Physiol* 147 (1):115-127. doi:10.1104/pp.108.117978
- Silva-Adaya, D., Perez-De, La Cruz, V., Herrera-Mundo, MN, Mendoza-Macedo, K, Villeda-Hernandez, J, Binienda, Z, Ali, SF, Santamaria, A., 2008. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *Journal of Neurochemistry* 105 (3):677-689. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05174.x
- Singh, P., 2002. Cytochrome oxidase sensitivity to carbon monoxide in leaves of various tall and dwarf wheat cultivars and their crosses. *Plant Cell Rep* 20 (12):1188-1190. doi:10.1007/s00299-002-0456-x
- Singh, S., Banerjee, UC., 2007. Purification and characterization of trans-3-(4-methoxyphenyl) glycidic acid methyl ester hydrolyzing lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochem* 42 (7):1063-1068. doi:10.1016/j.procbio.2007.04.006
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., Misalski, Z., 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochim Pol* 54 (1):39-50
- Smith, PK., Krohn, RI., Hermanson, GT., Mallia, AK., Gartner, FH., Provenzano, MD., Fujimoto, EK., Goeke, NM., Olson, BJ., Klenk, DC., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150 (1):76-85. doi:Doi 10.1016/0003-2697(85)90442-7

- Song, L., Chen, H., Gao, H., Fang, X., Mu, H., Yuan, Y., Yang, Q., Jiang, Y., 2013. Combined modified atmosphere packaging and low temperature storage delay lignification and improve the defense response of minimally processed water bamboo shoot. *Chem Cent J* 7 (1):147. doi:10.1186/1752-153X-7-147
- Stadtman, ER., Levine, RL., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25 (3-4):207-218. doi:10.1007/s00726-003-0011-2
- Stahl, W., Sies H., 2002. Reactive oxygen species. *Research Monographs*, 1-2
- Stewart, CR., Martin, BA., Reding, L., Cerwick, S., 1990. Respiration and alternative oxidase in corn seedling tissues during germination at different temperatures. *Plant Physiol* 92 (3):755-760. doi:DOI 10.1104/pp.92.3.755
- Stewart, GR., Shatilov, VR., Turnbull, MH., Robinson, SA., Goodall, R., 1995. Evidence that glutamate-dehydrogenase plays a role in the oxidative deamination of glutamate in seedlings of *Zea-Mays*. *Aust J Plant Physiol* 22 (5):805-809. doi:Doi 10.1071/Pp9950805
- Stintzi, A., Browse, J., 2000. The Arabidopsis male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *P Natl Acad Sci USA* 97 (19):10625-10630. doi:DOI 10.1073/pnas.190264497
- Studart-Guimaraes, C., Fait, A., Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Usadel, B., Fernie AR., 2007. Reduced expression of succinyl-coenzyme A ligase can be compensated for by up-regulation of the gamma-aminobutyrate shunt in illuminated tomato leaves. *Plant Physiol* 145 (3):626-639. doi:10.1104/pp.107.103101
- Stutts, L., Wang, Y., Stapleton, AE., 2018. Plant growth regulators ameliorate or exacerbate abiotic, biotic and combined stress interaction effects on *Zea mays* kernel weight with inbred-specific patterns. *Environ Exp Bot* 147:179-188. doi:10.1016/j.envexpbot.2017.12.012
- Sugiyama, N., Morishita, H., Nagaya, S., Nakajima, T., Kawase A., Ohya A., Sugiyama S., Kamiya K., Watanabe I., Togari H., Kobayashi M., Ogawa Y., Wada Y., 1984. Biochemical-evidence of carnitine effect on propionate elimination. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 7 (3):137-138. doi:Doi 10.1007/Bf01801775
- Sukalovic, VH. 1990. Properties of glutamate-dehydrogenase from developing maize endosperm. *Physiol Plantarum* 80 (2):238-242. doi:DOI 10.1111/j.1399-3054.1990.tb04402.x
- Suzuki, N., Mittler R., 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol Plantarum* 126 (1):45-51. doi:10.1111/j.0031-9317.2005.00582.x
- Svendsen, A., 2000. Lipase protein engineering. *Bba-Protein Struct M* 1543 (2):223-238. doi:Doi 10.1016/S0167-4838(00)00239-9
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, IM., Murphy, A., 2015. *Plant Physiology and Development*. 6 edn. Sinauer Associates Inc, USA
- Taiz, L., Zeiger, E., 2012. *Fisiologia vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 820 p.
- Tamai, I., China, K., Sai, Y., Kobayashi, D., Nezu, J., Kawahara, E., Tsuji, A., 2001. Na⁺-coupled transport of L-carnitine via high-affinity carnitine transporter OCTN2 and its subcellular localization in kidney. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1512 (2):273-284. doi:Doi 10.1016/S0005-2736(01)00328-5

- Tambussi, E.A., Bartoli, C.G., Guiamet, J.J., Beltrano, J., Araus, J.L., 2004. Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves. *Plant Sci* 167 (1):19-26. doi:10.1016/j.plantsci.2004.02.018
- Tang, W., Newton, R.J., Li, C., Charles, T.M., 2007. Enhanced stress tolerance in transgenic pine expressing the pepper CaPF1 gene is associated with the polyamine biosynthesis. *Plant Cell Rep* 26 (1):115-124. doi:10.1007/s00299-006-0228-0
- Tasgin, E., Atici, O., Nalbantoglu, B., 2003. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regul* 41 (3):231-236. doi:DOI 10.1023/B:GROW.0000007504.41476.c2
- Thomas, D.R., Ariffin, A., Jalil M.N.H., Yong B.C.S., Cooke R.J., Wood C., 1981. Effect of carnitine on greening barley leaves. *Phytochemistry* 20 (6):1241-1244. doi:Doi 10.1016/0031-9422(81)80013-1
- Thomas, D.R., Wood, C., 1982. Oxidation of acetate, acetyl CoA and acetylcarnitine by pea mitochondria. *Planta* 154 (2):145-149. doi:Doi 10.1007/Bf00387908
- Thomas, D.R., Wood C., 1986. The 2 Beta-oxidation sites in pea cotyledons - carnitine palmitoyltransferase - location and function in pea mitochondria. *Planta* 168 (2):261-266
- Thomashow, M.F., 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Phys* 50:571-599. doi:DOI 10.1146/annurev.arplant.50.1.571
- Tome, F., Nagele, T., Adamo, M., Garg, A., Marco-Illorca, C., Nukarinen, E., Pedrotti, L., Peviani A, Simeunovic A, Tatkievicz A, Tomar M, Gamm M., 2014. The low energy signaling network. *Frontiers in Plant Science* 5. doi:ARTN 353 10.3389/fpls.2014.00353
- Torreele, E., Vandersluiszen A., Verreth J., 1993. The effect of dietary L-carnitine on the growth-performance in fingerlings of the african catfish (*Clarias-Gariepinus*) in relation to dietary-lipid. *British Journal of Nutrition* 69 (1):289-299. doi:Doi 10.1079/Bjn19930030
- Tsuchida, H., Kozukue, N., Han, G.P., Choi, S.H., Levin, C.E., Friedman, M., 2010. Low-temperature storage of cucumbers induces changes in the organic acid content and in citrate synthase activity. *Postharvest Biol Tec* 58 (2):129-134. doi:10.1016/j.postharvbio.2010.06.006
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawaitoh K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S., 1995. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome-c-oxidase at 2.8 angstrom. *Science* 269 (5227):1069-1074. doi:DOI 10.1126/science.7652554
- Turan, Ö., Ekmekçi Y., 2008. Soğuk stresinin bitkiler üzerine etkileri ve tolerans mekanizmaları. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi* 9 (2):177-198
- Türk, H., Erdal, S., 2015. Melatonin alleviates cold-induced oxidative damage in maize seedlings by up-regulating mineral elements and enhancing antioxidant activity. *J Plant Nutr Soil Sc* 178 (3):433-439. doi:10.1002/jpln.201400476
- Türk, H., Erdal, S., Genisel M., Atici O., Demir Y., Yanmis D., 2014. The regulatory effect of melatonin on physiological, biochemical and molecular parameters in cold-stressed wheat seedlings. *Plant Growth Regul* 74 (2):139-152. doi:10.1007/s10725-014-9905-0

- Tuteja, N., 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods of Enzymology* 428:419-438
- Uchida, K., Stadtman, ER., 1993. Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase- a possible involvement of intramolecular and intermolecular cross-linking reaction. *J Biol Chem* 268 (9):6388-6393
- Uemura, M., Steponkus PL., 1999. Cold acclimation in plants: Relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *Journal of Plant Research* 112 (1106):245-254. doi:Doi 10.1007/Pl00013882
- Uemura, M., Tominaga, Y., Nakagawara, C., Shigematsu S., Minami A., Kawamura Y., 2006. Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiol Plantarum* 126 (1):81-89. doi:10.1111/j.1399-3054.2005.00594.x
- Upchurch, RG., 2008. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol Lett* 30 (6):967-977. doi:10.1007/s10529-008-9639-z
- Valentini, M., Garcí'a-Maurin~o SM., Pe'rez-Martí'nez I., Santero E., Canosa I., Lapouge K., 2014. Hierarchical management of carbon sources is regulated similarly by the CbrA/B systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Microbiology* 160: 2243–2252
- van Vlies, N., Tian, L., Overmars, H., Bootsma, AH., Kulik, W., Wanders, RJ., Wood, PA., Vaz, FM., 2005. Characterization of carnitine and fatty acid metabolism in the long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mouse. *Biochem J* 387 (Pt 1):185-193. doi:10.1042/BJ20041489
- Vanlerberghe, GC., Cvetkovska, M., Wang, J., 2009. Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? *Physiol Plantarum* 137 (4):392-406. doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01254.x
- Vanlerberghe, GC., McIntosh L., 1997. Alternative oxidase: From gene to function. *Annu Rev Plant Phys* 48:703-734. doi:DOI 10.1146/annurev.arplant.48.1.703
- Vaz FM., Wanders RJA., 2002. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J* 361:417-429. doi:Doi 10.1042/0264-6021:3610417
- Velazquez, SF., Rodriquez-Guerra, R., Sanchez, Calderon L., 2011. Abiotic and biotic stress response crosstalk in plants. In: Shanker AK, Venkateswarlu B (eds) *Abiotic stress response in plants - Physiological, biochemical and genetic perspectives*. In Tech, Croatia,
- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants - Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci* 151 (1):59-66. doi:Doi 10.1016/S0168-9452(99)00197-1
- Vernieri, P., Lenzi, A., Figaro, M., Tognoni, F., Pardossi, A., 2001. How the roots contribute to the ability of *Phaseolus vulgaris* L. to cope with chilling-induced water stress. *J Exp Bot* 52 (364):2199-2206. doi:DOI 10.1093/jexbot/52.364.2199
- Verzijl, N., DeGroot, J., Oldehinkel, E., Bank, RA., Thorpe, SR., Baynes, JW., Bayliss, MT., Bijlsma, JWJ., Lafeber, FPJG., TeKoppele, JM., 2000. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem J* 350:381-387. doi:Doi 10.1042/0264-6021:3500381
- Vigh, L., Maresca, B., Harwood, JL., 1998. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem Sci* 23 (10):369-374. doi:Doi 10.1016/S0968-0004(98)01279-1

- Wagner, AM., Moore, AL., 1997. Structure and function of the plant alternative oxidase: Its putative role in the oxygen defence mechanism. *Bioscience Rep* 17 (3):319-333. doi:Doi 10.1023/A:1027388729586
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., Eppenberger, HM., 1992. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine-kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands - the phosphocreatine circuit for cellular-energy homeostasis. *Biochem J* 281:21-40. doi:DOI 10.1042/bj2810021
- Wang, CY., 1982. Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. *Hortscience* 17 (2):173-186
- Wang, QF., Yi, Q., Hu QQ., Zhao Y., Nian HJ., Li KZ., Yu YX., Izui K., Chen LM., 2012. Simultaneous overexpression of citrate synthase and phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves augments citrate exclusion and Al resistance in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol Rep* 30 (4):992-1005. doi:10.1007/s11105-011-0397-z
- Wang, XM., Li, WQ., Li, MY., Welti, R., 2006. Profiling lipid changes in plant response to low temperatures. *Physiol Plantarum* 126 (1):90-96. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00622.x
- Weimar, JD., DiRusso, CC., Delio, R., Black, PN., 2002. Functional role of fatty acyl-coenzyme A synthetase in the transmembrane movement and activation of exogenous long-chain fatty acids. Amino acid residues within the ATP/AMP signature motif of *Escherichia coli* FadD are required for enzyme activity and fatty acid transport. *J Biol Chem* 277 (33):29369-29376. doi:10.1074/jbc.M107022200
- Wiegand, G., Remington, SJ., 1986. Citrate synthase - structure, control, and mechanism. *Annu Rev Biophys Bio* 15:97-117
- Willits, DH., Peet MM., 1998. The effect of night temperature on greenhouse grown tomato yields in warm climates. *Agr Forest Meteorol* 92 (3):191-202. doi:Doi 10.1016/S0168-1923(98)00089-6
- Wilson, JM. 1978. Leaf respiration and ATP levels at chilling temperatures. *New Phytologist* 80 (2):325-334. doi:DOI 10.1111/j.1469-8137.1978.tb01565.x
- Wilson, KE., Ivanov, AG., Oquist, G., Grodzinski, B., Sarhan, F., Huner, NPA., 2006. Energy balance, organellar redox status, and acclimation to environmental stress. *Can J Bot* 84 (9):1355-1370. doi:10.1139/B06-098
- Wood, C., Burgess, N., Thomas, DR., 1986. The dual location of beta-oxidation enzymes in germinating pea cotyledons. *Planta* 167 (1):54-57. doi:Doi 10.1007/Bf00446368
- Wood, C., Jalil MNH., Ariffin, A., Yong, BCS., Thomas, DR., 1983. Carnitine short-chain acyltransferase in pea mitochondria. *Planta* 158 (2):175-178. doi:Doi 10.1007/Bf00397711
- Wood, C., Masterson, C., Thomas., DR., 1992. The role of carnitine in plant cell metabolism In: Tobin AK (ed) *Plant Organelles: Compartmentation of Metabolism in Photosynthetic Tissue*. Cambridge University Press, New York, USA, pp 229-280
- Yadav, SK., 2010. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30 (3):515-527. doi:10.1051/agro/2009050
- Yadegari, LZ., Heidari, R., Carapetian, J., 2008. Chilling pretreatment causes some changes in respiration, membrane permeability and some other factors in soybean seedlings. *Research Journal of Biological Sciences* 3 (9):1054-1059

- Yağmur, Y., 2008. Farklı asma (*Vitis vinifera* L.) çeşitlerinin kuraklık stresine karşı bazı fizyolojik ve biyokimyasal tolerans parametrelerinin araştırılması. Yüksek Lisans, Ege Üniversitesi, İzmir
- Yamaya, T., Oaks, A., 1987. Synthesis of glutamate by mitochondria - an anaplerotic function for glutamate-dehydrogenase. *Physiol Plantarum* 70 (4):749-756. doi:DOI 10.1111/j.1399-3054.1987.tb04334.x
- Yamori, W., Noguchi, K., Hikosaka, K., Terashima, I., 2009. Cold-tolerant crop species have greater temperature homeostasis of leaf respiration and photosynthesis than cold-sensitive species. *Plant Cell Physiol* 50 (2):203-215. doi:10.1093/pcp/pcn189
- Yan, SP., Zhang, QY., Tang, ZC., Su, WA., Sun, WN., 2006. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Mol Cell Proteomics* 5 (3):484-496. doi:10.1074/mcp.M500251-MCP200
- Yang, MT., Chen, SL., Lin, CY., Chen, YM., 2005. Chilling stress suppresses chloroplast development and nuclear gene expression in leaves of mung bean seedlings. *Planta* 221 (3):374-385. doi:10.1007/s00425-004-1451-y
- Yee, JK., Wahjudi, PN., Vega, J., Lim S., Martin, A., Petterson, ME., Cohen, JN., Mao, CS., Lee, WNP. 2013. Stearoyl-CoA desaturase enzyme 1 inhibition reduces glucose utilization for de novo fatty acid synthesis and cell proliferation in 3T3-L1 adipocytes. *Metabolomics*. 9(4): 809-816
- Yoshiba, Y., Kiyosue T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozakj, K., 1997. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol*. 38(10): 1095-1102
- Yoshida, S., Uemura, M., 1986. Lipid composition of plasma membranes and tonoplasts isolated from etiolated seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiol*. 82: 807-812
- Yruela, I., Pueyo, JJ., Alonso, PJ., Picorel, R., 1996. Photoinhibition of photosystem II from higher plants. Effect of copper inhibition. *J Biol Chem* 271 (44):27408-27415
- Zelko, IN., Mariani, TJ., Folz, RJ., 2002. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Bio Med* 33 (3):337-349. doi:Pii S0891-5849(02)00560-3
- Zhong, Q., Glatz, CE., 2006. Enzymatic assay method for evaluating the lipase activity in complex extracts from transgenic corn seed. *J Agric Food Chem* 54 (9):3181-3185. doi:10.1021/jf052016k
- Zhou, DB., Solomos, T., 1998. Effect of hypoxia on sugar accumulation, respiration, activities of amylase and starch phosphorylase, and induction of alternative oxidase and acid invertase during storage of potato tubers (*Solanum tuberosum* cv. Russet Burbank) at 1 degrees C. *Physiol Plantarum* 104 (2):255-265. doi:DOI 10.1034/j.1399-3054.1998.1040214.x

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında İstanbul’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul’da tamamladı. 2007 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2011 yılında mezun oldu. Aynı yıl başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimini 2013 yılında tamamladı. Aynı yıl başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında doktora öğrenimine devam etmektedir. Ayrıca 2015 yılında Öğretim Görevlisi olarak atandığı Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi’ndeki görevine de halen devam etmektedir.