



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ginkgo biloba'nın KİMYASAL ve MOLEKÜLER YÖTEMLERLE ANALİZİ

Esra MALTAŞ

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Temmuz– 2011
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Esra MALTAŞ

29/09/2011

ÖZET

DOKTORA TEZİ

Ginkgo biloba'nın KİMYASAL ve MOLEKÜLER YÖTEMLERLE ANALİZİ

Esra MALTAŞ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Salih YILDIZ

2011, 204 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Salih YILDIZ
Prof. Dr. Mehmet SEZGİN
Doç. Dr. Gülderen AKKUŞ UYSAL
Doç. Dr. Aydan YILMAZ
Yrd. Doç. Dr. Hasibe CİNGİLLİ VURAL

Bu çalışmada, Türkiye'nin Antalya şehrinden toplanan *Ginkgo biloba L.*(Ginkgoaceae)'nin moleküler, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri moleküler ve kimyasal yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır. Çalışmanın ilk bölümünde, *Ginkgo biloba*'nın antioksidan aktivite analizleri için öncelikle metanol, aseton ve hekzan olmak üzere üç farklı çözücü ile yapraklarından ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstraktların antioksidan aktiviteleri, DPPH serbest radikal süpürme etkisi, demir ve bakır indirgeme metotları, β-karoten-linoleik asit emülsiyon sistemi, metal şelatlama aktivitesi ile hidrojen peroksit giderme aktiviteleri olmak üzere çeşitli antioksidan aktivite tayin metotları ile belirlenmiştir. Bununla birlikte her bir ekstraktın toplam fenolik ve flavonoid madde tayinleri sırasıyla Folin ve aluminyum şelatlama yöntemleri kullanılarak hesaplanmıştır. Metanol ekstraktı en yüksek antioksidan aktivite göstermiş ve bunabağlı olarak en fazla fenolik maddeyi de yine metanol ekstraktının ihtiva ettiği görülmüştür

Çalışmanın bir diğer bölümünde bitkilerin ikincil metabolitleri olarak adlandırılan ve morfolojik karakterleri olarakta bilinen fenolik yapılardan 15 tanesinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile analizi yapılarak ekstraktlarda bulunması muhtemel bu fenolik bileşikler kalitatif ve kantitatif olarak tanımlanmıştır. Analizi yapılan 15 maddeden yalnızca 8 tanesine rastlanmıştır. Bunlar kateşin hidrat, kaffeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, rutin, eriodiktiol, kuersetin ve naringenindir. Bitkilerin bir diğer morfolojik karakteri ise ihtiva ettikleri yağ asitleridir. Her bir ekstraktta bulunan yağ asitleri gaz kromatografisi kullanılarak tayin edilmiştir. Sonuç olarak *Ginkgo biloba*'da en fazla biyosentezi gerçekleşen yağ asitleri doymuş yağ asidi olarak C:16 palmitik asit ile tekli doymamış yağ asitlerinden C:18 oleik asittir.

Çalışmanın son kısmında ise *Ginkgo biloba* yapraklarından DNA izolasyonu manuel ve kite dayalı olmak üzere iki yöntemle gerçekleştirilmiş ve her bir DNA 20 adet primerle (OPA1-20) rasgele çoğaltılmış DNA poliformizi metodu ile çoğaltılmıştır. Elde edilen bantlar Almanya orijinli *Ginkgo biloba* yapraklarıdan DNA'nın yine aynı yöntemlerle izole edilen ve çoğaltılan reaksiyon ürünleri ile karşılaştırılarak orijine ve iklime bağlı olarak ortaya çıkan polimorfizmler belirlenerek tür içi benzerlik ve farklılıklar DNA düzeyinde incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan kapasite, flavonoid, DNA, rasgele çoğaltılmış DNA polimeraz zincir reaksiyonu, yağ asidi

ABSTRACT

Ph.D THESIS

ANALYSIS OF *Ginkgo biloba* BY CHEMICAL AND MOLECULAR METHODS

Esra MALTAŞ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
DOCTOR OF PHILOSOPHY IN CHEMISTRY

Advisor: Prof. Dr. Salih YILDIZ

2011, 204 Pages

Jury
Prof. Dr. Salih YILDIZ
Prof. Dr. Mehmet SEZGİN
Doç. Dr. Gülderen AKKUŞ UYSAL
Doç. Dr. Aydan YILMAZ
Yrd. Doç. Dr. Hasibe CİNGİLLİ VURAL

In this study, we investigated molecular, morphological and biochemical characters of *Ginkgo biloba L.*(Ginkgoaceae) growing in Antalya in Southern Turkey. In first part, *Ginkgo biloba* leaves were extracted with methanol, acetone and n-hexane. The antioxidant activity of the each extract was measured by various assays including by β-carotene–linoleic acid model system, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) analysis, inhibition of H_2O_2 and ferric reducing antioxidant power (FRAP), cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) and metal chelating capacity methods. The results indicated that methanolic extract exhibited higher antioxidant activity related to highest phenolic and flavonoid contents.

In the second part, 15 of phytochemicals called as secondary metabolites of the plants in the extracts were analysed qualitatively and quantitatively by using high performance liquid chromatography. Eight components of the extracts were catechin hydrate, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, rutin, eriodictyol, quercetin and naringenin. Fatty acid compositions of the methanolic and acetone extracts of *Ginkgo biloba* were also analysed by gas chromatography. Data showed that main fatty acids of the extracts were C:16 palmitic acid as saturated fatty acids and C:18 oleic acid as monosaturated fatty acids.

This study also aimed to determine which protocol to use most appropriate to extract high-quality genomic DNA. Cetyltrimethylammonium bromide protocol (CTAB) and protocol of commercially available kits has been optimized for extraction of genomic DNA from *Ginkgo biloba* leaves to produce efficient yields of high-quality amplifiable DNA. The purified DNA has excellent spectral qualities, was efficiently amplified by 20 arbitrary primers (OPA1-20) by Polymerase Chain Reaction Random-Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) in order to detect genetic relationships between *Ginkgo biloba* species cultivated in Turkey and Germany The dendogram developed by pooling data of RAPD analysis revealed that Germany and Turkey species showed similar pattern with the dendogram of RAPD analysis. Therefore, this technique allowed to determine relationship between *Ginkgo biloba* species. Results showed that the markers generated by RAPD assays for *Ginkgo biloba* can provide practical information for the management of genetic resources.

Keywords: Antioxidant acitvity, fatty acids, flavonoid, genomic DNA, RAPD-PCR,

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Salih Yıldız ve Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Hasibe Cingilli VURAL danışmanlıklarında tamamlanarak, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Doktora Tezi olarak sunulmuştur.

Tez projemin planlanması ile başlayan ve çalışmalarım boyunca devam eden dönemde destek ve yardımlarını gördüğüm danışmanım Sayın Prof. Dr. Salih Yıldız, tez projemin konusu hakkındaki tecrübesi ve sağladığı laboratuar imkanı ile çalışmalarım boyunca yanımda olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Hasibe Cingilli VURAL'a, Tez İzleme Komitesinde yer alan Sayın Prof. Dr. Mehmet SEZGİN ve Sayın Prof. Dr. Hüseyin KARA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Esra MALTAŞ

Konya - 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. RADİKALLER **7**

2.1. Radikallerin Oluşumu 8
2.2. Serbest Radikaller 9
2.2.1. Süperoksit radikali 9
2.2.2. Hidrojen peroksit 11
2.2.3. Hidroksil radikali 12
2.3. Canlılarda Oksijen Radikallerinin Kaynağı 14
2.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri 16
2.4.1. Serbest radikallerin hücreye etkileri 17
2.4.2. Serbest radikallerin nükleik asitlere etkileri 17
2.4.3. Serbest radikallerin proteinlere etkileri 19
2.4.4. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri 19
2.4.5. Serbest radikallerin lipidlere etkileri 19
2.5. Serbest Radikallere Karşı Savunma Sistemleri 20
2.5.1. Serbest radikallere karşı endojen kaynaklı savunma sistemi 22
2.5.2. Serbest radikallere karşı ekzojen kaynaklı savunma sistemi 26
2.6. Doğal Antioksidanlar 28

3. GENETİK MARKIR **36**

3.1. Morfolojik Markırlar 39
3.2. Biyokimyasal Markırlar 40
3.3. DNA Markırları 42
3.3.1. Hibridizasyona dayalı markırlar 42
3.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı markırlar 44
3.4. Moleküler Markırların Uygulama Alanları 59
3.5. RAPD Analizlerinin Uygulama Alanları 61

4. KAYNAK ARAŞTIRMASI **64**

5. MATERYAL VE METOT **70**

5.1. Materyal 70
5.1.1. Kullanılan cihazlar 70
5.1.2. Bitki materyali 71

5.1.3. Tamponlar 71
5.1.4. Kimyasallar 72
5.2. Deneysel Kısım 75
5.2.1. Biyokimyasal çalışmalar 76
5.2.2. Kromatografik analizler 80
5.2.3. Moleküler analizler 82
5.2.4. RAPD-PCR metotu 86
5.2.5. İstatistiksel analiz 90

6. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 91

6.1. Biyokimyasal Analiz Sonuçları 91
6.1.1. Toplam fenolik madde tayini 91
6.1.2. Toplam flavonoid madde tayini 94
6.1.3. DPPH serbest radikal süpürme etkisi 96
6.1.4. β-Karoten-linoleik asit emülsiyon sistemi 100
6.1.5. Demir indirgeme gücü (FRAP yöntemi) 103
6.1.6. Bakır indirgeme gücü (CUPRAC metotu) 107
6.1.7. Metal şelatlama aktivitesi 110
6.1.8. Hidrojen peroksit giderme aktivitesi 113
6.2.1. HPLC ile fenolik madde tayini 116
6.2.2 GC ile yağ asidi bileşimi tayini 119
6.3. Moleküler Analiz Sonuçları 122
6.3.1. Moleküler yapı 122
6.3.2. DNA izolasyonu 123
6.3.3. RAPD-PCR metotudunu optimizasyonu 129
6.3.4. RAPD polimorfizmi ve genetik mesafenin tespiti 140

7. SONUÇ VE ÖNERİLER 142

7.1. Sonuç 142
7.2. Öneriler 177

KAYNAKLAR 181

ÖZGEÇMİŞ 204

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
GC	: Gaz kromatografisi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
CUPRAC	: Kuprik iyonu indirgeme kapasitesi
TEAK	: Troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesi
GAE	: Gallik aside eşdeğer
KE	: Kuersetine eşdeğer
FRAP	: Ferrik iyonu indirgeme kapasitesi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	: Rasgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi
AFLP	: Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi
RFLP	: Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
ISSR	: Tekrarlanan basit baz dizilimi arası
STS	: Dizisi etiketlenmiş alanlar
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
SCAR	: Dizileri belirlenmiş çoğaltılan bölgeler
CAPS	: Kesilip çoğaltılmış polimorfik diziler
AP–PCR	: Rasgele seçilen primerle polimeraz zincir reaksiyonu
EST	: Eksprese dizi etiketleri

1. GİRİŞ

Başlıca reaktif oksijen türleri olan süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit, moleküler oksijenin zincirleme bir reaksiyonundan meydana gelmektedir. Reaktif oksijen ve azot türleri insan vücudunda farklı şekillerde meydana gelir. Bazıları metabolik yollar içerisinde olmaması gereken kimyasal reaksiyonlar neticesinde oluşmaktadır. Süperoksit ve hidrojen peroksit miktarı, adrenalin, dopamin, tetrahidrofolat, mitokondrial ve sitokrom P450 elektron transport zincirlerinin bileşenleri gibi bazı biyomoleküllerin oksijen tarafından doğrudan oksidasyonuyla artabilir (Fridovich, 1986; Halliwell, 1994). Bununla birlikte canlılar çoğu zaman farklı kaynaklardan radyosyona maruz kalmaktadırlar. Böyle durumlarda düşük dalga boyundaki elektromagnetik ışınlar suyu parçalayarak reaktif hidroksi radikallerini oluşturabilir (Von Sonntag, 1987). Reaktif oksijen türleri canlı organizmada sigara içilmesi durumunda olduğu gibi dışarıdan da alınabilir. Sigara dumanının ana bileşeni olan NO_2•'in sigara olefinleri ile reaksiyona girmesi sonucu karbon merkezli radikallerin oluştuğu öne sürülmektedir. Ayrıca sigara içimi nötrofilleri aktive ederek dolaylı olarak serbest radikal üretimini artırabilir (Papas, 1996). Oksidasyon prosesi ayrıca radikalik zincir reaksiyonları vasıtasıyla da meydana gelmektedir.

Radikaller eşleşmemiş elektronlarını eşleştirme eğiliminde oldukları için özellikle gevşek bağlı elektronları koparabilirler. Radikallerin bu özellikleri, onlara kimyasal aktiflik sağlar. Radikallerin organizmada kontrolsüz bir şekildeki artması, biyomoleküllerin modifikasyonuna sebep olmaktadır. Reaktif oksijen birikimi organizmada mevcut olan veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenmediği takdirde; oluşan "oksidatif stres" koşullarında kanser, koroner kalp rahatsızlığı, hücresel yıpranma ve yaşlanma, mutajenizm ve bağışıklık sistemi hastalıklarına sebep olur. Ayrıca lipoprotein (LDL) oksidasyonu ile sonuçlanan, DNA, protein ve hücre membranı gibi duyarlı biyolojik yapıların oksidatif hasarına neden olabilen radikalik zincir reaksiyonları meydana gelmektedir.

Canlı organizmalar serbest radikallerin etkisinden korunmak için antioksidatif korunma sistemine sahiptirler (Tunalıer ve ark., 2002). İnsanoğlu hayatı boyunca yaşamın beraberinde getirdiği stres ve benzeri zorlukları aşmak ve hastalıklardan korunmak için gerekli besinlerin yanında, takviye kuvvetler de almalıdır.

Antioksidan maddeler olarak adlandırılan bu tür koruyucu ve engelleyici maddelere ilgi son yıllarda oldukça artmıştır. Çoğunlukla fenolik yapıda olan antioksidan maddeler neredeyse tüm bitki, meyve, sebze ve mantarlarda bulunmaktadır. Bu antioksidan maddelerinin en önemlileri: tokoferoller, flavonoidler, karotenoidler ve askorbik asittir (Hudson, 1990; Shahidi, 2000; Yanishlieva ve ark., 2001). Bitkilere renklerini veren de büyük ölçüde bu polifenolik yapılı flavonoidlerdir. Şu ana kadar literatürlerde 6500'den fazla fenolik bileşiği kimyasal yapısı aydınlatılmıştır (Grotewold, 2006; Murray, 1996).

Canlı sistemlerde bulunan bütün fizyolojik prosesler; enzim, hormon ve iz elementleri gibi farklı ajanlar tarafından yönetilen oksidasyon ve indirgeme reaksiyonlarının kompleks kombinasyonlarını içermektedir. Canlılarda redoks dengesinde meydana gelebilecek herhangi bir değişiklik, hücre ve dokuların fonksiyonlarının bozulmasına sebep olmaktadır. Antioksidan maddeler bu oksidasyon reaksiyonlarını düzenler ve dokularda doğal bir şekilde bulunur. Organizmanın normal oksijen metabolizmasının toksik etkilerine karşı kendisini koruması için bu mekanizmalar gereklidir (Fridovich, 1976). Ancak antioksidan maddeler veya antioksidan savunma sistemini oluşturan endojen kaynaklı enzimlerin sentezinde meydana gelebilecek bir yetersizlik farklı hastalık türlerini meydana getirir. Bu bakımdan biyolojik sistemlerde antioksidatif savunma mekanizmasının araştırılması ile ilgili çalışmalar son derece önem kazanmıştır (Ramarathnam ve ark, 1988). Son yıllarda tıp alanında bir yandan hastalıkların tedavisinde yeni yöntemler araştırılırken, öte yandan sağlıklı bir hayat sürdürme ve hastalıkları önleme yolunda yoğun çabalar sarf edilmektedir. Ayrıca teknolojinin gelişmesiyle birlikte maruz kalınan UV ışınları ya da radyasyon, oluşan çevre kirliliği ve diğer pek çok etken çeşitli toksik maddelere maruz kalmamıza neden olmaktadır. Bu toksik maddeler nedeniyle insanlarda oluşan rahatsızlıkların (kalp, kanser, erken yaşlanma vb. gibi) sayısı her geçen gün artmaktadır. Serbest radikallerle doğrudan ya da dolaylı olarak ilişkili olan hastalıklara çözüm getirmek, öncelikle bu hastalıkların oluşumunu tetikleyen etkenlerin başında olan serbest radikallerin kontrol edilmesiyle gerçekleşebilir. Yaş ilerledikçe insanların savunma mekanizmaları zayıfladığından, vücudun serbest radikal dengesi bozulmaktadır. Çünkü vücudun doğal antioksidanları olan endogenaz enzimlerin üretim miktarı azalmaktadır. Bu yüzden antioksidan savunma sistemine ilişkin dengenin yeniden sağlanabilmesi için

antioksidan içerikli doğal besinlerin alınması önem kazanmaktadır. Bunun için son yıllarda yüksek miktarda antioksidan madde içeren bitki ve mantarlara ilgi artmıştır. Özellikle tıbbi aromatik bitkilerin ihtiva ettikleri fenolik maddeler ve göstermiş oldukları antioksidan aktivite üzerine çalışmalar oldukça fazladır.

Doğal antioksidanlar esasında yüzyıllardan beri süregelen tüm medeniyetlerin hastalıklardan korunma ve tedavide başvurduğu temel maddelerdir. Bu nedenle özellikle bitkilerin ilaç olarak kullanımı yüzyıllardan beri bilinmektedir. Çin ve Hindistan'da antik metinlerde bitkisel kaynaklı ilaçların kullanımına ilişkin reçete niteliğinde ayrıntılı bilgiler verilmektedir. Günümüzde de bitkiler özellikle gelişmekte olan ülkelerde dünya nüfusunun büyük bir çoğunluğu için temel beslenme kaynağı ve hastalıklardan korunma yoludur. Ancak 20. yüzyılın başlarında teknolojinin gelişmesiyle birlikte farmasötik endüstri adı altında pek çok sentetik ilaç geliştirilmiştir. Bu sektör tıp ve farmakolojide oldukça aktif hale gelmiş ve insanların ilgisini yüksek oranda çektiği için ülkelere ekonomik olarak büyük bir kaynak sağlamıştır. Buna bağlı olarak bitkilerden alınan doğal antioksidanların kullanımında azalma görülmüştür. Ancak zamanla tüm bu sentetik ilaçların yan etkilerinin yanında toksisiteye ve bazı hastalıklara neden olduğu anlaşılınca tekrar doğal antioksidanlara dönüş olmuş ve bitkisel tedaviler yeniden kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla özellikle tıbbi aromatik bitkilerden ilaç üretimine başlanmış ve bu tüm dünyada büyük oranda kabul görmüştür. Amerika, Almanya ve Fransa'da doktorlar hastalarına reçete olarak bazı bitkileri tavsiye etmeye başlamışlardır. Ancak tüm bu bitkilerde bulunan fenolik yapılar canlılarda doğal yollarla oluşan radikalleri söndürme gibi yararlı etkilerin yanında vücutta bitkiler toksisiteye neden olabilecek bazı yapılarıda içermektedirler. Ayrıca kullanım miktarları da oldukça önemlidir. Fazla tüketildiğinde kanda glikoz, kolestrol ya da LDL seviyesinde aşırı düşüşlere, tansiyon yükselmesine ya da çeşitli toksik etkilere neden olabilmektedirler. Bu nedenle kullanılan bitkilerin kimyasal bileşimlerinin kalitatif ve kantitatif olarak tanımlanmaları ve ticari olarak üretilen bitkisel kaynaklı ekstraktların validasyonlarının yapılması gerekmektedir. Ancak şimdiye kadar literatürlerde bitkilerin ihtiva ettiği 6500'den fazla fenolik yapılı antioksidan madde tanımlandığı düşünülürse her bir antioksidan maddenin spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle tanımlanması zaman alıcı ve maliyetlidir. Bu nedenle yüksek miktarda fenolik madde içerdiği düşünülen bitkilerin öncelikle antioksidan aktiviteleri

belirlenmektedir. Buna bağlı olarak bitkilerin biyokimyasal yapıları tanımlanmaktadır. Bitkilerin ihtiva ettiği fenolik maddeler bitkilerin kök, gövde, yaprak, çiçek ve meyve gibi organlarında farklı dağılım göstermektedir. Bununla birlikte aynı bitki türü, iklim değişiklikleri, ekim şartları, büyüme ortamı ve çevresel koşulların etkisiyle metabolizmalarında sentezlenen fenolik yapılarında farklılık göstermekte ve buna bağlı olarak antioksidan aktiviteleri değişmektedir. Çünkü bitkilerin ikincil metabolitleri olarak adlandırılan bu fenolik yapıların sentezi bitkilerin genomik yapılarına bağlıdır. Özellikle aynı bitkinin farklı türlerindeki antioksidan aktivite ve fenolik yapı dağılımındaki farklılık bitki genomuna bağlı olarak sentezlenen ve fenolik maddelerin sentezinde rol oynayan enzimlerin sentezine bağlıdır. Bir bitkide sentezlenen enzim bir diğerinde sentezlenmeyebilir. Yine farklı ülke ya da aynı ülkenin farklı bölgelerinde yetişen aynı tür bitkiler biyokimyasal bileşim ve antioksidan aktivite bakımından farklılık göstermektedir. İklime bağlı olarak bitki genomunda meydana gelen mutasyonlar ya da adaptasyon bunun en büyük sebebidir. Sonuç olarak fenolik maddenin hücrede farklı miktarda sentezi bile antioksidan aktivite bakımından önemlidir.

Türler arası veya tür içi farklılığın tanımlanması ya da çevresel koşulların ve iklimin bitkinin biyokimyasal yapısına etkisinin genler tarafından kontrol edildiği düşünüldüğünde aynı bitki türü içerisinde meydana gelen biyoçeşitliliğin ve biyokimyasal mekanizmaların araştırılması oldukça önemlidir. Bu amaçla DNA markır yöntemleri olarak adlandırılan DNA'nın çeşitli yöntemlerle çoğaltılması ya da işlenmesine dayalı moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bireyler arasında genetik farklılığı belirlemek amacıyla kullanılan ve kısaca PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) olarak ifade edilen polimeraz zincir reaksiyonununa dayalı DNA markır yöntemlerinin başlıcaları; AFLP, SSR, ISSR, SNP ve RAPD yöntemleri olup bu yöntemlerden RAPD (Rasgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi) tekniği, basit olması, az miktarda DNA gerektirmesi ve polimorfizm oluşturma potansiyelinden dolayı aynı genotiplerin DNA parmak izlerinin çıkartılmasında sık kullanılan bir tekniktir. Oldukça etkili bir yöntem olarak birçok uygulamada kullanılan RAPD tekniği hızlı sonuç vermesi, ön bilgi, alt yapı ve radyoaktif işaretleme gerektirmemesi ve özellikle moleküler varyasyon ya da varyasyonları açıklaması nedeniyle bir çok bitki türünde, türlerarası ve tür içi polimorfizmin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Mehetre ve ark., 2004). Bu nedenle bu çalışmada *Ginkgo biloba*'nın moleküler

analizi için RAPD-PCR tekniği tercih edilmiştir. RAPD-PCR yöntemi diğer DNA markır yöntemlerinde olduğu gibi genetik çeşitlilik analizlerinde iki temel aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalardan ilki, DNA izolasyonu ve ikincisi ise PCR optimizasyonudur.

Bitkilerin kimyasal, biyolojik ve moleküler teknikler bir arada kullanılarak bitkilerin gerek kimyasal gerekse moleküler ve biyolojik olarak tanımlanmaları etki mekanizmalarının açıklanması, kimyasal yapılarının tanımlanması ve ekstraktlarının ticari olarak üretilmesine ilişkin validasyon çalışmalarının yapılması bakımından oldukça yararlıdır. Tıbbi aromatik bitkiler ve biyoaktif bileşiklerinin bugünkü kullanımı dünya çapında bilimsel bilgi gerektirmektedir. Günümüzde pek çok hastalığın yaygınlaşması ve kanser gibi yeni hastalık türlerinin meydana gelmesi ile sentetik ilaçların yan etkileri "fitobilim" olarak adlandırılan yeni ve modern bir alanın oluşmasına sebep olmuştur. Fitobilim, ekonomi, kimya, biyokimya, fizyoloji, mikrobiyoloji, tıp, genetik, moleküler biyoloji ve tarım gibi farklı alanları birleştirerek disiplinlerin entegrasyonunu sağlamıştır. Bu yeni alan, biyomedikal alan için oldukça değerli bilgiler sağlar. Bu bilim ışığında özellikle alternatif tıp ya da tamamlayıcı tıp olarak adlandırılan ve geleneksel tıpta kullanılan bitkilerin sağlık açısından yararlı olup olmadığını, eğer öyleyse, etki mekanizmalarının ne olduğunu açıklamakta ve bu bitkilerin ilaç ya da gıda sektöründe kullanabilirliği hakkında bilgi sağlamaktadır. Ayrıca bu alanda bitkilerin kimyasal yapıları kromatografik ve spektroskopik teknikleri içeren analitik yöntemlerle tanımlanabilmekte ve tanımlanan bu bileşikler bu yöntemlerle valide edilebilmektedir. Çünkü pek çok araştırmacı bitkilerin güvenilirlilik bakımından bazı riskler taşıdığını bildirmektedir. Bu nedenle biyoaktif fitokimyasalların tanımlanması, yan etkilerinin araştırılması ve kullanımı için uygun dozların belirlenmesi, ekstraksiyonu, korunması ve yararlı ise yaygınlaştırılması fitobilim kapsamına girmektedir (Ahmad ve ark., 2006). Ayrıca bu bilim tıbbi bitkilerin ticari olarak satışı için reçete düzenlenmesi ile ilgili hukuki yönleri de kapsamaktadır. Bu alanın en çok ihtiyaç duyduğu şeylerden biri de tüm bu disiplinleri bir araya getirerek kimyasal, biyolojik ve moleküler özellikleri tanımlanan bitkilerin tarımsal alanda yaygınlaştırılması istenen özelliklerinin geliştirilmesine yönelik melezlemeye dayalı bitki ıslah çalışmalarına katkıda bulunmasıdır. Özellikle mevcut tarımsal alanların yok olması ve kirlenmesi ya da doğanın iklim değişiklikleri ile mücadelesi ve bununla birlikte ekolojik dengenin

bozulması ve nüfusun her geçen gün artması ile dünyada besine ve enerjiye olan ihtiyaç beslenme açısından besin değeri, sağlık açısından fenolik yapı miktarı ve antioksidan kapasitesi daha yüksek ve metrekare toprak başına verimi daha fazla bitkilere ihtiyacı artırmaktadır. Bu nedenle bitki ıslah çalışmaları oldukça önemlidir. *Ginkgo biloba'*nın moleküler, morfolojik ve kimyasal olarak tanımlanmasını bir araya getiren bu tez bu açıdan oldukça önemlidir.

Bu çalışmada Japonya ve Güney Amerika'da yetişen ve dünyada en çok satılan bitkiler arasında olan *Ginkgo biloba*'nın kimyasal ve moleküler analizine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Böylece Türkiye için endemik olmayan bu önemli tıbbi aromatik bitkinin ülkemizde yetiştirildiği takdirde endemik olduğu diğer ülkelerdeki gibi antioksidan aktivitenin yüksek olup olmadığı araştırılmış ve fenolik yapıları analiz edilerek iklim değişikliğine bağlı olarak göstermiş olduğu fenolik yapı dağılımı ortaya konulmuştur. Bununla birlikte Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba*'nın RAPD-PCR yöntemi ile gen yapısı aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ayrıca bu yöntemle Almanya'da yetişen *Ginkgo biloba*'nın gen yapısı ile benzerlik ve farklılıkları bulunarak dendogramları çıkartılmıştır.

2. RADİKALLER

Serbest radikaller, bir orbitalde sadece bir veya birden fazla ortaklanmamış elektron bulunduran kimyasal türlerdir. Böyle bir kimyasal tür, basit bir atom ya da kompleks yapılı bir organik molekül olabilir. Her türlü kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerinde bulunan elektronlar sayesinde gerçekleşmektedir (Yalçın, 2007). Hidrojen, karbon, azot, oksijen ve diğer bazı elementler atomik yapılarında paylaşılmamış elektron içerdiklerinden, doğada atomları şeklinde değil moleküler halde bulunurlar.

Serbest radikaller ile ilgili çalışmalar Gomberg'in 1900'larda trifenilmetil radikalinin ($Ph_3C\bullet$) varlığını ispatlamasıyla başlamıştır (Gomberg, 1900). Radikallerin reaktiviteleri farklılık arz etmesine rağmen genellikle radikal olmayan türlerden daha az kararlıdırlar. Çünkü dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron bulunduğu için radikallerin kimyasal reaktiviteleri oldukça yüksektir (Halliwell ve Gutteridge, 1989a; Uğuzlar, 2009). En basit serbest radikal, bir proton ve bir elektron ihtiva eden hidrojen atomudur. Hemen her radikal türü diğer bir radikali veya molekülü farklı bir mekanizma ile etkileyebilir. Bu tür etkileşimlerin seçiciliği, radikallerin konsantrasyonuna, radikalde bulunan ortaklanmamış elektronların delokalizasyonun ve radikallerin etkileştiği moleküllerin zayıf bağlar içermesine bağlıdır. Bununla birlikte pek çok biyolojik molekülün radikal oluşumunu aktive ettiği ya da radikallerle etkileşime girdiği bilinmektedir. 1960'ların başlarında ilk olarak süperoksidin ksantin oksidaz ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Uğuzlar, 2009). Böylece metabolik yollardaki biyokimyasal reaksiyonlarda serbest radikal oluşumuna ilişkin pek çok çalışma ve araştırma yapılmaya başlanmış ve günümüzde halen devam etmektedir. Serbest radikaller normal hücresel metabolizma sırasında oluşabildiği gibi çeşitli dış etkenler aracılığı ile meydana gelebilir. Çevresel koşullar, hava kirliliği, doğal olmayan ürünlerle beslenme ve sigara gibi yabancı maddelerin vücuda alınması da serbest radikal oluşumunu tetikler.

Oksidatif stres, organizmadaki pro-oksidan ve antioksidan dengenin bozulması olarak tanımlanır. Radikaller, lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi temel hücresel bileşenlerde hasara yol açmaktadırlar. Oluşan bu hasarın kanser, yaşa bağlı bağışıklık yetersizliği, diabet ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklara neden olduğu bilinmektedir. Serbest radikaller özellikle biyolojik yaşlanma sürecinde etkin

rol oynarlar (Uğuzlar, 2009). Bununla birlikte, günümüzde hemen her hastalığın bir dereceye kadar oksidatif strese bağlı olduğu kabul edilmektedir (Çakatay ve Kayalı, 2004**)**. Serbest radikaller yalnızca canlı metabolizmasında sorun teşkil etmezler. Lipit peroksidasyonunun serbest radikalik reaksiyonları gıda endüstrisinde de karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir. Bu nedenle, tıpta, biyolojide, toksikolojide ve gıda ile farmasötik sanayinde serbest radikallerin tanımlanması ve giderilmesi konusuna yoğun bir ilgi vardır (Halliwel ve Gutteridge, 1989b; Uğuzlar, 2009).

2.1. Radikallerin Oluşumu

Canlı metabolizmasında hücrelerde meydana gelen pek çok biyokimyasal olayda yüksek miktarda radikal üretilmektedir. Bununla birlikte serbest radikal üretiminde çevresel faktörlerin de rolü büyüktür. UV ışını, beslenme ile alınan ksenobiyotikler ve radyoaktivite gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal etkiler metabolizmadaki radikal üretiminde artışa neden olur. Bu radikal üretimi başlıca 3 temel mekanizma ile gerçekleşir (Kılınç ve Kılınç, 2002; Ardağ, 2008).

a) Kovalent bağların homolitik kırılması: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500-600°C) etkisiyle kimyasal bağları meydana getiren iki elektrondan her birinin ayrı ayrı atomlar üzerinde kalmasıyla meydana gelen kırılmaya homolitik kırılma denir. Böylece her iki atom üzerinde paylaşılmamış birer elektron kalır. Organik moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda zıt yüklü iyon çiftleri oluşur. Oluşan bu türler reaktiftir (Yalçın, 2007)**.**

b) Elektron kaybı: Askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller (E vitamini) gibi radikal olmayan ve hücrede bulunan antioksidanların tek elektron vererek radikal türleri indirgemeleri esnasında dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa, bu yapıların radikal formları oluşur. Örneğin, Glutatyon (GSH) radikaller tarafından indirgenirken kendisi tiyil radikaline ($GS^{\cdot}$) dönüşür. İki tiyil radikalinin birbiriyle tepkimesi sonucu oluşan tür ise glutatyonun oksitlenmiş (GSSG) formudur (Bachmayer, 2004).

c) Elektron transferi: Radikal özelliği taşımayan herhangi bir moleküle tek elektron transferi ile molekülün dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşturuluyorsa böyle bir indirgenme radikal oluşumuna yol açar. Örneğin solunum yoluyla havadan alınan

moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi radikal formu olan süperoksitin ($O2^{-\cdot}$) oluşumuna neden olur. Bu mekanizma ile radikal oluşumu biyolojik sistemlerde yaygın olarak gerçekleştiğinden canlılar için önemlidir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

2.2. Serbest Radikaller

Canlıların yaşam kaynağı oksijen fiziksel ve kimyasal olaylarla oksijen radikalleri oluşturmaktadır. Özellikle oksijeni metabolize eden canlılarda reaktif oksijen türleri enzim katalizli pek çok metabolik yolla ya da çeşitli biyolojik fonksiyonlarla kolayca meydana gelmektedir. Bununla birlikte UV veya mor ötesi ışınlara maruz kalındığında ya da vücuda yabancı maddeler alındığında reaktif türlerin oluşması kaçınılmazdır (Sies, 1991). Özellikle normal oksijen metabolizmasında oluşan süperoksit ve hidroksil radikali ile hidrojen peroksit başlıca reaktif oksijen türleridir. Bununla birlikte diğer önemli reaktif türleri de Çizelge 2.1'de verilmiştir (Uğuzlar, 2009).

Çizelge 2.1. Oksijen ve nitrik oksit türevli radikaller

Kimyasal yapısı	Tür adı	Kimyasal yapısı	Tür adı
$^1O_2$	Singlet oksijen	$HO_2^{\cdot}$	Hidroperoksil radikali
$O_2^{-\cdot}$	Süperoksit	$NO^{\cdot}$	Nitrik oksit
H_2O_2	Hidrojen peroksit	NO2	Nitrojen dioksit
$^{\cdot}OH$	Hidroksil radikali	$NO2^+$	Nitril katyonu
$ROO^{\cdot}$	Peroksil radikali	$ONOO^-$	Peroksinitrit
ROOOH	Hidroperoksit	$ONOO^{\cdot}$	Peroksinitrit radikali
$RO^{\cdot}$	Alkoksil radikali	N_2O_3	Dinitrojen trioksit

2.2.1. Süperoksit radikali

Süperoksit, moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle meydana gelir. Süperoksit radikalleri metabolizmanın normal biyokimyasal reaksiyonlarında çok miktarda sentezlenir. Bununla birlikte süperoksit radikalleri daha çok aerobik hücrelerde oluşmaktadır. Özellikle hücrenin elektron transfer sistemlerinde meydana gelir. Biyolojik olarak oldukça toksik olmaları nedeniyle süperoksitler vücudun

savunma sisteminde aktif rol alarak mikroorganizmaları öldürürler. Bu nedenle fagositlerde patojenlerin savunma mekanizmalarını yok etmek için NADH oksidaz enzimi tarafından fazla miktarda üretilirler (Nordberg ve Arner, 2001). Bunun yanında mitokondrideki solunum zincirinde meydana gelen oksijen kaçakları sonucu bol miktarda üretilirler (Ak, 2006). Süperoksitlerin bir diğer kaynağı da ksantin oksidaz enzimidir (Bachmayer, 2004). Süperoksit radikalleri birçok enzim tarafından meydana getirilebildiği gibi enzimatik olmayan elektron transferleri sonucu da oluşabilmektedir (Halliwel ve Gutteridge, 1992). Hücresel koşullarda üretilen süperoksit, oksitleyici veya indirgeyici olarak davranabilir. Böylece aldığı elektronu metal iyonlarına, sitokrom c'ye ya da bir radikale verirse tekrar oksijene dönüşebilir (Yalçın, 2007). Bunun aksine oksijenden daha oksitleyici olan süperoksit bir elektron daha alırsa peroksi anyonuna indirgenebilir. Ancak bu tepkime biyolojik moleküllerin oksidasyonuna neden olmaktadır. Süperoksit radikalleri sulu çözeltilerinde askorbik asidi oksitlerken sitokrom c ve ferriketilendiamintetraasetik asit (Fe_3EDTA) gibi bazı demir komplekslerini de indirgeyebilir. Süperoksit radikalinin giderilmesi görevini metabolizmada süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, O_2•- radikalinin peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizleyerek gerçekleştirmektedir (Ak, 2006). Böylece süperoksitler kendilerinden daha az reaktif olan H_2O_2'e çevrilirler.

$$2O_2\bullet^- + 2H^+ + SOD \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

SOD tarafından katalizlenen bu tepkime dismutasyon tepkimesi olarak adlandırılır. Süperoksit, özellikle zayıf asidik ortamda SOD olmadan kendiliğinden dismutasyonla da H_2O_2'e çevrilebilir (McCord, 2000). SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli patolojik durumlarda süperoksit yapımının artmasıyla süperokside özgü tepkimeler görülmeye başlar. Süperoksitlerin metal iyonları üzerine etkisi nedeniyle proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında değişiklikler meydana gelebilir. Özellikle metal iyonlarını indirgeyen süperoksit radikalleri metalleri bağlı oldukları proteinlerden koparabilirler (Halliwel ve Gutteridge, 1989b). Ayrıca enzim kofaktörlerinin de oksidasyon düzeylerini bozarak enzimleri inhibe ederler. Bunların yanında metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikalinin sentezi reaksiyonunu hızlandırırlar. Diğer radikallere göre daha az reaktif olsa da süperoksitler indirgenmiş nükleotidleri, bazı

amino asitleri ve antioksidan bileşikleri oksitlerler. Süperoksitler hücre zarlarının hidrofobik ortamlarında daha uzun ömürlüdür ve çözünürlükleri daha fazladır. Süperoksitler fosfolipidler nedeniyle asidik olan hücre zarından kolayca bir proton alarak hidrojen peroksit radikalini (H_2O_2) oluştururlar (Berlett ve Stadtman, 1997; Dalle-Donne ve ark., 2003).

2.2.2. Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit, oksijenin iki elektron alarak ya da süperoksitlerin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşmaktadır. Bununla birlikte hidrojen peroksit biyolojik sistemlerde süperoksitten elektron transferi sonucu süper oksit dismutaz enzimi (SOD) ile enzimatik dismutasyon tepkimesi ile ya da süperoksit moleküllerinin kendiliğinden meydana getirdiği enzimatik olmayan dismutasyon reaksiyonu sonucu oluşur (Sarı, 2008). Süperoksidin dismutasyonu süperoksit moleküllerinin iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturmasına dayanmaktadır.

$$2O_2\bullet^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

Süperoksitlerin dismutasyonunun yanında hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin yine çevresindeki moleküllerden iki elektron almasıyla oluşan peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu oluşur (Fridovich, 1975; Mates ve Sanchez-Jimenez, 1999; Nordberg ve Arner, 2001).

$$O_2\bullet^- + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

Hidrojen peroksit yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımamaktadır. Bu nedenle reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksidin oksitleyici bir tür olarak kabul edilmesi, demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında Fenton reaksiyonu sonucu en reaktif ve zararlı radikal olan hidroksil radikalini oluşturmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$)

varlığında Haber-Weiss reaksiyonu ile hidroksil radikali (OH•) oluşturur (Akyüz, 2007).

Fenton reaksiyonu

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\bullet + OH^-$

Haber-Weiss reaksiyonu

$O_2\bullet^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O + OH\bullet$

Hidrojen peroksitin metallerle etkileşimine en önemli örnek kanda bulunan ve oksijenin taşınmasından sorumlu olan hemoglobinin yapısındaki hem grubuna bağlı olan demir ile tepkimeye girerek yükseltgenmiş reaktif demirin formlarını oluşturmasıdır. Bu demir formu çok güçlü bir oksitleyici olup hücre zarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle, biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir (Yalçın, 2007). Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimlerden olan katalaz ve peroksidaz yerine getirir (Ak, 2006).

2.2.3. Hidroksil radikali

Hikroksil radikali hücre içerisinde 10^{-9} sn'lik bir yarılanma ömrüne sahip, oksijen merkezli ve oldukça reaktif olan bir radikal türüdür. Hikroksil radikali süperoksitin Haber-Weiss ve hidrojen peroksitin metal katalizörlüğünde gerçekleştirmiş olduğu Fenton reaksiyonları sonucu oluşmaktadır (Akyüz, 2007). Bunların yanında hidroperoksitlerin (ROOH) parçalanması veya suyun radyasyona maruz kalması ile oluşabilmektedirler. Haber-Weiss ya da Fenton tepkimesi ile oluşan OH• miktarı, vücutta üretilen H_2O_2 derişimi ve serbest metal iyonlarının varlığına bağlıdır (Halliwel ve Guttridge, 1989a). Süperoksit hem H_2O_2'nin öncülü hem de metalleri indirgeyici bir tür olduğundan biyolojik ortamda süperoksit oluşumunun arttığı ortamda OH• üretimi de artar. Fenton tepkimesini katalizleyen en aktif metaller demir ve bakırdır. Biyolojik sistemlerdeki en reaktif tür olan OH• elektron alma ilgisi nedeniyle ortamda rastladığı her biyomoleküle elektron transferi, hidrojen çıkarma ve katılma gibi mekanizmalarla tepkimeye girer (Sarı, 2008). Hidroksil radikali katılma tepkimelerini özellikle nükleik asitlerin ihtiva ettiği pürin ve pirimidin bazları ile aromatik amino asitler gibi elektronca zengin halkalı

yapılarla gerçekleştirir. Hidroksil radikalinin organik moleküllerden hidrojen atomu alarak suya indirgendiği tepkime, hidrojen çıkarma tepkimesi olarak bilinir. Bu nedenle hücre membranı dahil pek çok biyomoleküle saldıran hidroksil bu moleküllerin yapı ve fonksiyonlarında değişiklikler meydana getirerek hücrede hasara neden olur. Ayrıca nükleik asit, protein ve lipidlerde başlatılan radikalik tepkimelerde binlerce farklı ara ürün oluşabilir (McCord, 2000).

Hidroksil radikalinin hücre membranında oluşturduğu hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Hücre zarı su içermediğinden OH•'ın başlıca hedefi yağ asididir. Hücre zarındaki lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve hücrenin geçirgenliğini artırıp yine hücre ölümüne neden olabilir. Özellikle OH• yapımını katalizlemelerindeki etkileri nedeniyle hidrojen peroksit radikali canlılarda metal iyonların radikal hasarlarından birinci derecede sorumludur (Akkuş, 1995; Baykal ve Kocabalkan, 2000). Lipit peroksidasyonu sonucu membranı parçalanan ve stabilitesi bozulan hücrelerin, akciğer rahatsızlıklarına, böbrek hasarlarına, damar tıkanıklığına, yaşlanmaya ve kansere sebep olduğu da bilinmektedir (Ak, 2006). Hidroksil radikalinin nükleik asitler ile vermiş oldukları tepkimeler sonucu DNA ve RNA üzerinde baz modifikasyonları, baz delesyonları ve zincir kırılmaları gibi çeşitli mutasyonlar meydana gelebilir. Bu mutasyonlar sonucu nükleik asitlerin transkripsiyonu ile başlayan protein sentez mekanizmalarında değişlikler meydana gelir. Böylece enzim katalizli pek çok metabolik yolda hasarlar meydana gelebilir. İleri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne ya da pek çok kanser türüne neden olmaktadır (Uysal, 1998; Yalçın, 2007). Bununla birlikte proteinler doğru sentezlense bile proteinlerin oksidasyonları ile meydana gelen yapısal değişiklikler proteinleri proteolitik yıkıma kadar götürür. Ayrıca yapısal değişime bağlı olarak protein yapılarında meydana gelen değişiklikler enzim görevi gören proteinlerin fonksiyonlarını da olumsuz yönde etkilemektedir. Bunun yanısıra dışarıdan diyetle alınan veya çevrede bulunan pro-oksidan bileşiklerin de DNA hasarlarına ve yaşlanma ile ilgili patolojik durumlara sebep olduğu bildirilmiştir (Cros ve ark., 1987; Ames ve ark., 1993; Uysal, 1998; Sarı, 2008).

2.3. Canlılarda Oksijen Radikallerinin Kaynağı

Hücrede bulunan oksijen radikalleri hem dış kaynaklı (ekzojen) hem de iç kaynaklı (endojen) olarak oluşmaktadır. Özellikle oksijenin metabolize edildiği canlılarda hücrenin normal metabolik reaksiyonlarında önemli derişimlerde radikal üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu radikaller hücrede meydana gelen pek çok biyokimyasal reaksiyon sırasında ara ürün olarak oluşabilmektedirler. Böylece bir dizi enzim sentezi ve organizmanın bakterilere karşı savunmasında rol oynarlar. Bu radikallerin üretimi ya da metabolizmada herhangi bir nedenle oluşumu belirli bir seviyenin üzerine çıktığı zaman canlı için ciddi tehlikeler oluşturmaktadır.

Canlılar yaşamlarını sürdürmek için havanın oksijenini (O_2) kullanırlar. Organizmanın dışarıdan solunum youluyla aldığı oksijenin %90'ından fazlası elektron transport zinciri (solunum zinciri) ve %5-10'u da diğer metabolizmada oksijen gerektiren reaksiyonlardan sorumludur (Ak, 2006). Elektron transport zincirinde moleküler oksijen hücreye enerji sağlayan glukoz, yağ asidi ve amino asitlerin karbon iskeleti gibi biyomoleküllerden türeyen NADH ve $FADH_2$'den elektron transferi gerçekleştirir (Mates ve Sanchez-Jimenez, 1999). Böylece bir elektron alarak oluşan süperoksit metabolize edilerek suya indirgenir (Tüzün, 2002). Bu yolla oksijen molekülünün kuvvetli oksitleyici gücü ATP'nin yüksek enerjili fosfat bağı haline dönüştürülür. Ancak mitokondriyal elektron transport zincirinde sızıntılar meydana gelebilir. Bu durumda mitokondriden hücrenin diğer bileşenlerine geçen serbest oksijen radikali doku ve organlara zarar verebilir (Tietz, 1995; Dawn ve ark., 1996).

Mitokondrinin yanında diğer bir hücre organeli endoplazmik retikulum ile çekirdek membranındaki serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır (Karasawa ve Kubo, 1990; Schrier ve ark., 1997; Engin, 2007). Ancak hücrede hidrojen peroksitin en önemli kaynağı peroksizomlardır. Peroksizomlardaki bazı oksidaz enzimleri çok miktarda hidrojen peroksit üretirler. Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında oksidaz (oksijeni suya veya hidrojen perokside indirgeyen enzimler) ve oksijenaz enzimleri (oksijeni okside olan moleküle bağlayan enzimler) görev alır (Akkuş, 1995; Burtis ve Ashwood, 1999). Özellikle peroksizomlarda bulunan D-amino asit oksidaz, ürat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açil-CoA gibi oksidazların katalizlediği enzim reaksiyonları ara ürün olarak hidrojen peroksit açığa çıkarır. Peroksizomlarda meydana gelen

hidrojen peroksiti burada bulunan CAT (katalaz enzimi) suya indirger (Engin, 2007). Ksantinoksidaz enzimi purinlerin yıkılımı esnasında hipoksantinin ksantine ve ksantinin de ürik aside dönüşümünde kullanılan moleküler oksijeni hidrojen perokside indirgemektedir (Granger ve ark., 1981; Granger, 1988). Bununla birlikte aldehit oksidazlar da çeşitli reaksiyonlarla süperoksit radikali üretirler. Gerek peroksizomlarda gerekse hücrenin diğer bölgelerinde oluşan hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri peroksidazlar tarafından indirgenir. ATP oluşumu ihtiva etmeyen aminoasitlerin katabolizması, ilaçların detoksifikasyonuyla ve steroid hormonların sentezi gibi spesifik metabolik yollarda da moleküler oksijenden çeşitli reaktif oksijen türleri üretilmektedir (Ak, 2006).

Bir diğer endojen radikal kaynağı da yağ asitlerinden araşidonik asidin metabolizması sonucu oluşan enzimatik lipid peroksidasyonudur. Otooksidasyona dayanan bu metabolik reaksiyon ile fagositik hücrelerin uyarılması fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonunu sağlar, böylece hücre membranından salınan araşidonik asit enzimatik olarak oksidasyona uğrar ve çeşitli serbest radikaller meydana getirir (Sarı, 2008). Hücresel savunma mekanizmasında fagositik lökositler herhangi bir yabancı madde ya da bakteri varlığında uyarılarak lizozomal komponentlerini dışarıya salar. Böylece lizozomal reaktif oksijen türleri ile karşılaşan bakteriler ölür (Steinman, 1982). Ancak mitokondri dışında meydana gelen oksijen tüketimi nedeniyle solunumsal bir patlama meydana gelir. Bu yolla üretilen reaktif oksijen türleri yalnızca bakterilere zarar vermekle kalmaz ayrıca hücrenin kendisine de zarar verilebilir. Ekzojen kaynaklı serbest radikal üretimi ise dışarıdan alınan ve ksenobiyotik olarak adlandırılan metabolizma için zararlı sentetik kimyasalları ihtiva eden çeşitli gıdalardan kaynaklanır. Bu yabancı toksik maddeler serbest radikal üretimini artırır ya da serbest radikallerin giderilmesini sağlayan ve özellikle sebze ve meyveler ile pek çok bitki türünde mevcut olan fenolik yapıların antioksidan aktivitelerini düşürürler. Özellikle günümüzde yaygın olarak kullanılan sigaranın dumanında bulunan NO_2 bileşiği ve $NO_2^{\cdot}$ radikali sigara olefinleri ile reaksiyona girerek karbon merkezli radikaller oluşturmaktadır (Papas 1996; Uğuzlar, 2009). Sigara kullanımı ile nötrofiller aktive edilerek dolaylı yoldan serbest radikal üretimi artmaktadır. Çünkü yabancı organizmaları öldürmek amacıyla nötrofil, monosit, makrofaj ve eosinofil gibi fagositler süperoksit ve hidrojen peroksit üretirler (Ak, 2006). Bunun yanında ultraviyole ışınları, ultrason ya da radyasyon ve mor ötesi

ışınları doku ve organlar ile özellikle ciltte reaktif oksijen türlerinin oluşmasına sebep olmaktadır. Bununla birlikte hücre membranında bulunan lipidler de otooksidasyona uğrayarak çeşitli reaktif türler meydana getirirler**.**

2.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri

Moleküler oksijen (O_2), parelel spin durumlu iki ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektrona sahiptir. Bilindiği gibi ortaklanmamış elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar. Fe^{+3}, Cu^{+2}, Mn^{+2} ve Mo^{+5} gibi geçiş metalleri ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Ancak serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler (Uğuzlar, 2009). Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen, bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Biradikal oksijenin elektronlarından birinin enerji olarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitalle yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür ve delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Organizmada Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi geçiş metalleri içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi oksidasyon reaksiyonlarını meydana getirir. Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturma eğilimindedir (Halliwel ve Guttridge, 1989a).

Serbest radikallerin metabolizmada meydana getirdiği etki özellikle reaktif oksijen türlerinin metabolizmadaki pek çok biyokimyasal molekülle etkileşime girerek onların yapılarında kimyasal değişiklikler meydana getirmesi ve buna bağlı olarak biyolojik fonksiyonlarını bozmasıdır. Serbest radikallerin hücre, DNA, protein ve lipid üzerinde meydana getirdiği olumsuz etkiler özellikle doku ve organlarda oksidatif strese yol açarak pek çok hastalığın meydana gelmesinde rol oynar. Özellikle son yıllarda yapılan araştırmalar kalp, damar tıkanıklıkları, diabet, yaşlanma ve bazı kanser türlerinin serbest radikallerle doğrudan ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Vaya ve Aviram, 2001; Wada ve Ou, 2002). Savunma sistemine aşırı yüklenme, aterosklerozise (damar sertliği), kandaki oksijen azlığı anoksiaya ve aktifleşmiş fagositik hücrelerin aşırı $O_2\bullet^-$, H_2O_2 ve HClO üretimi alzhemier, astım,

asbestosi ve romatizmal artirite sebep olmaktadır. Serbest radikaller nedeniyle hücrelelerde meydana gelen yapısal bozunmalar nöral lipofuskinosis, multiple sklerosis ve parkinson hastalığına neden olurken savunma sistemindeki aşırı yüklenme veya hatalar down sentromuna sebep olmaktadır (Engin, 2007). Antioksidan sistemlerdeki gen hasarı, kronik granülomatöz hastalığına ve anormal substrat oksidasyonu veya oksijen konsantrasyonundaki değişim, diabetes mellitusa yol açar. Geçiş metallerinden oksijene elektron transferi sonucu idoyopatik hemokromatosis talesemi ile mesane, bağırsak, göğüs, kolorektal, karaciğer, akciğer, lösemi, deri ve prostat kanseri gibi pek çok kanser türüne sebep olmaktadır (Steinman, 1982).

2.4.1. Serbest radikallerin hücreye etkileri

Serbest radikallerden süperoksit ve hidroksil radikalleri hücre membranındaki lipid molekülleri ile etkileşime girer. Serbest radikaller özellikle sitoplazma, mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olarak membranların geçirgenliğini artırır. Hücre ve organellerin geçirgenliğinin artması nedeniyle hücrenin ihtiva ettiği aminoasit ve proteinler ile mitokondriyal ve çekirdek DNA'ları içeriye kolayca difüze olan serbest radikaller tarafından çeşitli etkileşimlerle yıkıma uğratılılabilirler (Engin, 2007). Sonuç olarak serbest radikaller hücrelerde hasara neden olur (Şekil 2.1). Bu da hücre ölümlerine yol açarak pek çok hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunur.

2.4.2. Serbest radikallerin nükleik asitlere etkileri

Hidroksil radikali (OH•) deoksiriboz ve çekirdek bazları ile kolayca reaksiyona girer. Bununla birlikte aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit (H_2O_2) membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücrenin ölümüne yol açabilir (Engin, 2007; Uğuzlar, 2009). Serbest radikallerin hücreye girmesi ile nükleik asitleri oluşturan deoksiriboz, riboz, purin (adenin ve guanin) ve pirimidin (sitozin, urasil ve timin) bazları hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek yine DNA ve RNA üzerinde çeşitli değişiklikler meydana gelir (Dennis ve ark., 1979; Gould ve Hay, 1982). Serbest radikaller, DNA ve RNA'nın yapısında bulunan çekirdek bazlarında metillenme ve

2.4.3. Serbest radikallerin proteinlere etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin oksidasyonu genellikle OH• radikalinin proteinlerin polipeptit yapılarının yan zincirlerinde bulunan gruplarla etkileşime girmesiyle başlar. Özellikle serbest radikal etkisini belirleyen faktör proteinin aminoasit bileşimi ve dizilimidir. Özellikle amino asit zincirinde çift bağ ve sülfür grubu ihtiva eden sistein, triptofan, fenil alanin, metionin, tirozin içeren proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenirler (Gutteridge, 1995; Sarı, 2008). Bu etkileşim sonucunda özellikle sülfür ve karbon merkezli radikaller oluşmaktadır. Serbest radikaller proteini polipeptit zincirini kıracak şekilde de oksitleyebilirler (Dalle-Donne ve ark., 2003). Bununla birlikte immünoglobulin G (IgG) ve albumin gibi polipeptit zincirleri arasında disülfit bağları olan proteinlerin üç boyutlu yapıları bozularak proteinler fonksiyonlarını yitirebilir. Yine metabolizmanın şeker düzeyini belirleyen insülin de disülfit bağı ihtiva ettiği için serbest radikaller diabette de rol oynar. Aminoasitlerden prolin ve lizin, reaktif oksijen türlerine maruz kaldıklarında hidroksilasyona uğrayarak protein yapılarında değişiklikler meydana getirir (Dawn ve ark., 1996; Berlett ve Stadtman, 1997; Stadtman, 2002; Engin 2007).

2.4.4. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelmekte ve açığa çıkan okzoaldehitler proteinlere bağlanarak proteinlerin fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemektedirler (Ceballos ve ark., 1992). Özellikle karbonhidratların oksidasyonu sonucu oluşan ürünler çeşitli patolojik süreçlerde rol oynarlar (Burtis ve Ashwood, 1999). Bu metabolik olaylar kanser, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, cilt hastalıkları, romatoit artrit, behçet hastalığı, çesitli deri ve göz hastalıkları ile erken yaşlanmaya sebep olmaktadır (Engin, 2007).

2.4.5. Serbest radikallerin lipidlere etkileri

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu

doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ile başlar. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Böylece hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ve lipid peroksit radikalleri oluşur. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" denir. Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur (Akkuş, 1995; Tietz, 1995; Dawn ve ark., 1996; Burtis ve Ashwood, 1999).

2.5. Serbest Radikallere Karşı Savunma Sistemleri

Redoks reaksiyonları, biyolojik oksidasyonların kalbidir. Redoks reaksiyonlarında indirgen (redüktan) ve yükseltgen (oksidan) kimyasal terim olarak kullanılırken, biyolojik sistemlerde buna karşılık olarak antioksidan ve prooksidan terimleri kullanılmaktadır. Antioksidanlar serbest radikallerin olumsuz etkilerini durduran veya yok eden maddelerdir. Antioksidanlar, hidroksil, süperoksit ve nitrik oksit gibi pek çok radikalle hızlı bir şekilde reaksiyona girerek otooksidasyon ya da peroksidasyon reaksiyonlarının ilerlemesini önleyen maddeler olarak da tanımlanır. Bu yolla antioksidanlar, hücrelere zarar veren reaktif oksijen ve azot türleri gibi serbest radikalleri indirgeyerek toksik olmayan ürünlere dönüştürürler (Uğuzlar, 2009). Böylece antioksidanlar yükseltgenebilen substratlara göre daha düşük konsantrasyonlarda, substratın çeşitli radikallerle başlayan oksidasyonunu ciddi derecede engeller ya da geciktirirler. Sonuç olarak serbest radikaller gibi metabolizma için oldukça zararlı olan bileşiklerin varlığı sağlıklı bir yaşam için antioksidanları önemli kılmaktadır (Ramarathnam ve ark., 1988).

Metabolizmada reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" olarak bilinir. Bu mekanizmalar organizmanın normal oksijen metabolizmasının toksik etkilerine karşı kendisini koruması için gereklidir (Köksal, 2007). Bu nedenle biyolojik sistemlerde antioksidan savunma mekanizmasının araştırılması ile ilgili çalışmalar son yıllarda büyük önem

kazanmıştır (Halliwell ve Gutteridge, 1989b; Chu ve ark., 2000; Fritz ve ark., 2003; Katalinić ve ark., 2004; Pourmorad ve ark., 2006). Özellikle lipid peroksidasyonunda gerçekleşen zincirleme reaksiyon teorisine göre enerji emilimi ile aktive edilen lipit molekülü oksijenle birleşerek okside olmakta ve bu şekilde meydana gelen aktiflenmiş peroksit molekülleri, enerjilerini maddenin okside olabilen başka moleküllerine aktararak otoksidasyona devam etmektedir (Halliwell, 1989a). Ancak antioksidanların ortamda varlığı ile antioksidan molekülleri bu enerjiyi kendi üstlerinde tutarak diğer moleküllere nazaran daha kararlı radikaller oluşturmaktadırlar. Böylece antioksidan molekülünün araya girmesiyle otookside olabilen pek çok molekül okside olmaktan kurtulmakta, yani oksidasyonun yavaşlatılmakta ya da kısmen durdurulmaktadır (Sezgin, 2006).

$$R\bullet + AH \rightarrow RH + A\bullet$$

$$RO\bullet + AH \rightarrow ROH + A\bullet$$

$$OH\bullet + AH \rightarrow H_2O + A\bullet$$

$$ROO\bullet + AH \rightarrow ROOH + A\bullet$$

$$A\bullet + O \rightarrow AO$$

Yukarıda reaksiyonları verilen mekanizmada aktif antioksidan molekülünün (A•) enerjisini yağ moleküllerine aktarmak yerine kendisinin inaktif moleküllere okside olduğu görülmektedir (AH: Antioksidan molekülü, A•: Aktif antioksidan molekülü, AO: inaktif antioksidan molekülü). Canlılarda oksitlenmeye karşı iki çeşit savunma sistemi vardır. Bunlar endojen ve ekzojen kaynaklı antioksidan sistemleridir. Bu antioksidan sistemler serbest radikallere dört farklı şekilde etki ederler (Uğuzlar, 2009)

1) Antioksidan molekülleri serbest oksijen radikallerini etkileyerek elektronu üzerinde tutar veya daha zayıf yeni bir moleküle çevirirler. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküllerin etki mekanizması bu şekildedir.

2) Antioksidan molekülleri serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltırlar. Böylece onları inaktif moleküle dönüştürme şeklinde etki yaparlar. Vitaminler ve flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3) Antioksidan molekülleri serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırar ve fonksiyonlarını engelleyici bir başka deyişle "zincir kırıcı etki" yaparlar. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın antioksidan moleküller tarafından onarılması "onarıcı etki" olarak adlandırılır.

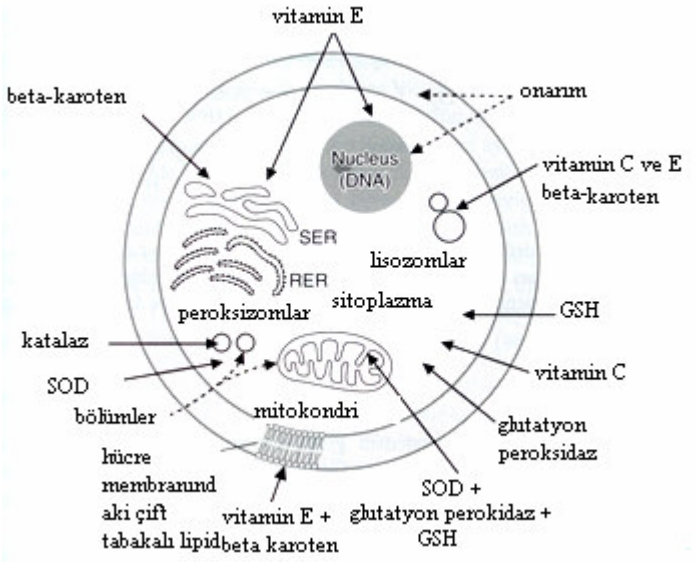
Serbest radikallerin vücutta aşırı miktarda oluşmasının sağlık açısından tehlike arzetmesi nedeniyle antioksidanların üretmi ya da dışarıdan alımı metabolizmanın biyokimyasal işlevlerini sağlıklı bir biçimde görebilmesi ve hastalıklardan korunabilmesi için elzemdir. Özellikle metabolizmada normal olarak radikal üreten ya da tüketen biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi için serbest radikaller vücutta çok hassas bir dengeyle kontrol edilmektedirler. Bu nedenle vücudun serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunması için radikallerin kontrolü iki şekilde yapılır. Endojen kaynaklı savunma sisteminde bulunan bazı enzimler ve proteinler serbest radikallere karşı vücudu çeşitli mekanizmalarla savunurlar. Ekzojen kaynaklı antioksidanlar ise vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi dietle gıdalar yoluyla da alınabilmektedirler. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler, karotenoidler ve polifenollerdir. Bu tür maddelerin dietle alınarak metabolizmada serbest radikallere karşı oluşturduğu savunma mekanizması ekzojen kaynaklı savunma sistemi olarak ifade edilir (Yalçın, 2007; Uğuzlar, 2009). Pekçok araştırmada antioksidan ihtiva eden meyve ve sebze tüketimi ile çeşitli kanser türleri ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır (Halliwel ve Gutteridge, 1989b; Rice-Evans ve ark., 1997).

2.5.1. Serbest radikallere karşı endojen kaynaklı savunma sistemi

Endojen antioksidan sistemleri metabolizmanın ihtiva ettiği bazı biyomoleküllerden oluşur. Bunlar antioksidan enzimler ve hasarlı molekülleri uzaklaştıran enzimler (proteazlar ve fosfolipazlar) ile tamir sistemleri ve metal bağlayıcılar (hemoglobin, miyoglobin, ferritin, seruloplazmin) gibi alt sistemlerdir (Çizelge 2.2). Ayrıca glutatyon ve ürik asit gibi vücut içinde küçük molekül ağırlıklı metabolomlarda antioksidan olarak görev yaparlar (Akyüz, 2007). Bu sistemlerden bazılarının hücre içine girişi gösterilmiş ve aşağıda ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır (Şekil 2.2).

Süperoksit dismutaz: Süperoksit dismutaz süperoksitin daha az reaktif olan hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. İnsanda iki farklı SOD izomeri bulunmaktadır. Bunlardan tetramerik ve mangan ihtiva eden izomer mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) hücre organellerinden mitokondride bulunurken dimerik olan, bakır ve çinko içeren izomer (Cu-Zn SOD) bakır-çinko süper oksit dismutaz enzimi ise sitozolde bulunur. Hücrede en çok bulunan izomer, Cu-Zn SOD'dir (Bachmayer, 2004).

$$2O_2\bullet^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$



Şekil 2.2. Antioksidanların hücredeki etkileri (Engin, 2007)

Doku ve organların normal metabolizması esnasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi nedeniyle yüksek oksijen kullanımı olan dokularda SOD aktivitesi diğer hücrelere nazaran daha fazladır. Böylece SOD ile hücre içi süperoksit düzeyi düşük tutulur. .

Süperoksit dismutazın, süperoksit anyonuna olan etkisi şu şekildedir; süperoksit anyonu Cu^{2+} ve polipeptit yapısında bulunan argininin guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sırasında meydana gelen redoks tepkimesi sonucunda Cu^{2+} süperoksitten bir elektron alarak Cu^+ formuna indirgenir. Böylece süperoksit yükseltgenerek moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir süperoksit anyonu Cu^+

formundan bir elektron ve SOD'den iki proton alarak hidrojen peroksiti oluştururken enzim tekrar Cu^{2+} formuna döner.

$$SOD\text{-}Cu^{2+} + O_2\bullet^- \rightarrow SOD\text{-}Cu^{+} + O_2$$

$$SOD\text{-}Cu^{+} + O_2\bullet^- + 2H^+ \rightarrow SOD\text{-}Cu^{2+} + H_2O_2$$

SOD fagosite edilmiş bakterilerin hücre içinde etkisiz hale getirilmesinde de rol oynar. Bu yüzden SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir.

Katalaz: Katalaz, metabolizmada normal biyokimyasal yollarla oluşan süperoksidin giderilmesinde rol oynayan enzimlerden biridir. Bir hemoprotein olan katalazın yapsında 4 tane hem grubu ve her alt birime ait bir molekül NADPH bulunmaktadır. Katalaz başlıca peroksizomlar olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde çok miktarda bulunur. Bununla birlikte bu enzim sitokrom sistemi içeren tüm oksijenli solunum yapan hücrelerde mevcuttur. Katalaz, hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalayarak hidrojen peroksitin zararlı etkilerinden hücreyi korur. Özellikle karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde katalaz aktivitesi oldukça yüksektir (Yalçın, 2007).

$$H_2O_2 \xrightarrow{CAT} H_2O + O_2$$

Katalaz iki molekül hidrojen peroksiti hem elektron verici bir substrat hem de elektron alıcısı olarak kullanarak su ve oksijen molekülüne dönüştürür (Akkuş, 1995). Böylece hidrojen peroksite nazaran daha zararlı olan hidroksil radikallerinin oluşumunu önler. Katalaz hidrojen peroksitin yanında metil ve etil hidrojen peroksitler gibi küçük serbest radikalleri de giderir. Ancak büyük moleküllü lipid hidroperoksitlere etki etmez (Jenkins ve Tengi, 1981; Halliwel ve Gutteridge, 1992; Mates ve Sanchez-Jimenez, 1999).

Glutatyon peroksidaz: Glutatyon peroksidaz (GPx), hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumludur. Sitozolde bulunan bu enzim tetramerik bir yapıda olmakla birlikte 4 tane selenyum atomu ihtiva etmektedir. Enzim karaciğer, kalp, akciğer, beyin ve kaslarda farklı aktiviteler göstermektedir.

Glutatyon peroksidazın hidrojen peroksiti giderme mekanizması glutatyonun (GSH) oksidasyonuna dayanır. Böylece glutatyon, okside olarak glutatyon disülfite (GSGS) dönüşür. Bu enzim katalizli reaksiyonda H_2O_2'e detoksifiye edilmiş olur (Halliwel ve Gutteridge, 1992; Mates ve Sanchez-Jimenez, 1999; Bachmayer, 2004).

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPx} GSSG + 2\,H_2O$$

Çizelge 2.2. Serbest radikallere karşı endojen kaynaklı savunma sistemleri

Endojen Antioksidanlar		
Enzim olan endojen antioksidanlar	**Enzim olmayan endojen antioksidanlar**	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Bilirubin	Melatonin
Hidroperoksidaz	Albumin	Sistein
Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)	Seruloplazmin	Myoglobin
Glutatyon S-Transferazlar (GST)	Ürat	Laktoferritin
Katalaz (CAT)	Glutatyon	Ferritin
Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi	Hemoglobin	Transferrin

Özellikle büyük molekül yapılı lipid hidroperoksitlerin giderilmesinde peroksidaz grubundan fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGSH-Px) enzimi görev yapar. Monomerik yapılı bu enzim de tüm glutatyon peroksidazlar gibi selenyum atomu ihtiva etmekte ve sitozolde bulunmaktadır. Hücre membranında oluşan fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger. Böylece PLGSH-Px, hücre membranını lipid peroksidasyonuna karşı serbest radikallerden korur. Hidroperoksitlerin indirgenmesi ile meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüştürülür.

Glutatyon peroksidaz hidrojen peroksidin dışındaki peroksitlerinde etkisini ortadan kaldırarak hücre zarı lipitlerini ve hemoglobini peroksitlerin yükseltgenmelerine karşı koruyabilmektedir.

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{PLGSH\text{-}Px} GSSG + 2\,H_2O$$

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{PLGSH\text{-}Px} GSSG + ROH + H_2O$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

Sülfhidril proteinleri ve diğer serum proteinleri: Yapılarında sülfhidril bulunan albumin, hemoglobin ve ferritin gibi serum proteinleri organik peroksitleri ve hidroksil radikallerini zararsız kimyasallara dönüştürürler. Bu antioksidan yapılı proteinler endojen kaynaklı veya ekzojen kaynaklı olabilirler (Maister, 1988).

Mitokondriyal sitokrom oksidaz: Solunum zincirinde görev yapan mitokondriyal sitokrom oksidaz, süperoksitleri ($O_2\bullet^-$) detoksifiye eder.

$$4O_2\bullet^- + 4H^+\ 4e^- \rightarrow 2H_2O$$

Bu reaksiyon fizyolojik şartlarda meydana gelen sürekli bir reaksiyondur. Bu biyokimyasal reaksiyonla vücuda alınan besin maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve böylece enerji üretimi (ATP) sağlanır. Ancak çoğu zaman süperoksit ($O_2\bullet^-$) üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aşar. Bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin ($O_2\bullet^-$) zararlı etkilerine engel olurlar (Uğuzlar, 2009). Glutatyon, bilirubin, radikal tutucu özelliği ile ürik asit ve albumin bakır iyonlarını bağlayarak metal katalizli reaksiyonları sınırlayan, seruloplazmin, hemoglobin, ferritin birer endojen kaynaklı enzimatik olmayan antioksidanlardır (Akyüz, 2007).

2.5.2. Serbest radikallere karşı ekzojen kaynaklı savunma sistemi

Ekzojen kaynaklı antioksidan sistemleri metabolizmanın ihtiva ettiği bazı biyomoleküllerden çok insan ve hayvan organizmasında sentezlenemeyen ancak bitkiler tarafından ve sekonder metabolitler olarak adlandırılan maddelerdir (Köksal, 2007). Bunlar süperoksit radikali dışındaki diğer bir indirgeyici hücresel ajan olan askorbik asit (C vitamini), zincir kırıcı antioksidan etki gösteren α-tokoferol (E vitamini), radikal toplayıcı etkisi bulunan β-karoten (vitamin A) ve polifenoller gibi

biyomoleküllerdir (Çizelge 2.3). Bu moleküller radikallerin temizlenmesinde ve zincir reaksiyonlarının durdurulmasında etkili birer antioksidandırlar. Ancak etkinliklerini enzimatik olmayan yollarla sürdürürler (Akyüz, 2007).

Ekzojen kaynaklı savunma sistemlerinin en önemli biomolekülü olan askorbik asit indirgeyici bir moleküldür. Fe^{3+}, Fe^{2+} formuna askorbik asit tarafından indirgenebilir. Böylece askorbik asit hücre içinde bazı organik radikalleri indirgeyerek söndürebilir. Bunun yanında bazı enzimlerde kofaktör olarak görev yapar. Askorbik asit, kollajenin biyosentezinde yer alan prolinin hidroksiproline enzimatik hidroksilasyonu gibi hidroksilasyon reaksiyonlarına katılır. Ayrıca, dopamin-β-hidroksilaz aktivitesi için de gereklidir. Bir diğer antioksidan molekül olan α-tokoferol, serbest lipit radikallerini söndürmektedir. Bu esnada kendisi tokoferoksil radikaline dönüşmekte ve tokoferoksil radikali ise askorbik asit tarafından tekrar α-tokoferole dönüştürülmektedir (Köksal, 2007). Diğer bir önemli antioksidan E vitaminidir. E vitamini gıda maddelerinin bozulmasını engelleyen ve uzun ömürlü olmalarında rol oynayan önemli bir doğal antioksidandır. Bir başka ekzojen kaynaklı antioksidan ise β-karotendir. β-karoten de bitkilerde sentezlenir ve α-tokoferol gibi peroksil ve alkoksil radikalleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu engelleyebilir. (Halliwell ve Gutteridge, 1989a).

Fenolik bileşik olmaları nedeniyle yüksek antioksidan aktivite gösteren ve vitaminlerle ve diğer ekzojen kaynaklı antioksidanlarla karşılaştırıldığında ucuz olmalarından dolayı gıda maddelerinin bozulmalarını engellemek için yıllardan beri kullanılan bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), tersiyerbütilhidrokinon (TBHQ) ve propil gallat (PG) diğer bazı sentetik antioksidanlardır (Mavi, 2005). Literatürlerde, yaygın olarak kullanılan bu sentetik antioksidanların bazı yan etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (Branen 1975; Imaida ve ark., 1983). Bu nedenle tüketiciler bunların sağlık açısından güvenirlikleri hakkında ciddi endişeler taşımaktadır (Branen, 1975; Ito ve ark., 1983). Örneğin, BHT'nin karaciğerde sitokrom P–450 sistemine hasar verdiğine dair bazı çalışmalar mevcuttur. Farelere yüksek dozlarda verildiğinde ise karaciğerde hasara sebep olduğu görülmüştür. Bu nedenle son yıllarda yapılan pek çok çalışma ile sentetik antioksidanlara alternatif bitkisel antioksidan kaynakları tanımlanmıştır.

Çizelge 2.3. Serbest radikallere karşı ekzojen kaynaklı savunma sistemleri

Ekzojen Antioksidanlar		
İlaç olarak kullanılan ekzojen antioksidanlar	**Gıdalardaki ekzojen antioksidanlar**	**Vitamin ekzojen antioksidanlar**
Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol)	Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)	α-tokoferol (vitamin E)
NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler)	Butillenmiş hydroksianisol (BHA)	Askorbik asit (vitamin C)
Nonsteroid, antiinflamatuvar ilaçlar (diphenyline iodonium)	Fe-superoksit dismutaz	Folik asit (folat)
Rekombinant süperoksit dismutaz	Propilgallat	β-karoten
Trolox-C (vitamin E analoğu)	Sodyum benzoat	
Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (ebselen ve asetilsistein)	Etoksikuin	
Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)		
Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)		
Nötrofil adezyon inhibitörleri. Sitokinler (TNF ve IL-1). Barbitüratlar, Demir şelatörleri		

2.6. Doğal Antioksidanlar

Doğal antioksidanların en önemlileri fenoller, polifenoller ve bunların türevleridir. Fenolik bileşikler; kimyasal yapıları basit bileşiklerden yüksek polimerleşmiş maddelere kadar çeşitlenebilen bitkisel maddelerdir (Winkel-Shirley, 2001). Bu bileşiklerin pek çoğu bitkilerin ikincil metabolitleri olup bitkilerde bazı enzim katalizli reaksiyonlarla üretilirler. Ancak bu doğal antioksidanların bitkilerdeki varlığı bitkiden bitkiye farklılık göstermektedir. Bitkinin genomik yapısına bağlı olarak sentezlenen enzimler ile doğrudan ilişkili olan antioksidan yapılar genomdaki değişikler nedeniyle yapı ve miktarlarında değişiklik gösterirler. Örneğin, fenil alanin, fenil alanin liyaz (PAL) enzimi tarafından sinnamik aside, sinnamik asit ise bitki metabolizmasında sinnamik asit-4-hidroksilaz (C4H) tarafından

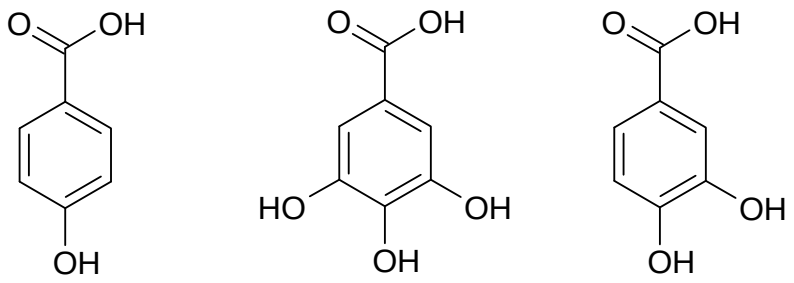
hidroksillenerek *p*-kumarik aside dönüştürülür (Winkel-Shirley, 2001). Tüm bu enzimler antioksidan özellik gösteren ikincil metabolitlerin biyosentezinde yer alırlar. Flavonoid metabolizması olarak adlandırılan bu metabolik yolda daha pek çok enzim yer alır. Bitkilerin genomik yapılarına bağlı olarak bu flavonoid yolun enzimlerinin sentezi bitkiden bitkiye değişir. Buna bağlı olarak bu enzimlerin substratları olan fenolik yapılar varsa bile eğer enzim yoksa bir başka fenolik yapıya dönüşümü gerçekleşemez. Bu nedenle fenolik yapılar da bitkiden bitkiye farklı dağılım gösteririrler. Bu farklılık ise antioksidan aktivite düzeyinde tanımlanabilir (Winkel-Shirley, 2001). Sentezlenen fenolik yapıya bağlı olarak bitkiler oksijen konsantrasyonunu düşürebilir veya singlet oksijeni inaktif hale getirebilirler. Hidroksil radikalleri gibi birincil radikalleri inhibe ederek zincir reaksiyonlarının başlamasını önlerler ya da metal iyon katalizörlerini bağlarlar (Gulcin, 2008).

Antioksidanlar bitkisel bazı gıdalarda doğal olarak bulundukları gibi, gıda sanayisinde ürünlerin kalitesini korumak ve besinsel değerlerini muhafaza etmek amacıyla sonradan eklenirler. Besinlerin acılaşmasını ve çürümesini geciktirici özelliğe sahiptirler. Özellikle yağlarda, havadaki oksijenin sebep olduğu otooksidasyonu yavaşlatmak için kullanılmaktadırlar. Böylece yağların, tadını, kokusunu, rengini yani kalitesini ve raf ömrünü uzatırlar. Antioksidanlar ortamda çok az miktarda bulunsalar bile etkin olan maddelerdir.

Bitkilerde sentezlenen bu doğal antioksidanların çoğu fenolik bileşikler ve bunların oksijenle substitue olmuş halleridir. Doğal antioksidanların temel bileşeni olan basit fenolikler benzen halkasının *orto, para* ya da *meta* konumlarına hidroksil grubunun bağlanması ile oluşmaktadırlar. Basit fenolik maddeler bu konumlardaki substitue gruplara bağlı olarak çeşitlilik gösterirler (Andersen ve Markham, 2006). Basit fenolik yapıların dışındaki polifenolikler ise fenolik yapıların polimerleşmesi sonucu oluşurlar. Harborne ve Simmonds, 1964'te moleküldeki karbon sayılarına bağlı olarak bu bileşikleri sınıflandırmıştır (Andersen ve Markham, 2006) (Çizelge 2.4).

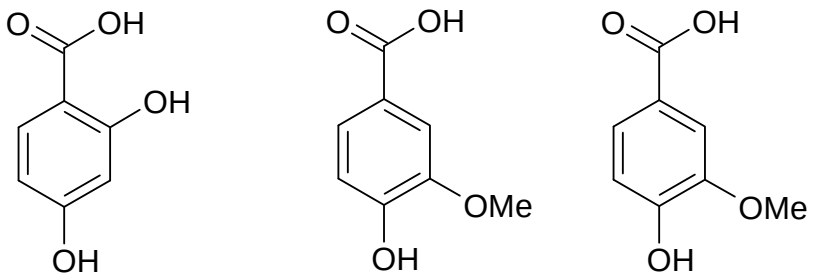
Çizelge 2.4. Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

Yapı	Sınıf
C_6	Basit fenolikler
C_6-C_1	Fenolik asitler ve türevleri
C_6-C_2	Asetofenonlar ve fenilasetikasitler
C_6-C_3	Sinnamik asit, sinnamik aldehit ve Sinnamil alkoller
C_6-C_3	Kumarinler, izokumariler ve kromonlar
	Kalşonlar, auronlar, hidrokalşonlar
	Flavanlar
	Flavonlar
C_{15}	Flavononlar
	Flavonoller
	Antosiyanidinler
	Antosiyaninler
C_{30}	Biflavoniller
C_6-C_1-C_6 , C_6-C_2-C_6	Benzofenonlar, ksantonlar, stilbenler
C_6, C_{10}, C_{14}	Kininler
C_{18}	Betasiyaninler
Lignanlar, neolignanlar	Dimerler ya da oligomerler
Ligninler	Polimerler
Tanninler	Oligomerler ya da polimerler
Filobafenler	Polimerler



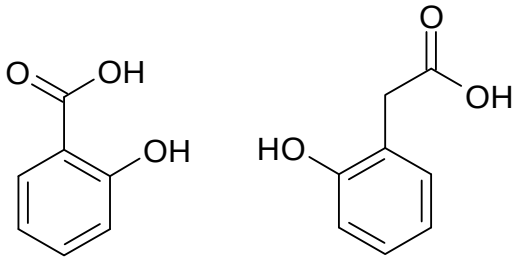
(a) **(b)** **(c)**

Şekil 2.3 (a) p-hidroksibenzoik asit, **(b)** gallik asit, **(c)** protokateşik asitin molekül yapıları



(d) **(e)** **(f)**

Şekil 2.3 (d) salisilik asit, **(e)** vanilik asit, **(f)** vanilinin molekül yapıları



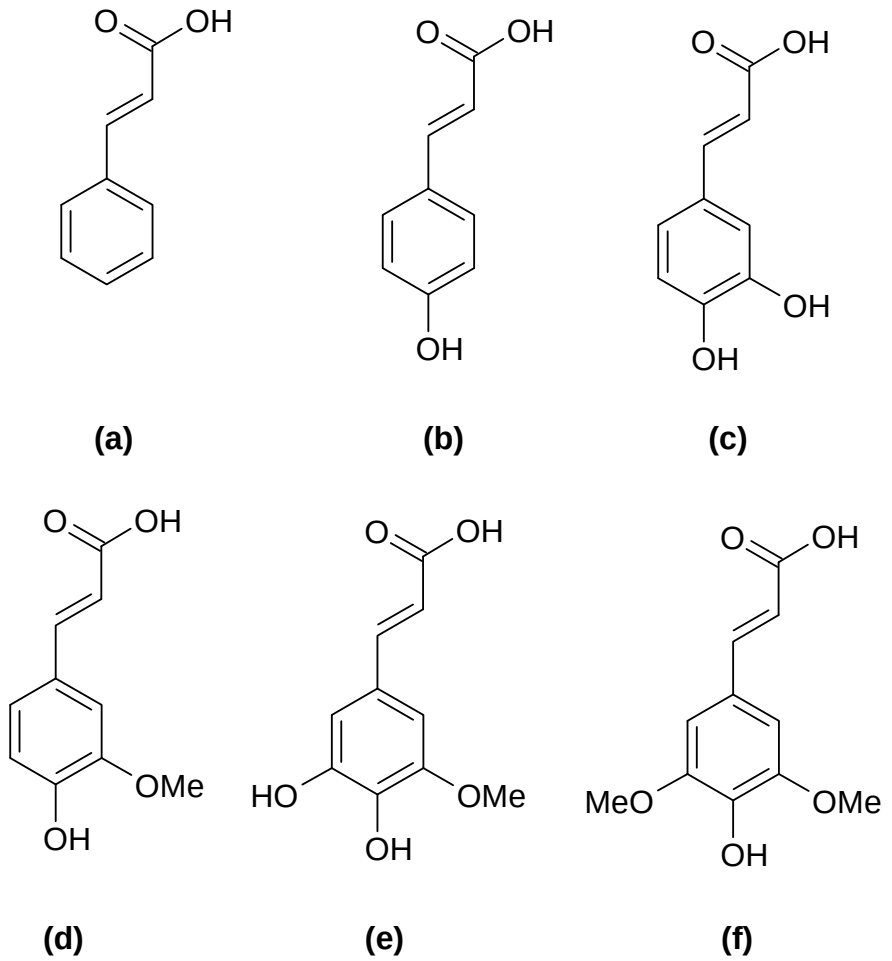
(a) **(b)**

Şekil 2.4 (a) 2-hidroksiasetofenon **(b)** 2-hidroksifenilasetik asitin molekül yapıları

Bitkilerde bulunan en basit fenolik yapılı bileşikler fenolik asitlerdir. Bir fenole bir karboksilik asit grubunun bağlanmasıyla oluşan yapılara örnek olarak p-hidroksibenzoik asit (Şekil 2.3.a), gallik asit (Şekil 2.3.b), protokateşik asit (Şekil 2.3.c), salisilik asit (Şekil 2.3.d) ve vanilik asit (Şekil 2.3.e) gibi bileşikler verilebilir. Bununla birlikte vanilin (Şekil 2.3.f) gibi fenol halkasının üzerinde karboksil grubu yerine aldehit taşıyan hidroksibenzoik asit aldehitler de mevcuttur (Andersen ve Markham, 2006).

. Fenonlar, C_6-C_2 bileşikleridir. Doğada nadiren bulunan 2-hidroksiasetofenon (Şekil 2.4.a) ve 2-hidroksifenilasetik asit (Şekil 2.4.b) gibi bileşikler fenon bileşiklerine örnek olarak verilebilir. C_6-C_3 iskeletinde altı farklı molekül bulunur. Bu yapılardan en az üçü tüm bitkilerde bulunur. Bunlar sinnamik asit (Şekil 2.5.a), *p*-kumarik asit (Şekil 2.5.b), kaffeik asit (Şekil 2.5.c), ferulik asit (Şekil 2.5.d), 5-hidroksiferulik asit (2.5.e) ve sinapik asittir (Şekil 2.5.f). Sinnamik asidin esterleri

şeker esterleri olarakta bulunur. Örneğin, sinapoli esterlerden Brassicaceae ailesindeki UV ışığı absorplayan sinapoli malat, yapraklarda ve sinapoli kolin ise köklerde bulunur (Ruegger ve Chapple, 2001). Flavonoidler, bitkilerde doğal yollardan oluşan fenolik yapılardan 15 karbonlu olanlardır. Doğal olarak bitkilerin gövde, tohum, yaprak, kabuk, çiçek ve köklerinin epidermal hücrelerinde glikozidik (glikozitler) ya da glikozit olmayan (aglikan) formda bulunurlar (Andersen ve Markham, 2006).

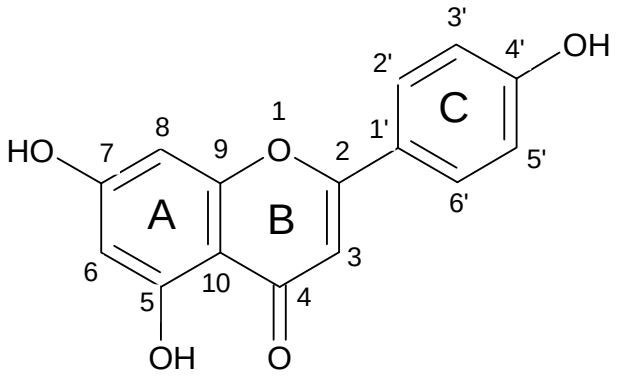


Şekil 2.5 (a) sinnamik asit **(b)** *p*-koumarik asit, **(c)** kafeik asit, **(d)** ferulik asit, **(e)** 5-hidroksiferulik asit, **(f)** sinapik asitin molekül yapıları

Flavonoidler, C_6-C_3-C_6 temel yapısında iki aromatik halka ve üçüncü bir aromatik halka ya da alifatik gruptan oluşur. Bu halka ya da alifatik grupların her biri bir numaralandırma sistemiyle numaralandırılarak A, B ve C olarak adlandırılır. Bu karbon atomlarının A ve C halkaları için normal rakamlar kullanılırken, B halkası

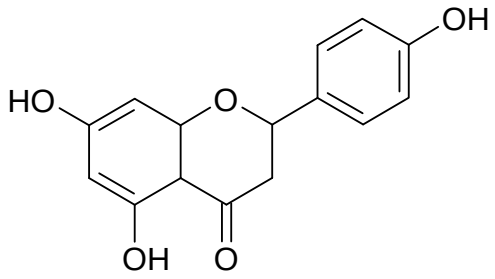
için “üslü” rakamlar kullanılır. A halkası üç tane malonil-CoA molekülünden B halkası ise *p*-kumaril-CoA’dan oluşmaktadır. Pek çok flavonoidin A halkası hem *meta*-dihidroksi hem de *meta*-trihidroksiden oluşmaktadır. Flavonoidlerde A halkasının *meta*-hidroksil gruplarından biri 6 halkalı heterosiklik yapıya oksijeni katar. Bu yapılar piran, pirilyum ya da piron halkalarıdır. B halkası ise mono-hidroksi, *orto*-dihidroksi, ya da *vic*-trihidroksidir. B halkasında sustituent olarak metileterler bulunur (Andersen ve Markham, 2006). İki fenil halkanın difenilpropan zinciri ile birleşmesi sonucu oluşan flavonoidlerin fenil halkalarının propan zincirine farklı pozisyonlardan bağlanması nedeniyle flavonoidler alt sınıflara ayrılır (Rice-Evans ve ark., 1997).

Çiçeklerde bulunan sarı pigmentler butein ve benzeri **kalşonlardır**. Ploridzin (piloretin-2′-O-D-glukosit) kırmızı elmanın yapraklarında bulunan bir dihidrokalşondur ve antitümor aktivite gösterdiği bilinmektedir (Nelson ve Falk, 1993). **Auronlar,** *meta*-hidroksi gruplarının α-karbon ile reaksiyonu sonucu meydana gelen yapılardır. Genel olarak kalşonların halkalaşması sonucu oluşurlar. Auronlar da çiçeklerde bulunan sarı pigmentlerdir. **Flavanonlar,** yapılarında bir keton grubu içerirken doymamış bir karbon-karbon bağı ihtiva etmezler. Temel flavanon iskeletinin keton grubunu alması, onu bir "-on" yapmaktadır. A ve B halkalarının substitue olması ile naringenin oluşturarak flavonların analoglarını oluştururlar (Şekil 2.6 ve 2.7). Çoğu flavanon turunçgillerde glikosit olarak; örneğin, hesperitin (aglikon) ve hesperidin (glikozit) olarak naringeninle birlikte bulunurlar (Halliwel ve Gutteridge, 1990; Hudson, 1990; Andersen ve Markham, 2006).

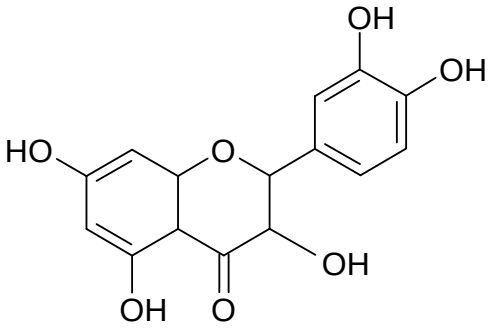


Şekil 2.6. Flavononun molekül yapısı

Flavanoller, genel olarak dihidroflavonoller olarak bilinirler ve çoğunlukla taninlerle birlikte bulunurlar. Önemli bir flavonol olan taksifolin, dihidrokuersitin olarak bilinir (Şekil 2.8). **Flavonlar,** doymamış bir karbon-karbon bağı ve bir keton grubu ihtiva eder. Doğada en çok bulunan flavonlar kaempferol (5,7,4′ hidroksiflavon), kuersetin (5,7,3′,4′ hidroksiflavon), ve mirisetin (5,7,3′,4′,5′ hidroksiflavon)'dir. Çoğu, tıbbi bitkide ve pek çok sebze ve meyvede yaygın olarak bulunur. Diğer bir flavon ise kırmızı biberde bulunan luteolindir. **Biflavoniller,** C_{30} iskeletine sahiptirler. Apigenin ya da metilenmiş türevleri flavonların dimerleridirler. Bu gruba ait yalnızca birkaç bileşik vardır. Bunlardan en önemlisi *Ginkgo biloba'*da bulunan ginkgetindir..



Şekil 2.7. Naringeninin molekül yapısı



Şekil 2.8 Dihidrokuersitinin molekül yapısı

Antosiyanidin ve Antosiyaninler, flavan çekirdeğine çok benzerler. Bir farkı; üzerindeki oksijenin pozitif yüklü olması ve karbon halkasında ikili bağın olmasıdır. –OH gruplarının, şeker gruplarının ve diğer fonksiyonel grupların sayısına ve pozisyonlarının değiskenliğine göre çok farklı türde antosiyanidin ve antosiyanin vardır. Bunların bazılarına başka flavonoid moleküllerinin de bağlı olması nedeniyle

oldukça komplike yapıya sahiptirler. **Proantosiyanidinler,** önemli antioksidanlardan olup bu grup flavanoller olarak bilinen antosiyanidin polimerleridir. Asitle parçalandığında proantosiyanidinler, siyanidin gibi antosiyanidinler verirler.

3. GENETİK MARKIR

Moleküler markır (belirteç) ile genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili biyolojik etkisi olmayan ve sonraki nesillere aktarılan DNA parçası temsil edilmektedir (Bovenhuis ve Meuwissen, 1996). Moleküler markır yöntemleri DNA molekülündeki polimorfik bölgelerin saptanması prensibine dayanır. Moleküler markırlar görünür özelliklere dayanan morfolojik markırlardan ve genlerin ürünü olan proteinlere dayanan biyokimyasal markırlardan farklı olarak DNA düzeyindeki analizlerle saptandıklarından dolayı DNA markırları olarak bilinirler. DNA markırları aynı veya farklı türlere ait bireyler arasındaki farklılıkları ortaya koyabilirler ancak (polimorfik DNA markır) genotipler arasındaki farklılıkları ayırt edemeyebilirler (monomorfik DNA markır).

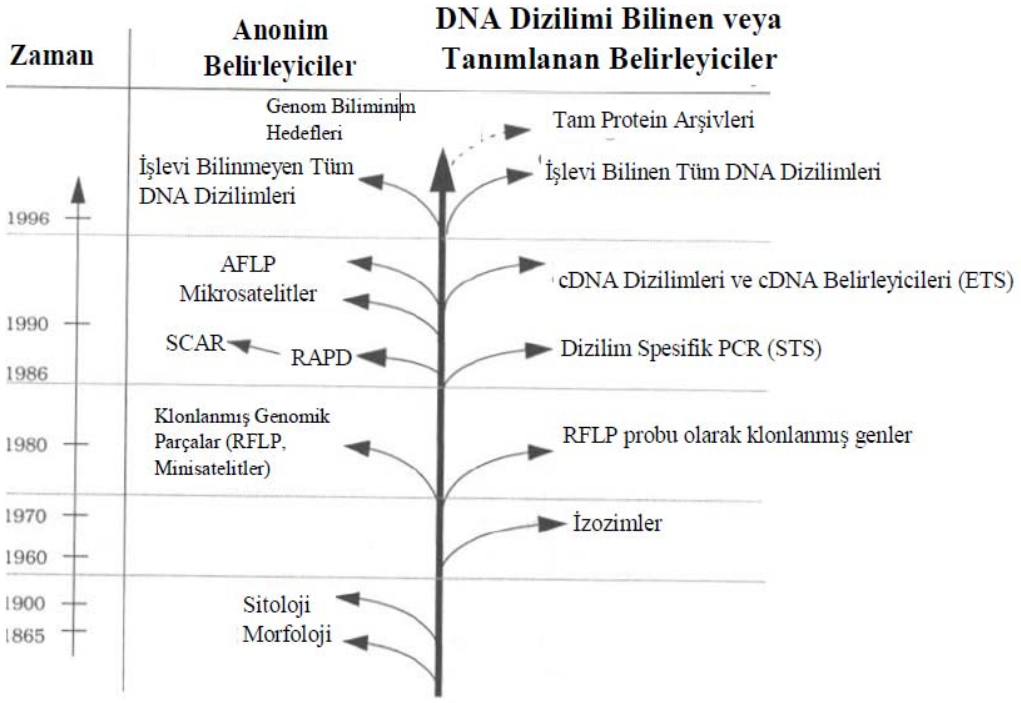
Bu markırlar DNA molekülündeki polimorfik bölgelerin çoğaltımındaki farklılığı saptamak amacıyla çeşitli tipteki primerlerin ve PCR yönteminin kullanımına dayanır. Ancak nükleik aside dayalı genetik markırların belirlenebilmesi için öncelikle markır olarak kullanılacak biyolojik materyalin hücreden saflaştırılması gerekmektedir. Saflaştırılan DNA, protein ya da enzim daha sonraki aşamalarda amaca göre çeşitli yöntemler uygulanarak analiz edilir. Böylece nesilden nesile aktarılan genlerin mutasyon, modifikasyon ya da doğal seleksiyon nedeniyle zaman içerisinde uğradığı değişikliklerin yol açtığı tür ayrımlarının ve filogenetik akrabalıklarının tanımlanarak türlerin taksonomik olarak sınıflandırılması ile soyağacı analizleri ve bağlantı haritalarının tanımlanması yapılabilir. Çünkü kromozom üzerinde yer gösteren küçük bir DNA parçası, gen veya genin bir parçası ya da genler arasındaki bir DNA dizilimi bir tür içerisindeki bireyler arasında farklılık gösterir. Bu farklılık yalnızca genom düzeyinde kalmaz. Transkripsiyon ve translasyon mekanizmalarında meydana gelen değişikliklerle RNA ve protein ekspresyonlarında değişikliklere dolayısıyla morfolojik karakterlerde değişikliklere neden olur. Bu nedenle protein, enzim ya da morfolojik özellikler de genetik markırlar olarak ifade edilir. 1900 yılının başlarında geliştirilmeye başlanan moleküler markırlar (Welsh ve McClelland, 1990; Williams ve ark., 1990) polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) geliştirilmesinden sonra büyük bir ivme kazanmıştır (Şekil 3.1).

Ökaryot canlılarda genom tarafından ifade edilen karakterlerin analizi DNA bantlarının ortaya konulması ile gerçekleştirilir. Bu bantlar her bireyin kendine özgü DNA parmak izi olarak ifade edilir. Parmak izindeki bu farklılık her hangi bir karakter için farklı sayı ve büyüklükte DNA bantları meydana getirir. DNA parmak izi ya da DNA profillerinin elde edilmesi canlı materyalden DNA izolasyonu ile başlar. Canlıdan izole edilen DNA kullanılacak yönteme bağlı olarak PCR ile çoğaltılır. PCR ile elde edilen farklı büyüklük ve sayıdaki çoğaltılmış DNA fragmentleri meydana gelir. Bu bantlar her bireyin kendine özgü DNA parmak izi olarak ifade edilir. Parmak izindeki bu farklılığı her hangi bir karakter için farklı sayı ve büyüklükteki DNA bantları meydana getirir. Elde edilen farklı büyüklük ve sayıdaki çoğaltılmış DNA fragmentleri bireyler arasındaki polimorfizmi gösterir. Bazı bantlar bazı bireylerde ortak iken (homolog) ortak olmayan bantlar bireyler arasındaki polimorfizmi ifade eder. Elde edilen bant profillerinin istatistik programlarla analizlenmesi ile bireyler arasındaki benzerlik ilişkileri tanımlanarak filogeni haritaları oluşturulur. Bir tür içindeki genotipler arasında var olan çeşitlilik (varyasyon) genom analizleri için temel oluşturmaktadır. Genetik bir belirleyici olabilmek için belirleyici lokusunun bir test populasyonunun bireyleri arasında deneysel olarak tespit edilebilir çeşitlilik göstermesi gerekmektedir. Çeşitlilik, basit olarak kalıtılabilir bir fenotipten, tek bir nükleotid değişiminin tespitine kadar uzanabilen farklı biyolojik düzeylerde incelenebilir. Çeşitlilik tanımlandığında ve test populasyonunu oluşturan bütün genotipler bilindiğinde, lokuslar arasındaki rekombinasyon olaylarının sıklığı belirleyiciler arasındaki bağlantıyı belirlemede kullanılabilir (Liu, 1998; Yalım, 2005; Solmaz, 2010).

Genetik markırlar günümüzde pek çok alanda kullanılmaktadır. Forensik çalışmalarında çok az miktarda kan, kıl, saç, semen ve deri döküntüsü gibi biyolojik materyallerden DNA izolasyonu ile elde edilen DNA'nın genetik markırlarla hangi bireye ait olduğunun tanımlanması ve buna bağlı olarak kriminolojide pek çok suçun çözümlenmesinde, suçluların teşhisi ile annelik ve babalık tayininde tüm dünyada yaygın olarak kullanılır. Forensik çalışmalar kapsamında fosil kemiklerden izole edilen DNA'ya genetik markırların uygulanması geçmiş medeniyetlerin akrabalık ilişkileri beslenme alışkanlıkları, taşıdıkları hastalık riskleri, yaşam koşullarının tanımlanmasında kullanılmaktadır.

Moleküler markırların tıp alanında kullanımı oldukça yaygındır. Özellikle hastalık durumunda tüm kanser türlerinin, diabet ve talasemi gibi hastalıkların teşhisinde ya da hastalık meydana gelmeden önce hastalık risklerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Ayrıca bakteri ve virüslerin sebep olduğu hastalıkların patolojik düzeyde teşhisine de katkıda bulunur.

Genetik markırların özellikle mikrobiyolojik alanda kullanımı moleküler biyolojinin gelişimine temel teşkil etmiştir. Böylece yararlı bakterilerin endüstriye kazanımı ile birlikte biyoteknoloji alanında gelişmeler hızlanmıştır. Bakterilerin tanımlanmasına benzer şekilde dünyamızda hızla yayılan virüslerin tanımlanması da moleküler markırlar sayesindedir. Tanımlanan bu virüslere karşı mücadelede aşı üretimi gibi pek çok alanda yine moleküler markırlar kullanılmaktadır.



Şekil 3.1. Moleküler markırların yıllara bağlı olarak gelişimi (Bay, 2009)

Bitki biyoteknolojisindeki hızlı gelişmeler moleküler markırlarla doğru orantılıdır. Tohum ıslahçılarının birim alanda yüksek kalite ve verimde ürünler vermesi için çok uzun zaman alan tarla denemelerine ihtiyaç duymaksızın ekecekleri tohumu önceden belirlemelerinde moleküler markırlar kullanılır. Moleküler biyolojideki gelişmelerin tarımsal performansı artırmada kullanılması nüfusun

Morfolojik markırlar yardımıyla seleksiyon gibi geleneksel yöntemlerde markırların azlığı ve çevre koşullarının değişkenliği gibi sorunlarla karşılaşılmaktadır (Winter ve Kahl, 1995; Collard ve ark., 2005). Özellikle melezlemeye dayalı tohum ıslahı çalışmalarında geleneksel yöntemlerde kullanılan morfolojik markırlara bağlı olarak seçilen tohumların melezlenip istenilen ürünün elde edilmesi uzun zaman almaktadır. Markırlar yardımı ile seleksiyonda başarı sağlamak için öncelikle genoma bağlı morfolojik özeliklerin belirlenmesi gerekmektedir. Hedef genle markır arasındaki ilişki Bulk Segregant Analizi (BSA) olarak tanımlanır. Son yıllarda kantitatif trait lokus (QTL) olarak adlandırılan yöntemle tanımlanan gene bağlı morfolojik özelliklerin ve DNA markırlarının bir arada kullanımı markır yardımıyla seleksiyonda (maker assisted selection, MAS), bitki ıslahı ve gen kaynaklarının korunmasında oldukça yaygın hale gelmiştir (Quarrie, 1999; Collard ve ark., 2005).

Morfolojik markırlara ek olarak bitkilerin kimyasal yapıları da genomun ifade ettiği fenotipik karakterlerdendir. Çünkü protein, yağ ve karbonhidrat dışında bitkilerin temel yapılarından olan ve ikincil metabolitler olarak tanımlanan fenolik yapılı bileşiklerin oluşumunu katalizleyen enzimler de genomun ifade edilmesi sırasında eksprese edilen genler vasıtasıyla sentezlenirler (Reddy ve ark., 2007). Bir bitkide eksprese edilen gen bir diğerinde genomuna bağlı olarak eksprese edilmeyebilir. Dolayısıyla bitkide fenolik bileşiklerin sentez mekanizmasında rol alan bir enzimin sentezlenmesi bazı fenolik bileşiklerin sentezlenmesini sağlar. Literatürlerde şimdiye kadar bitkilerde 6500'den fazla fenolik yapı tanımlanmıştır (McKay ve Blumberg, 2002). Bununla birlikte, iklim değişikliği, bitkinin ekim şartları ve çevresel koşullar gibi birçok faktör ekspere edilen enzim ve proteinlerin miktarlarında değişikliklere, böylece dolaylı yoldan bitkide sentezlenen fenolik yapıların miktarlarında değişikliklere neden olur (Maltas ve ark., 2011).

3.2. Biyokimyasal Markırlar

Biyokimyasal markırları oluşturan iki temel biyolojik molekül doğrudan gen ürünleri olan protein ve enzimlerdir. Biyokimyasal markırlar sınıfına giren depo proteinleri (tohum proteinleri), izoenzimler ve alloenzimler gibi protein yapıları 1960'lardan beri kullanılmaktadır. Morfolojik karakterlerin çevreden etkilenmelerini ortadan kaldırmak için geliştirilen protein markırları doğrudan gen ürünleri oldukları

için önemli üstünlüklere sahiptirler. Transkripsiyonla DNA'dan direk olarak üretilen RNA türleri translasyonla DNA'dan aldığı şifreyi proteine dönüştürür (Tüzün, 2002). Ancak enzim ve protein markırları gen ürünü oldukları için DNA markırlarına göre sayıca azdır. Bununla birlikte dokulara ve gelişme dönemlerine göre değişkenlik göstermelerinden dolayı kullanımları sınırlıdır. Bu nedenle bitki türlerinde bugüne kadar yeterince biyokimyasal markır üretilememiştir. Teorik olarak DNA markırları genomun tümünü kaplamaktadır. Bir başka deyişle, genom üzerinde kodlama yapan ya da yapmayan, tek kopya veya DNA dizi tekrarlarının da bulunduğu bölgelerin hepsinde DNA polimorfizmi meydana gelebilir. Oysa enzimi kodlayan genler genom boyunca rasgele dağılım göstermemektedirler. Özellikle transkripsiyon esnasında meydana gelen "splicing mekanizması" ile protein kodlayan gen üzerinde bazı bölgelerde bir ya da birden fazla nükleotid çiftinin çıkarılması (delesyon) ya da araya sokulması (insersiyon) söz konusu olduğundan direk olarak genom dizlimine bağlı değildir. Diğer bir ifadeyle, alloenzim markırları genel olarak genlerin kodlama yapan dizilerindeki farklılıklarla ve fonksiyonel enzim gruplarıyla sınırlıdır. Bu nedenle tüm genomu kaplamazlar. Ayrıca translasyon sonrası oluşan polipeptit zinciri glikozilasyon, fosforilasyon ve metillenme gibi bazı post translasyonel modifikasyonlara uğrayarak protein yapıları çeşitli değişikliklere uğrar. Sonuç olarak biyokimyasal markırlarda çeşitli varyasyonlar meydana gelir. Bununla birlikte bu teknik moleküler markırlar içerisinde en hızlı, tekrarlanabilirliği yüksek, en kolay ve güvenilir olanıdır. Ancak bu markırların kullanımı çalışılan populasyonun yapısına bağlıdır. İzoenzimler türler arası ya da nispeten tür olarak birbirine uzak bitkilerin varyasyonlarını çalışmada kullanılabilirken tür içi akrabalıkları tanımlamada yetersizdir.

Enzim markırları kendi içinde alloenzim ve izoenzim (izozim) olarak iki alt grupta altında incelenmektedir. Alloenzim, birbirinden ayırt edilebilen allelleri bulunan enzimleri ifade etmektedir (Collard ve ark., 2005). Alloenzimler aynı genin farklı allelleri tarafından meydana getirilmektedir. Alloenzim veya izoenzimlerin birbirinden ayırt edilmeleri için de elektroforez tekniği kullanılmaktadır. Bir jel içerisine yüklenip elektrik akımı uygulandığında proteinler yük ve kütlelerinin oranına göre hareket ederler. Daha sonra ilgili proteine ait seçici boyama teknikleri kullanılarak proteinin jel içinde pozisyonu belirlenir. Bu pozisyona göre farklı alleller tanımlanır (Yıldırım ve Kandemir, 2001; Liu ve ark., 2002). Enzim markırları

analizlerinin çabuk, ucuz ve güvenilir olması dışında çevreden ve diğer lokuslardan etkilenmemeleri, kodominant markırlar ve morfolojik markırlardan sayıca fazla olmaları kullanılabilirliklerini artırır. Ancak üzerinde çalışılacak gen sayısının azlığı ve varyasyon oranının düşük oluşu bu tekniğin kullanımını sınırlar (Staub ve ark., 1982; Meglic ve Staub, 1996; Akashi ve ark., 2002).

3.3. DNA Markırları

DNA markırları farklı genotiplere ait DNA nükleik asit diziliş farklılığını çeşitli şekillerde ortaya koyan markırlardır. DNA markırları, genel olarak sayılarının çok olmasından dolayı en yaygın kullanılan markır tipidir. Bu markırlar, DNA'da oluşan nokta mutasyonları, insersiyonlar, delesyonlar veya tekrarlanan DNA'nın replikasyonunda oluşan hatalardan meydana gelmektedirler (Paterson, 1996; Bay, 2009). Morfolojik ve biyokimyasal markırların tersine, DNA markırlarının sayısının fazla olması ve çevresel faktörlerden etkilenmemeleri nedeniyle daha yaygın olarak kullanılırlar (Collard et al, 2005). Bunlar:

a) Hibridizasyona dayalı markırlar (DNA melezleme markırları)

b) Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR) kullanımına dayalı DNA çoğaltım markırları (PCR tabanlı markırlar): RAPD, AFLP, SSR, ISSR markırları dışında PCR tabanlı başka markırlar da bulunmaktadır. Bu çalışmada kullanılan PCR tabanlı RAPD markırı ile ilgili detaylı bilgiler aşağıda verilmiştir.

3.3.1. Hibridizasyona dayalı markırlar

Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm (RFLP) yöntemi DNA markırları içerisinde kullanılan ilk markırdır. 1978'de Hamilton Smith ve Daniel Nathans, bakterilerden saflaştırdıkları restriksiyon enzimleriyle RFLP yönteminin temellerini atmışlardır (Cooper ve Hausman, 2006; Yeşbek, 2007). Bu enzimler DNA'yı 4-8 bazlık bir bölgenin dizilimine bağlı olarak keserler. Ancak DNA diziliminde meydana gelen nokta mutasyonu, delesyon ve insersiyon gibi değişiklikler sonucu ilgili restriksiyon enzimi daha önce kesim yaptığı bölgeyi tanıyamaz ya da kesilen parçanın uzunluğu değiştiğinden bireyler arasında farklılık gösterir. Bu nedenle bu

yöntem "restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi" adını almıştır (Tanskley ve ark., 1989). Genom boyunca özel bir DNA bölgesine ait dizideki nükleotid değişiklikleri tek bir nükleotid çiftinde değişiklik (tek nokta mutasyonu) veya bir ya da birden fazla nükleotid çiftinin çıkarılması (delesyon) ya da araya sokulması (insersiyon) şeklinde meydana gelir. Sonuç olarak bu mutasyonlar bir kesim noktasını ortadan kaldırabilir ya da yeni bir kesim noktası meydana getirebilir. Bu şekilde ortaya çıkan polimorfizm DNA'nın DNA'nın restriksiyon enzimleri tarafından kesilmesiyle elde edilen farklı uzunluktaki fragmentler jel görüntüsü ile tespit edilir. Bununla birlikte, oluşan fragmentler bir membrana aktarılarak çeşitli radyoizotoplarla işaretlenmiş tamamlayıcı nükleik asit parçalarıyla (prob) muamale edilir. Bu işleme blotlama adı verilir. Membranın görüntüleme sisteminde elde edilen görüntüleri değerlendirilerek fragmentlerin dizilimleri belirlenebilir. Böylece RFLP yöntemi ile DNA üzerinde tek bir nükleotitte meydana gelen değişiklik ya da mutasyonlar belirlenebilirken gerek insan gerekse pek çok bitki genomunun DNA profilleri ya da bağlantı haritaları da çıkarılabilmektedir (Dirlewanger ve ark., 1998; Klug ve Cummings, 2000).

RFLP tekniği radyoaktivite kullanılması, pahalı olması, uzmanlık gerektirmesi ve yüksek kalitede DNA'ya ihtiyaç duyması (10-20 μM) gibi bazı dezavantajlara sahip olmasına rağmen kullanım tekniğinin alanı oldukça geniştir (Andersen ve Fairbanks, 1990; Altun, 2006). Bu teknik özellikle rekombinant DNA teknolojilerinin gelişmesine öncülük etmiştir (Cooper ve Hauseman, 2006). Restriksiyon enzimleri tarafından DNA'nın belirli bölegelerinin kesilmesi ile kesilmiş bölgelerde oluşan yapışkan uçlara yeni DNA fragmentlerinin eklenmesi pek çok araştırmacı ve üreticiye kolaylık sağlamıştır. Son yıllarda RFLP tekniği yaygın olarak canlının genomuna bağlı olarak hücrede meydana gelen pek çok moleküler ve biyokimyasal mekanizmanın açıklanmasında özellikle hastalıkların teşhis ve tanısında kullanılmaktadır. Bununla birlikte endüstride de uygulama alanı bulan teknik, yeni gen ürünlerinin oluşturulması ve bir bitkiye istenilen özelliğin kazandırılması amacıyla pek çok genetik modifiye organizmanın ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu yöntemle yine ticari olarak satılan pek çok aşı, monoklonal antikor ve insülin gibi proteinlerin sentezleyen gen bölgelerinin çeşitli resktriksiyon enzimleriyle kesilerek bakterilere aktarılarak bu bakterilere sentezlettirilmesi ve bu proteinlerin daha ekonomik ve hızlı bir şekilde üretilmesini sağlanmıştır.

Rekombinant DNA teknolojisi olarak adlandırılan bu teknoloji son yıllarda bilimsel çalışmaların yanında endüstride de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Özellikle canlı popülasyonlarının tanımlanmasında türler, cinsler hatta familyalar arasında gen transferi mümkün olduğu için bir bitki türünde RFLP markırı birkez haritalanırsa akraba olan birçok bitki sistemi için o haritalama bölgesinde potansiyel bir markır bulunuyor demektir. Bu yöntemin uygulaması pek çok tahıl ürününde rutin hale gelmiş durumdadır. Güvenilir bir yöntem olduğu için farklı laboratuvarlarda farklı araştırmacılar tarafından aynı sonuçlara ulaşılabilmektedir. RFLP markırları kodominant özellikte oldukları için heterozigotların belirlenmesinde ve karakterizasyonlarında kullanılmaktadır. Ancak orta düzeyde polimorfizim göstermektedirler (Cooper ve Hausman, 2006).

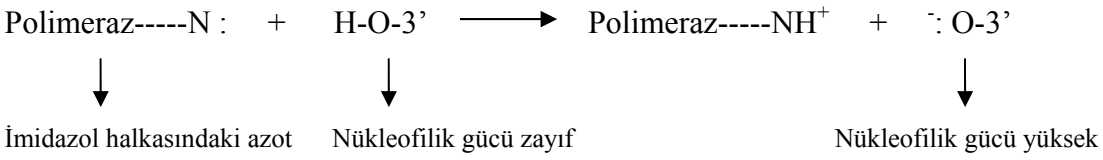
3.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı markırlar

Polimeraz zincir reaksiyonu hücrede doğal DNA sentez mekanizmasının temel elementelerini kullanarak DNA'yı laboratuvar şartlarında bir test tüpünün içerisinde kopyalar. Bu nedenle PCR "DNA fotokopicisi" olarak da tabir edilir. Canlı bir hücrede genomun tamamının kopyalanmasına replikasyon adı verilir. Hücrede replikasyonun meydana gelmesi için çok sayıda farklı proteinden oluşan komplike bir sistem gerekmektedir.

Replikasyonda DNA'nın kendisinden yeni bir çift zincirli DNA oluşturması sırasında tek bir zincirine komplementer olarak adenine karşılık timin ve guanine karşılık daima sitozin çiftleşir. Ancak bu çiftleşmenin meydana gelmesi için ökaryotlarda öncelikle çift bağlı DNA molekülünün Topoizomeraz enzimleri tarafından açılıp bir çift tek zincir haline gelmesi gerekmektedir. Bununla birlikte bu açılma esnasında tekrar birleşmeyi önlemek için birkaç protein tek bir DNA zincirine bağlanarak DNA zincirlerini stabil hale getirir. Bu amaçla Helikaz proteini DNA çift zincirini A-T (çift bağ) ve G-C (üçlü bağ) arasındaki H bağlarını ATP'den enerji alarak kırar ve çift zinciri aralar. SSB (Single Strand Binding) proteinleri ise tek DNA zincirine bağlanarak zincire kararlılık kazandırır ve diğer zincirle birleşmesini önler. Bundan sonra açılan DNA zincirinin çeşitli bölgelerine komplementer RNA polimeraz enzimi tarafından sentezlenen 10-15 nükleotidlik DNA destek polimeri bağlanır. Ardından replikasyon mekanizmasında DNA zincirin uzaması aşaması başlar. DNA'nın biyosentezinde rol alan DNA Polimeraz III enzimi destek

polimerinin bağlandığı yerden itibaren kalıp DNA zincirine komplementer olarak nükleotidleri 5'-3' yönünde fosfodiester bağlarıyla birbirlerine bağlamaya başlar. Diğer destek polimerinin bağlandığı bölgeye geldiğinde ise sentez durarak DNA Polimeraz III enzimi görevini Ligaz enzimine bırakır. Ancak bundan önce sentezi başlatan ve urasil nükleotidi içiren destek polimerleri DNA Polimeraz I enziminin ekzonükleaz aktivitesiyle nükleotidlerin tek tek sökülmesi ile uzaklaştırılır. Yerine tekrar komplementer DNA nükleotidleri takılır. Son aşamada ise okazaki birimleri arasındaki çentikler ökaryotlarda ATP eşliğinde Ligaz enzimi tarafından kapatılır. Oluşan yeni DNA zincirlerinden DNA semikonservatif olarak çoğalmaya devam eder (Tüzün, 2002; Klug ve Cummings, 2000; Cooper ve Hausman, 2006).

DNA Polimeraz III'ün imidazol halkasındaki azot, zincirin ucundaki nükleotidin 3'-OH ucundan H^+ iyonunu koparark nükleotidin nükleofilik gücünü diğer bir serbest nükleotidin fosfat ucuna bağlanması için artırır. Ancak zincirin ucundaki nükleotidin nükleofilik gücünün artması serbest bir nükleotid ile fosfodiester bağını oluşturması için yeterli değildir. Bu ekzotermik reaksiyonun gerçekleşmesi için gereken enerji 1 mol ATP'den sağlanır (Şekil 3.3) (Tüzün, 2002).



Replikasyonun her bir reaksiyon aşamasında:

$$dNTP + (dNMP)_n \rightarrow (dNMP)_{n+1} + P{\sim}P \qquad \Delta G=-3.5 \text{ kcal/mol}$$

Gerekli ilave enerji pirofosfatın hidrolizinden açığa çıkan enerjiden sağanır.

$$P{\sim}P \xrightarrow{\text{pirofosfataz}} 2Pi \qquad \Delta G= -7 \text{ kcal/mole} \rightarrow Keq \cong 10^5$$

genom bölgelerinin çoğaltılması da yapılmaktadır. Dolayısıyla primerin spesifik olmaması DNA'nın rasgele çoğaltılmasını sağlamaktadır. Böylece çok sayıda DNA fragmenti elde edilmektedir. Tüm bu fragmentlere bakılarak üretimi yapılan DNA parçalarının bazı genotiplerde üretilip bazılarında üretilmediği gözlenmektedir. Bu işlem dağılım gösteren bir populasyona yapıldığında, ebeveynlere ait üretim motiflerine bakılarak döllerin analizi gerçekleştirilir (Welsh ve McClelland, 1990). Sonuç olarak, tek bir primerle PCR tekniğiyle çoğaltılmış bu DNA parçacıkları, elektroforez tekniğiyle agaroz jelde birbirinden ayrılırlar. Jel üzerinde elektriksel ortamda molekül büyüklüklerine göre ayrılan DNA parçacıkları daha sonra etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık altında görünür hale getirilir (Williams ve ark., 1990; Scott ve ark., 1992; Morgan ve ark., 1993; Rothuizen ve Wolferen, 1994). RAPD-PCR yöntemiyle elde edilen ve agaroz jelden elde edilen görüntüye RAPD profili adı verilir. Polimorfizm ise ilgili bantların bireylerde "var" ya da "yok" olma durumlarına göre belirlenir.

RAPD-PCR yöntemin en büyük avantajı, analiz edilecek olan organizmaya ait biyokimyasal ya da DNA dizi bilgisine ihtiyaç duyulmaksızın çok sayıda lokusun kısa sürede analiz edilmesidir. Kısa oligonükleotidlerin spesifik koşullar altında farklı birçok genomdan tekrarlanabilir çoğaltımların gerçekleştirebilmesi mümkün olduğundan, hemen hemen tüm organizmaların nanogram düzeyindeki genomik DNA'ları kullanılarak doğrudan polimorfizm belirleyecek evrensel primer panelleri oluşturmak mümkündür (Yeşbek, 2007). RAPD yönteminin diğer avantajları ise düşük miktarda DNA'ya ihtiyaç duyması, çabuk sonuç vermesi ve ucuz olmasıdır. Bununla birlikte polimorfizm oranının yüksek olması filogenetik haritalama için otomasyon programlarına uygulanabilirliğini sağlar. Ancak tekniğin bazı dezavantajları vardır. Bunlardan en önemlisi güvenilirliğinin sınırlı olmasıdır. Farklı laboratuvarlarda, farklı araştırmacıların elinde ve hatta bir ısısal döngü cihazından diğerine farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu dezavantajların bertaraf edilebilmesi için çalışmaların standart koşullarda yapılmasına özen gösterilmesi gerekmektedir.

RAPD markırları birçok amaçla kullanılmaktadır. Genetik haritaların oluşturulması, çeşitli amaçlarla yapılan sistematik, filogeni ve populasyon genetiği çalışmaları, bazı özel gen bölgelerini kontrol eden yerlerin tanımlanması, tohumların test edilmesi, varyasyon/hat tanımlanması, markır yardımlı seçilim ve bitki ıslahı

geliştirilmiştir. AFLP tekniği genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra restriksiyon parçalarının seçici PCR ile çoğaltılması yöntemine dayanan bir tekniktir (Vos, 1995; Huys, 1996). Teknik üç basamaktan oluşmaktadır. İlk basamak, DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesidir. Böylece aktif olan kesim uçlarına oligonükleotid adaptörler eklenir. Restriksiyon parçaları uygun primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmaktadır. Sonuç olarak oluşan bu yapışkan uçlara bağlanan primerlere komplementer olarak eşleşen oligonükleotid diziler kullanılır ve böylece PCR'da bu parçalar çoğaltılmış olur (Wang ve ark., 2006).

Bu metot kullanılarak, nükleotid dizisi bilinmeden restriksiyon parça kümeleri PCR ile çoğaltılarak görüntülenebilir (Şekil 3.9). Bu metot yüksek sayıda restriksiyon parçasının aynı anda özgül olarak çoğaltılmasına olanak sağlar. Aynı anda analiz edilebilir parça sayısı tespit edilen sistemin çözülebilirligine bağlıdır. Tipik olarak 50–100 restriksiyon fragmenti çoğaltılır ve denatüre poliakrilamit jellerde tespit edilir. Teknik DNA polimorfizmin tespiti için oldukça güçlüdür. Genellikle birbirine yakın türlerin karakter analizlerinde kullanılan AFLP sonuçları, günümüzde birbirine çok yakın akraba türlerinin tespiti, türlerin tanımlanması ve ayrımı, starter kültür analizleri, gıdalarda bozulmalara ve gastrointestinal enfeksiyonlara neden olan önemli mikroorganizmaların karakterizasyonlarında da kullanılmaktadır. Tür ve alt tür seviyesinde ayrım sağlayan bu tekniğin diğer DNA tiplendirme metotlarına kıyasla çok geniş bir alanı taraması, az miktarda işgücüne gereksinim duyması, tekniğin hızlı ve sonuçların kolay yorumlanabilmesinin analiz için az miktarda DNA gerektirmesi ile beraber ulaşılan bilginin oldukça fazla olması gibi avantajlarından dolayı kullanımı gün geçtikçe artmaktadır.

ISSRs (Tekrarlanan basit baz dizilimi arası): Teknik, 5' ve 3' ucunda bulunan kısa, tekrarlanan DNA zincirlerini primer (SSR primerleri) olarak kullanan ve PCR tekniğine dayanan bir yöntemdir (Zietkiewicz ve ark., 1994; Cingilli ve ark., 2005). Bu yöntemle genom üzerinde birbirine yakın olan SSR'ler arasındaki DNA dizileri çoğaltılır ve ortaya çıkan fragmentlerin uzunlukları karşılaştırılır. Teknikte hedef genomik DNA 3' ucundan birkaç tane farklı baz içeren mikrosatellit markırları ile çoğaltılmaktadır (Şekil 3.10). 3' ucunda primer olarak 2 ile 4 arasında değişen farklı veya aynı nükleotidlerin basit olarak tekrarlarından oluşan DNA zincirleri kullanılarak ISSR markırı elde etmek mümkündür. Bunlar, çoğunlukla dominant

arasında yüksek oranda korunmuş olmalarından dolayı, genellikle orta düzeyde polimorfizm gözlenebilmektedir. Ürünler arasında büyüklük farkının gözlenmediği durumlarda yine aynı restriksiyon enzimleri kullanılarak polimorfizm saptanabilmektedir (Talbert ve ark., 1994). STS yöntemi RFLP'ye göre daha kolay, daha ucuz ve hızlıdır. Çoğunlukla kodominant özellikte markır üretmektedir. Bununla birlikte RAPD yönteminde olduğu gibi az miktarda DNA gerektirir ve otomasyona uygundur. Ancak polimorfizm oranının orta seviyede olması tekniğin en önemli dezavantajlarındandır (Walton, 1993). Ayrıca ilgili RFLP probunun nükleik asit dizilişinin bilinmesini ve buna göre bir primer geliştirilmesini gerektirir.

SNP (Tek nükleotid polimorfizmi): SNP'ler en yaygın olarak görülen DNA polimorfizmleridir. İnsanlarda yaklaşık üç milyon SNP olduğu bilinmektedir (Russell, 2001). Buğday genomunda bu sayı her 1/370 bç ile 1/540 bç arasındadır (Procunier ve ark., 2003; Somers ve ark., 2003). Bazı populasyon ya da populasyonlardaki normal bireylerde bulunan ve genomik DNA üzerinde farklı dizi alternatifleri (allel) olarak tanımlanan tek nükleotid değişiklikleridir. Bu allel frekansının dağılımı en az %1 ve daha büyüktür (Brookes, 1999). Bazı araştırmacılar tek nükleotid substitüsyonlarını yaygın olarak SNP adı altında sınıflandırsa da, SNP'ler tek nükleotid insersiyon ya da delesyonları değildir. Teorik olarak her bir nükleotid pozisyonunda dört allel (dört farklı nükleotid oldugu için) bulunabilir (Şekil 3.11), ancak pratikte kural olarak sadece iki allel vardır (Brookes, 1999). Başka bir deyişle SNP markırları, eşit olmayan (unequal) nükleotid transisyon (A-G, T-C) ve transversiyonları (A-C, A-T, G-C, G-T) olarak tanımlanan biallelik markırlardır. Multiallelik markırların aksine biallelik olan SNP markırları tamamen otomatize edilebilir ve DNA'nın mikroarraylara uygulanması ile aynı anda birkaç bin SNP analizi yapılabilir. Modern tekniklerin kullanılmasıyla, SNP analizlerinin etkinliği diğer DNA analiz yöntemlerine göre birkaç misli artırılmış olur (Khlestkina ve Salina, 2006).

cDNA'lar mRNA'lardan elde edildikleri için belirli şartlarda ya da gelişimin farklı aşamalarında ifade edilen genlerin incelenmesine olanak sağlar. EST'ler, fonksiyonel genlerin segmentleridir. EST'ler yeni genlerin keşfi, genom haritalanması, genomik sekanslardaki kodlayıcı bölgelerin tanımlanması, gen ekspresyonu ve regülasyonu ile ilgili veri elde edilmesi için hızlı ve ucuz bir yol sunarlar.

3.4. Moleküler Markırların Uygulama Alanları

Moleküler markır kullanımının en önemli amacı bireyler arasındaki farklılığın DNA seviyesinde ortaya çıkarılmasıdır. Bu farklılık genomda tek bir bölgeyi gösteriyorsa, bu "allel" olarak ifade edilir. Özellikle DNA markırları bireyler arasındaki allelik farklılıkları ortaya koyar. RFLP, RAPD-PCR, ISSR, AFLP gibi DNA markırları ile pek çok bitkinin gen dizilimleri tanımlanarak genom haritaları çıkarılmıştır. Özellikle *Arabidopsis talia* adlı süs bitkisinin tüm genom haritası tanımlanmış ve bu sayede diğer bitkilerin genomlarının tanımlanmasında referans olmuş ve olmaya da devam etmektedir.

Moleküler markırların, bitki türlerinin genetik çeşitliliğini belirlemede iyi bir teknik olduğu kanıtlanmıştır (Karp ve ark., 1998). Gen kaynaklarının tarımsal değeri, adaptasyonu ve performansını belirlemede markır tekniklerinin kullanılması, bitki ıslahçılarına doğrudan yararlı bilgiler sunmaktadır. Özellikle ülkelere endemik türlerin genomlarının tanımlanmasında moleküler biyologların yoğun çabaları ile her geçen gün literatürlere kazandırılan bitki sayısı artmaktadır (Shengwu ve ark., 2003; Lie-Zhao ve ark., 2006; Young ve Shoemaker, 2006; Chappell ve ark., 2006). Bu çalışmalar, tür içi ve türler arası akrabalıkların belirlenmesine alt yapı oluşturmakta ve bitkiler DNA düzeyinde taksonomik olarak sınıflandırılabilmektedir. Bu sayede moleküler markırlar, gen kaynaklarının tüm genetik kökenleri hakkında oldukça yararlı bilgiler sağlamaktadırlar. Bu bilgiler ıslahçılar için, özellikle nadir bulunan genleri içeren, gen kaynaklarının kullanılabilirliğine karar vermede önemlidir.

Moleküler markırlardan biri olan morfolojik markırlar bireyleri genotipik olarak tanımlamakla birlikte çevresel faktörlerden etkilenmeleri nedeniyle zaman zaman analizlerin doğruluğunu etkiler. Bununla birlikte morfolojik markırların belirlenmesi çok uzun zaman almaktadır. Oysa bitki genomlarının tanımlanmasına ihtiyaç duyan bitki ıslahçılarının daha hızlı ve daha doğru sonuçlar üreten metotlara

ihtiyaçları vardır. Çünkü morfolojik karakterler gibi fenotipik özekliklerin de genetik kontrol mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte ıslahçılar tarafından istenilen fenotipik özelliklerin ortaya çıkışı bitkilerde çok uzun zaman almaktadır. Bu nedenle moleküler markırların her birini tek başına ele almak uygulamada yanlış sonuçlara neden olabilir. Bir bütün içerisinde DNA, protein ve morfolojik markırların bir arada değerlendirilmesi pek çok bitkinin genotipik olarak tanımlanmasını sağlamıştır. Özellikle spesifik bir morfolojik karaktere bağlı olarak DNA markırlarının kullanımı kantitatif karakterlerin (Quantitative trait lokus, QTL) tanımlanmasında etkin rol oynamaktadır (Lie-Zhao ve ark., 2006).

DNA markır tekniklerinin diğer önemli bir uygulaması, yeni bitki çeşitleri için destek bir tescil sistemi olarak kullanılmasıdır. Moleküler teknikler, özellikle yeni bir çeşidin var olan başka bir çeşitle arasıdaki morfolojik benzerliğin çok olduğu durumlarda kullanılmaktadır. Ancak genetik markır sistemleri, bitki çeşitlerinin tescilinde morfolojik veriler temel alınarak kullanılmaktadır. Son yıllarda bitki ıslahçıları kendi çeşitlerini korumak için, destek bir sistem olarak moleküler markır tekniklerinden yararlanmaya başlamışlardır. Özellikle, DNA markır teknikleri, tohumluk ticaretinde ve ıslahçı haklarında ortaya çıkan, bazı problemlerin kesin olarak çözümlenmesinde de kullanılabilmektedir.

DNA markırları seleksiyonda (Marker Assisted Selection, MAS) basit karakterler ve kantitatif karakterlerin (QTL) aktarımında ve gen piramidinin oluşturulmasında da kullanılır. MAS tekniği oldukça hızlı, etkin, doğru ve ekonomik olduğundan klasik ıslah metotlarının başarısını artıran bir tekniktir (Quarrie, 1999). Özellikle çevresel faktörlerin, coğrafi koşulların ve istenilen karakterin bitki gelişiminin geç dönemlerinde meydana geldiği durumlarda zaman ve ekonomik açıdan ıslah etkinliğini artırarak yeni çeşitlerin geliştirilmesini hızlandırır. Ancak bitki genomu çalışılırken hangi DNA markır sisteminin uygulanacağı çalışılan özelliğe ve amaca göre seçilmelidir. Örneğin bir bitki hücresinde çekirdek, mitokondri ve kloroplast olmak üzere üç farklı DNA vardır. Bu nedenle farklı kalıtım şekline sahip bu organellerin genomları ayrı ayrı çalışılmalıdır. Bununla birlikte her moleküler markırın avantaj ve dezavantajları vardır. Bunun için moleküler markır seçiminde popülasyon tipi, polimorfizm düzeyi, lokus sayısı, analiz kolaylığı, hızı ve maliyetine bağlı olarak RFLP, AFLP, RAPD-PCR, ISSR ve SSR gibi polimeraz

zincir reaksiyonuna dayalı teknikler ya da hibridizasyona dayalı teknikler seçilir (Atak, 2004).

3.5. RAPD Analizlerinin Uygulama Alanları

Ucuz ve kısmen basit olması nedeniyle, RAPD tekniği biyolojinin birçok alanında yayın bir kullanım alanı bulmuştur. Genetik haritalamada RAPD tekniğinin kullanımı, işlemin maliyetini düşürür ve daha kısa sürede genom bilgisine ihtiyaç duymaksızın genetik haritaların oluşturulmasını sağlar. Genetik haritalamada yaygın olarak kullanılan RFLP ise (Restriction fragment length polymorphism) restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA parçacıklarının, radyoaktif problarla hibridizasyonu (southern blot) esasına dayanmaktadır. Böylece kesilen DNA parçacıklarının baz dizilimindeki farklılıkları belirlemek mümkün olmaktadır (White ve ark., 1985, White ve Lalouel, 1988). RFLP tekniğinin, uygulamasındaki zaman kayıpları, radyoaktif malzeme kullanımının getirdiği zorluklar, yüksek miktar ve kalitede DNA gerektirmesi nedenleriyle, nanogram miktarlarda DNA'ya ihtiyaç duyulan, üretilen parçacıkların doğrudan görüntülenebildiği, PCR teknolojisi üzerine dikkatler yoğunlaşmaktadır. Ancak haritalamaya olanak vermesine rağmen PCR tekniğinde gerekli olan primerin dizaynı genom için seçici primer dizaynı için, başlangıç baz dizilimi bilgisine ihtiyaç duyar. Bu herhangi bir organizmada fazla miktarda genetik markır geliştirilmesini sınırlamaktadır (Goodier ve Davidson, 1993; Durica ve ark., 2007). Ancak RAPD tekniğinin DNA parçalarını çoğaltmada kullanılan rasgele dizilimli primerleri sayesinde DNA dizilimine ilişkin bilginin gerekliliği ortadan kalkar. RAPD, genetik haritalama çalışmalarının, göreceli olarak kısa bir sürede yapılmasını sağlar. Ayrıca jel üzerindeki RAPD bantlarının kesilerek saflaştırılmasından sonra southern blot analizlerinde RFLP bölgelerini belirleyen, hibridizasyon problarının elde edilmesi tekniğin başka bir avantajını oluşturmaktadır. Ancak RAPD markırlarının dominant karakterli olması, haritalama çalışmalarındaki dezavantajlardandır.

Genetik yapıları birbirine çok yakın olan bitki tür veya çeşitlerinin, çok az sayıda bulunan, farklı gen kodlayıcı bölgelere ya da genomun tekrarlı olarak düzenlendiği bölgelerdeki değişikliklere bakılarak tanımlanabileceğini belirtmektedirler (Vorster ve ark., 2002). Bitkilerin genotipik olarak tanımlamasına

yönelik en fazla kullanılan teknikler RAPD ve AFLP markırlarıdır. RAPD analizleri, morfolojik karakterlerle kısmen tanımlamalara karşın, çeşitlerin ve klon bitkilerin tanımlanmasında başarıyla kullanılmaktadır (Mori ve ark., 1993, Wolff ve Rijin, 1993, Villordon ve LaBonte, 1995). Bu amaçla mercimek, buğday ve nohut gibi baklagillerden pamuğa, süs bitkilerinden aromatik bitkilere kadar pek çok bitkinin tür içi ve tür dışı genotipik tanımlamaları RAPD yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Cingilli ve ark., 2003; Atak, 2004; Surgun, 2008). Ayrıca RAPD markırları yardımıyla asma ve güllerin tür ve çeşitlerinin ilişkileri araştırılmıştır (Karataş, 2005; Çalışkan, 2005).

Bitkilerin ekonomik olarak önemli pek çok özelliği birçok gen tarafından aynı anda kontrol edilmekte ve aynı zamanda çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Bazı özellikler kantitatif özellikler olarak adlandırılmakta, bunlar kantitatif özellik lokuslarının (Quantitative Trait Loci, QTL), ifadesi sonucunda ortaya çıkmaktadırlar. RAPD markırları, adaptasyon ve seleksiyon programlarında bu lokusların gözlenmesinde kullanılmaktadır. Moleküler markırlar, hastalıklara dayanım gibi ticari öneme sahip tek genle idare edilen genetik özelliklerle ilişkili olmakta ve bu genetik özelliklerin doğal gen kaynaklarında, adapte olmuş yerli hat veya çeşitlerden tanımlanmasında kullanılmaktadır.

Moleküler tekniklerdeki avantajlar, biyolojinin birçok konudaki problemleri çözmede büyük etkiye sahiptir. Popülasyon genetiği çalışmalarını sınırlayan diğer faktörler, göreceli olarak yüksek maliyete, karmaşık cihazlara, iyi eğitimli personele ve uzun zamana duyulan ihtiyaçtır. RAPD tekniğinin basitliği ve DNA seviyesindeki genetik farklılıkları ortaya çıkarmadaki hızlılığı, popülasyon genetiği çalışmalarında büyük öneme sahiptir (Hedrick, 1992). Fakat farklı türler veya büyük genetik açılım gösteren popülasyonlardan alınan örnekler söz konusu olduğunda elde edilecek bilgilerin güvenirliliği azalmaktadır (Allegrucci ve ark., 1995; Zhang ve ark, 2011). Bu nedenle, RAPD verilerinden sistematikte yararlanılmakla birlikte, bu veriler morfolojik, izoenzim ve RFLP markırları ile oluşturulmuş taksonomik çalışmalarla da desteklenmelidir. Türe özgü markırlar, türler arasındaki gen değişiminin ve melez bireylerin tanımlanmasında kullanılabilmektedir. Yine popülasyona özgü markırlar, melez popülâsyonların tanımlanmasında kullanılmaktadır (Arnold ve ark., 1991). Populasyon genetiği çalışmalarında, RAPD markırlarının en önemli dezavantajı, ıslah edilmiş çeşitlerin dominant karakterli olmasıdır. Bu nedenle RAPD markırları

da, alloenzim ve RFLP gibi ko-dominant markırlarla karşılaştırıldığında gen frekansına ilişkin elde edilen bilgi daha azdır. Aynı primerden elde edilen görünüşte aynı moleküler ağırlığa sahip bantlar arasındaki benzeşmeler de, RAPD çalışmalarını olumsuz yönde etkileyen diğer bir dezavantajdır (Çalışkan, 2005).

4. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Gingko biloba bir başka adıyla Maidenhair ağacının Mesozoyik dönemde (248-65000000 yıl önce) geliştiği bilinmektedir. Günümüze kadar canlılığını sürdüren *Ginkgo biloba,* türünün sağ kalan tek örneğidir (Goh ve Barlow, 2002; Nakanishi, 2005). Bu ağacın ömrü yaklaşık 1000 yıldır. Dünya üzerinde yaşayan tek gymnosperm'dir. Sistematik olarak Ginkgo ağacının tek bir familyası familyanın ise sadece bir cinsi ve bu cinsin de tek bir türü vardır. O da *Gingko biloba* ağacının kendisidir. Kendi başına tek bir tür olsa da, *Gingko biloba*'nın dinozorların yaşadığı dönemde bile var olduğu bilinmektedir. Bu yaklaşık 213 milyon yıl öncesine Jurassic dinozor çağı olarak bilinen döneme rastlamaktadır.

Gingko biloba'nın Kuzey Amerika'ya özgü olduğu düşünülür ancak *Ginkgo biloba* Çin, Japonya ve Kore'de bulunmaktadır. Bu bölgelerin dağlık kesimlerinde hala varlığını sürdürmektedir. (Pinto ve ark, 2009; Blumenthal, 2001). *Gingko biloba*'nın bu bölgelerdeki varlığının birkaç bin yıllık olduğu bilinmekle birlikte özellikle on birinci yüzyılda Çin'de yetiştirildiğine dair Song Hanedanı'nın belgeleri arasında yazılı kaynaklar bulunmaktadır (Tredici, 2000) Bu eski metinlere göre, ağaç şimdi Güney Anhui Eyaleti Ningguo İlçe sınırları içerisinde yer alan, Yangtze Nehri'nin güneyinde bir alandan gelmektedir. *Gingko biloba* ilk defa sekiz yüzyıl önce doğu Çin'den batı Japonya'ya geçmiştir. Japonya'da da Çin'de olduğu gibi, büyük ağaçlar Budist ya da Taoist tapınak ve mabetleri civarında yetiştirilmektedir (Tsumura ve ark., 1992; Tredici, 2000). *Ginkgo biloba* Japonya'dan 730'da Hollanda'nın Utrecht şehrindeki Botanik Bahçesi ve 1754'lerde, İngiltere'nin Londra şehrindeki Kew Bahçesi'nde ekilmesiyle ilk defa Avrupa'da tanınmıştır. Bu tarihten sonra da ağaç İngiltere'ye ithal edilmeye başlanmıştır. Günümüzde Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika olarak bilinen bazı bölgelerde *Ginkgo biloba*'nın en az 11 genotipi bulunmaktadır (Nakashi, 2005). Günümüzde ağacın yetiştirilmesi dumana ve böcek zararlılarına karşı gösterdiği direnç nedeniyle yaygın hale gelmiştir. Son yıllarda *Ginkgo biloba* özellikle göstermiş olduğu ilaç etkisi nedeniyle Batı'da oldukça ilgi çekmektedir. *Ginkgo biloba* yaprak özlerinin dolaşım sistemi üzerinde yararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte solunum sistemi için de kullanılmaktadır. *Ginkgo biloba*'nın hastalıkları tedavi edici yönü Çin'de yüzyıllardır bilinip kullanılmasına rağmen Batı *Ginkgo biloba*'nın meyve ve tohumlarının tıbbi

özelliklerini yeni tanımaktadır. Geçmişte Doğu'nun antik ilacı olan *Ginkgo biloba*'nın meyve, tohum ve yaprakları günümüzde Avrupa'da kullanılan en yaygın ve en popüler bitkisel takviyedir (Tredici, 2000).

Ginkgo biloba yaprakları izoprenoitler (steroller, terpen trilaktonlar), alifatik alkoller ve ketonlar, organik asitler, polisakkaritler, flavonol glikozitler veya terpen trilaktonlar gibi bileşikler ihtiva etmektedir (Tredici, 2000). *Ginkgo biloba* yaprakları astım tedavisinde ve mantar hastalığında ve alkoliklerin tedavisinde yüzyıllardır Çin bitkisel ilaç olarak kullanılmaktadır (Nakashi, 2005). Son yıllarda, *Ginkgo biloba* ekstraktlarının tıbbi özellikleri üzerine pek çok çalışma yapılmış ve elde edilen sonuçlar dünyanın ilgisini çok çekmiştir. *Ginkgo biloba*'nın bellek geliştirme amaçlı olarak yaşlı insanlar arasında yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Aynı zamanda kalp ve beyin hastalıklarının tedavisinde kullanılır. (Boveris ve ark, 2007; Chan ve ark., 2007). *Ginkgo biloba*'nın tıbbi etkisinin temel nedeni kalp-damar hastalıkları, diabet, yaşlanma ve çeşitli kanser türleri için koruyucu etki göstermesindendir. Bu koruyucu özellik yapraklarının yüksek oranda antioksidan kapasiteye sahip olmasına bağlanır (Pietta ve ark, 2000; Goh ve Barlow, 2002; Maclennan ve ark, 2002). *Ginkgo biloba*'nın farmakolojik etkisi ve mekanizmaları üzerine çeşitli çalışmalar yapılarak serebral yetersizlik, demans, bellek ve dolaşım bozuklukları, kulak çınlaması ve astım gibi tedavilerinde kullanılabileceği ortaya konulmuştur (Perry ve ark., 1999; Boonkaew ve Camper, 2005; Saw ve ark., 2006; Oliveira ve ark, 2009). *Ginkgo biloba*'nın aynı zamanda nöroprotektif yetenekleri artırdığı bilinmektedir (Oliveira ve ark., 2009). Bu tıbbi etkilerinin ihtiva ettiği gingkolitler, polifoneller ve flavonoidlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ginkgolit metabolizmada trombosit aktive edici faktörü inhibe ederken *Ginkgo biloba*'da bulunan flavonoidler, serbest radikalleri temizleyici etki gösterirler. Bu nedenle, *Ginkgo biloba* yaprak özleri Avrupa, Asya ve Amerika'nın önde gelen reçeteli bitkisel ilaçları arasındadır (DeFeudis ve Drieu, 2000).

İlaç olarak kullanılması amacıyla *Ginkgo biloba* ekstraktı ilk olarak 1965 yılında Almanya'da geliştirilmiş ve "EGb 761" adıyla piyasaya sürülmüştür (DeFeudis ve Drieu, 2000) Daha sonra Fransa'da 1974 yılında tescil edilmiş (IPSEN, Paris) ve seri olarak üretilmeye başlanmıştır. Ekstrakt, %24 oranında flavonoid, %7 oranında proantosiyanidin ve %6 oranında terpenoid içerir (Goh ve Barlow, 2002). İhtiva ettiği flavonoidler arasında öncelikle kaempferol, kuersetin ve isohamnetinin

glukoz veya ramnoz ile oluşturdukları flavonol-glikozitler vardır. Terpenoid fraksiyonu ise diterpenlerin eşsiz bir grubu olan ginkgolit A, B, C ve J ile seskiterpenlerden bilobalitten oluşmaktadır. EGb-761 ayrıca kinurenik, hidroksikinurenik ve vanilik asit gibi organik asitler de içerir.

Ginkgo biloba'nın kimyasal bileşimi ve farmasötik etkisinin araştırılmasına ilişkin pek çok çalışmanın yanında son yıllarda moleküler analizleri üzerine de çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. *Ginkgo biloba*'ya bu eşsiz tedavi edici etkiyi ve yüksek fenolik içeriği sağlayan yapının nükleik asitleri ve tüm bunları kontrol eden temel mekanizmanın genleri olduğu düşünüldüğünde gen düzeyinde yapılan araştırmalar daha da artacak gibi gözükmektedir. Moleküler yönden yapılan bazı çalışmalar aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Li ve arkadaşları 2006'da yapmış oldukları çalışmada Amerika, Hollanda, Japonya, Fransa ve Çin'de yetiştirilen 21 *Ginkgo biloba* türü arasındaki genetik ilişkiyi tanımlamışlardır. Bu çalışmada 8 adet primer kombinasyonu ile 1119 adet DNA fragmenti üretilmiştir. Bunlardan 229'u (175'i monomorfik) spesifik bölgelere aittir. Bunlar arasında 983 polimorfik bant %88 benzerlik vermiştir. 14 yabancı kültürün polimorfik bant değeri %35,86 iken 7 yerli kültürün bant değeri ise %31,51 olarak bulunmuştur. Kültürler arasındaki genetik benzerlik katsayısı 0,4899-0,8499 arasındadır. Tüm kültürler dendogramda 4 kola ayrılmış ve genetik katsayıları 0,7300 olarak bulunmuştur. Aynı orijinli kültürler dendogramda aynı kolda bulunmamaktadır. Fransa ve Çin orijinli kültürler 3 kola ayrılmıştır. Spesifik bölge analizine, benzerlik katsayısına ve kluster sonucuna bağlı olarak 'Fastigiata', 'Tit', 'Tubifolia', 'Daeryinxing', 'Variegata', 'Horizontalis, 'Pendula' ve 'Yiyuanyeziyinxing' adlı sekiz kültürün *Ginkgo biloba* kültürlerinin önemli germplasmlarından olduğu görülmüştür.

Ling ve arkadaşları 2003'te rasgele çoğaltılmış polimorfizm DNA (RAPD) tekniği ile *Ginkgo biloba*'nın cinsiyet tayinine ilişkin markır bulmak amacıyla *Ginkgo biloba* DNA'ları çoğaltılmışlardır. Bu amaçla 1200 rasgele dekamerler kullanmışlardır. 8372 adet RAPD bantlarından 682 bp'lik bir bant S1478 primeri ile çoğaltılmış ve bu bandın varlığının erkek cinsiyetine ait olduğu bulunmuştur. Bu markır tüm erkek bitkilerde vardır. Bandın yokluğu ise o bitkinin dişi bitki olduğunu göstermektedir. Çin'in Beijing ve Shenyang şehirlerindeki Ginkgo ağaçlarından izole

edilen DNA'lar S1478 primeri ile çoğaltılmış ve pozitif sonuç elde edilmiştir. Böylece cinsiyet tayini için bir markır geliştirmişlerdir.

Wang ve arkadaşları 2010'da 97 adet erkek cinsi Ginkgo ağacı arasındaki genetik benzerliği bulmak amacıyla ISSR markırları kullanmışlardır. Sonuç, erkek ağaçlar arasında yüksek genetik benzerlik olduğunu göstermiştir. 13 ISSR primeri, 83'ü polimorfik olmak üzere 114 bant üretmiştir. Polimorfik bant yüzdesi %72,8 ve etkin allel sayısı 1,811, Nei'nin genetik uzaklığı 0,437 ve Shannon indeksi 0,625'dir. UPGMA kluster analizi ise 97 türü iki gruba ayırmıştır. Birinci grup coğrafik uzaklıkla korelasyon gösterirken diğer grubun yetiştiği coğrafik bölge ile herhangi bir ilişkisi yoktur.

Singh ve arkadaşları 2010 Hindistan'ın kuzeybatı bölgesinden 21 adet *Ginkgo biloba* ağacı arasındaki genetik çeşitliliği, çoğaltılmış fragment uzunluk polimorfizm (AFLP) ve mikrosatelit tekniklerini kullanarak tanımlamışlardır. AFLP markırları ağaçlar arasında %23-71 oranında benzerlik olduğunu göstermiştir. Ayrıca AFLP ile coğrafik bölge ve genetik çeşitlilik arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır. Mikrosatelit markırları 3 gen bölgesinden yüksek oranda heterozigot olan 32 allel üretmiştir. Bu çalışma ile Hindistan'da *Ginkgo biloba* yetiştirilmesinin yaygınlaştırlması ve böylece ekonomiye katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

Xiaomei ve arkadaşları 2001'de yapmış oldukları çalışma ile *Ginkgo biloba*'da cinsiyete özgü gen bölgelerini tanımlamaya çalışmışlardır. Bu amaçla kullanılan 150 primer ve 110 primer kombinasyonu ile RAPD-PCR yapılmıştır. Böylece erkek cinsine bağlı bir RAPD markırı bularak cinsiyete özgü gen klonlanması gerçekleştirmişlerdir.

Shen ve arkadaşları 2006'da Çin'in kuzeybatısında bulunan 8 farklı bölgeden 158 *Ginkgo biloba* ağacından kloroplast DNA'sı (cpDNA) izole etmişlerdir. Daha sonra trnK1-trnK2 fragmentinde coğrafik bölgeye bağlı oluşan 8 varyant tespit etmişler ve sonuç olarak Batı Tianmu dağında yetişen *Ginkgo biloba*'nın yabani tür olduğunu bulmuşlardır.

Yan ve arkadaşları 2009'da, *Ginkgo biloba*'nın 11 polimorfik mikrosatelit bölgesini modifiye biotin-tutuklama metodu kullanarak karakterize etmişlerdir. Bu bölgeler yüksek oranda allelik çeşitlilik göstermiştir. Lokus başına allel büyüklüğü 4 ile 16, buna karşın polimorfizm oranı 0,432 ile 0,909 değerleri arasındadır. Gözlenen ve tahmin edilen heterozigot aralığı ise sırasıyla 0,208 ile 0,708 (ortalama = 0,484)

ve 0,501 ile 0,934 (ortalama = 0,795) aralığındadır. Sonuç olarak bu mikrosatelit markırları daha geniş *Ginkgo biloba* populasyonları arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılabilir.

Yan ve arkadaşları 2006'da *Ginkgo biloba*'dan polimorfik mikrosatelit lokuslarını çift baskılı polimeraz zincir reaksiyonunu kullanarak klonlamışlardır. Mikrosatelit markırları ile sağlanan bu lokuslar, lokus başına 3 ila 13 allel vererek yüksek oranda polimorfizm göstermişlerdir. Gözlenen ve tahmin edilen heterozigot aralığı ise sırasıyla, 0,667 ile 0,952 ve 0,640 ile 0,897 aralığındadır. Böylece bu gen bölgelerinin *Ginkgo bilob*a'nın korunması, genetik çeşitliliğin tanımlanması ve yaygınlaştırılması için daha sonra çalışmalarda kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Hârţa ve arkadaşlarının 2010'da *Ginkgo biloba* üzerine yapmış oldukları çalışmanın amacı 2 DNA markır metodu (RAPD ve AFLP) kullanarak farklı bölgelerde yetişen *Ginkgo biloba'*nın türiçi genetik varyasyonlarının belirlenmesidir. Bu amaçla kullanılan 20 RAPD primerin 10 tanesi genotipler arasında kaydadeğer polimorfik bantlar vermiştir. 165 AFLP primer kombinasyonundan *Ecs-AGG+MCG* Romanya ve Danimarka türleri arasında en yüksek polimorfizmi göstermiştir. En düşük polimorfizmi ise 74 adet polimorfik bant ile *Ecs-AGG+MGA* primer kombinasyonu vermiştir. Analizi yapılan Ginkgo genotipleri kluster analizi ile 2 ana grup olarak sınıflandırmıştır.

Fan ve arakadaşları 2004'te Çin'de yetişen 9 *Ginkgo biloba L.* populasyonu arasındaki genetik çeşitliliği ve farklılığı RAPD yöntemi ile bulmuşlardır. Toplam 47 banttan %97.9 polimorfizm oranı ile 46 polimorfik bant elde etmişlerdir. Genotipler arasındaki genetik benzerlik katsayısısı 1,57-1,83 arasındadır. Shannon indeksi ise 0,3432 ile 0,5119 aralığındadır. GST değeri 0,1609 iken AMOVA analizi populasyon içinde %89'luk bir varyasyon göstermiştir. UPGMA ile 9 populasyon 2 gruba ayrılmıştır. Genetik çeşitlilik ve farklılık Çin populasyonunda Kore ve Güney Amerika populasyonularından daha yüksektir

Liao ve arkadaşları 2009'da *Ginkgo biloba*'nın cinsiyetini belirleyen gen bölgesinin rasgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi (RAPD) ve dizini karakterize edilmiş çoğaltılmış bölgeler (SCAR) teknikleri kullanarak tanımlamayı amaçlamışlardır. Toplam 48 primer 6 dişi ve 3 erkek cinsi *Ginkgo biloba*'da tanımlanmıştır. Sadece S10 primeri erkek cinsine göre farklı çoğaltım ürünü

vermiştir. Daha sonra cinse özgü olarak bulup adlandırdıkları bant A ve bant B'yi jelden kesip, saflaştırmış ve dizisini tayin etmişlerdir. Bunun yanında 16 farklı cinsteki *Ginkgo biloba* için GBA ve GBB olmak üzere 2 SCAR primeri kullanılmıştır. GBA yalnızca erkek türlerinde 571 bp'lik ve GBB yalnızca dişi türlerinde 688 bp'lik gen ürünleri vermiştir.

Echenard ve arkadaşları 2008'de İsviçre'nin Genova kentinden toplanan 72 *Ginkgo biloba* ağacından RAPD tekniği kullanarak cinsiyet tayini yapmışlardır. Bu amaçla erkek cinsine özgü S1478 primerini kullanmışlardır. Bu markır dişilere özgü değildir. Bu nedenle çalışmalarında yeni bir teknik olarak otomatik rasgele polimorfik DNA analizini de (ARPA) kullanmışlar ve bu teknikle cinsiyet ayrımını %100'lük bir etkinlikle yapmışlardır.

Gong ve arkadaşları 2008'de Çin'den topladıkları *Ginkgo biloba* yapraklarından genomik DNA ve plastit DNA izolasyonu yapmışlardır. Genomik DNA'yı tanımlamak amacıyla AFLP tekniğini kullanmışlardır. Plastit DNA için ise trnK ve trnS–trnG gen bölgelerini çoğaltmışlardır. Elde edilen verilerden Kuzeybatı ve Doğu Çin bölgesinde yetişen Ginkgo populasyonunun korundunduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte Avrupa, Japonya, Kore ve Amerika'da yetişen *Ginkgo biloba*'ların farklı zamanlarda Doğu Çin'den alınıp buralara getirildiğini kanıtlamışlardır.

Deng ve arkadaşları 2006'da dehidrin kodlayan bölgenin cDNA'sını kopyalamışlardır. Bu çalışmada GbDHN olarak adlandırılan 813 bp uzunluğunda ve 489 bp'lik bölgesi kodlanmaya açık olan (OPR) gen bölgesini klonlamışlardır. GbDHN proteini 163 amino asitlik ve molekül ağırlığı 17 kDa olan ve izoelektrik noktası (pI) 5.75 olarak tahmin edilen bir polipeptittir. GbDHN dehidrinler için S- ve K-segmenti olmak üzere belirleyici iki segmentten oluşur. Bir diğer segmenti olan Y-segmenti belirleyici değildir. Homoloji analizi dehidrinlerin bu iki segment ile tanımlandığını göstermiştir. Genomik walker teknolojisi ile bu gen üzerindeki 257 bp'lik bir kısmın intron bölgesi olduğu bulunmuştur. Bu araştırmacılar, promoter analizi ile bu genin 6 CAAT kutusu, bir TATA, bir ABRE kutusu ve 5' ucunda bir GC-motifi olduğunu göstermişlerdir. Real time analizi ise bu genin bitkinin köklerinde ifade edildiğini göstermişlerdir. Çalışmada ayrıca *Ginkgo biloba*'ya abskisik asit (ABA) ve tuz stresinin etkisi incelenmiş ve sonuç olarak ABA ve çevresel strese tepki olarak bitkinin dehidre olduğu gösterilmiştir.

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Materyal

5.1.1. Kullanılan cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar marka ve modelleriyle birlikte Çizelge 5.1'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Deneylerde kullanılan cihazlar

Cihaz	**Marka, Model**
UV-Spektrofotometre, çift ışın yollu	Shimadzu U.V. 1700
HPLC	Shimadzu
GC	Shimadzu
Analitik terazi	Presica XB 220A
Liyafilizatör	Lancome
Evaporatör	Heildolp
pHmetre	İnolab
Mikropipet takımı	Ependorf
Etüv	Nüve
Ultra saf su cihazı	Millipore
Su banyosu	Nüve
Termal cycler-PCR	Biorad
İnkübatör	Nüve
Yatay elektroforez sistemi	Biorad
Jel görüntüleme sistemi	Biorad
Santrifüj	Heildolp, Ependorf
Mikrosantrifüj	Ependorf
Vorteks	İka
Otomatik nükleik asit izolasyon cihazı	Qiagen

Çizelge 5.2. Deneylerde kullanılan tamponlar

Biyokimyasal Analizler		
Tampon adı	**Kimyasallar**	**pH**
PBS Tamponu	0,1 M Na_2HPO_4 0,2 M NaH_2PO_4	7,4 6,6
Molekuler Analizler		
Tampon adı	**Kimyasallar**	**pH**
CTAB Tamponu	%1 CTAB (w/v) 100 mM Tris-HCl (8,0) 20 mM Na_2EDTA 1,4 M NaCl %1 PVP (w/v)	8
TE	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA	7,5-8
Tris	100 mM Tris-HCl	8
TAE	10 mM Tris-HCl (8,0) 1 mM EDTA Glasiyal Asetik asit	8
Yükleme Tamponu	4 M Üre 0,025 M EDTA %60 Sükroz (w/v) %0,025 Bromofenol blue (w/v) %0,025 Ksilen	7,5-8

5.1.4. Kimyasallar

Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler, kromatografik ve moleküler saflıkta olup Merck, Sigma, Fermantase ve İontek firmalarından temin edilmiştir (Çizelge 5.3).

Çizelge 5.3. Deneylerde kullanılan kimyasallar

Biyokimyasal Analizler	
Kimyasallar	**Reaktif ve standartlar**
Metanol	Folin reaktifi
Hekzan	1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH•)
Aseton	Bütillendirilmiş anisol (BHA)
Kloroform	Bütillendirlmiş hidroksitoluen (BHT)
Na_2CO_3	β-karoten
Polioksietilensorbitanmonolaurat	Gallik asit
(Tween 20)	Rutin
$FeCl_3$	Kuersetin
$FeCl_2$ x $4H_2O$	Troloks
Potasyum ferrosiyanat	α-tokoferol
Trikloroasetikasit (TCA)	Neokuprein
$CuCl_2.2H_2O$	Lineolik asit
Amonyum asetat	
Ferrozin	
$AlCl_3$	
PBS	
Trtikloro asetikasit (TCA)	
HCl	
NaOH	
KOH	
NH_3	

Moleküler Analizler		
Primerler	**Kimyasallar**	**Enzim**
OPA-1	CTAB	Taq Polimeraz
OPA-2	SDS	Hot Start Taq Polimeraz
OPA-3	EDTA	Proteinaz K
OPA-4	Tris	RNAaz
OPA-5	PVP	
OPA-6	Asetik asit	
OPA-7	Kloroform	
OPA-8	Propanol	
OPA-9	İsoproponol	
OPA-10	İzoamilalkol	
OPA-11	Etanol	
OPA-12	β-merkapto etanol	
OPA-13	dATP	
OPA-14	dGTP	
OPA-15	dTTP	
OPA-16	dCTP	
OPA-17	KCl	
OPA-18	$MgCl_2$	
OPA-19	DTT	
OPA-20	NaCl	
	Gliserol	
	Triton X-100	
	Agaroz	
	Etidium bromid	
	Sodyum asetat	
	Amonyum asetat	

Kromatografik Analizler	
Standartlar (HPLC)	**Standartlar (GC)**
Metanol	Sodyum metoksit
Asetik asit	Hekzan
Gallik asit	Linolenik asit
Kateşin	Linoleik asit
Kaffeik asit	Miristik asit
Epikateşin	Oleik asit
p-kumarik asit	Palmitik asit
Ferulik asit	Palmitoleik asit
Viteksin	Stearik asit
Rutin	Laurik asit
Naringin	Araşidonik asit
Hesperidin	Palmitoleik asit
Apigenin	Miristoleik asit
Rosmarik asit	
Eriodiktiol	
Kuersetin	
Naringenin	
Karvakrol	

5.2. Deneysel Kısım

Tezin amacına yönelik çalışmaların yapılmasında; kimyasal ve moleküler analizler paralel olarak yürütülmüştür. Deneylerde kullanılan metotlara ilişkin ayrıntılı bilgi biyokimyasal, kromatografik ve moleküler analizler başlıkları altında verilmiştir.

5.2.1. Biyokimyasal çalışmalar

Biyokimyasal çalışmalar, spektrofotometrik ölçümlere dayalı olarak bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesine ilişkin çalışmaları kapsamaktadır. Bununla birlikte ekstraktlarda bulunan toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları da spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir.

Bitki ekstraktlarının hazırlanması:

Antalya'dan toplanan *Ginkgo biloba* yaprakları gölgede kurutulup, değirmende toz haline getirilmiş ve her birinden yaklaşık 15 g alınıp sokslet kartuşuna yerleştirilmiştir. Metanol, aseton ve hekzan ile 30^{o}C'de ayrı ayrı 6 saat ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstraktların çözücülerini uzaklaştırmak için ekstrakt çözeltileri evaporatörde vakum altında 40^{o}C'ye tabi tutulmuştur. Evaporasyondan sonra kalan çözücülerin tamamen uzaklaştırılması için ekstraktlar liyofilize edilmiş ve toz halindeki ekstraktlar analiz yapılmak üzere 4 ^{o}C'de saklanmıştır.

Toplam fenolik madde konsantrasyonu:

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocaltaeu metotuna göre yapılmıştır (Singleton ve Rossi, 1985). Standart olarak kullanılan gallik asidin metanolde ve bitki ekstraktlarının kendi çözücülerinde 5 mg mL^{-1} stok çözeltileri hazırlanmıştır. Gallik asidin kalibrasyon eğrisi için stok çözeltiden gerekli seyreltmeler yapılarak gallik asidin 0,01-1 mg mL^{-1} konsantrasyon aralığında bir seri çözeltisi hazırlanarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Bitki ekstraklarının konsantrasyonu ise metanol, aseton ve hekzanda 0,05-1 mg mL^{-1} olacak şekilde bir seri çözeltisi hazırlanmış ve her bir deney tüpüne bitki ekstraktlarından 0,5 mL alınarak üzerine 2,5 mL Folin reaktifi (suda, %10'luk, v/v) ve 7,5 mL Na_2CO_3 (suda, %20'lik, w/v) ilave edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda çözeltilerin absorbansları UV spektrofotometrede 750 nm'de kaydedilmiştir. Aynı işlemler kalibrasyon eğrisi için hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltilerine de uygulanmıştır. Her bir ekstraktın absorbansı çizilen gallik asit kalibrasyon eğrisinin denkleminde yerine konularak gallik aside eşdeğer (GAE mg m L^{-1}) olarak toplam fenolik madde miktarı hesaplanmıştır. Her bir analiz 3 kez tekrarlanmıştır.

Toplam flavonoid madde tayini:

Toplam flavonoid madde tayini aluminyum şelatlama metoduna göre yapılmıştır (Ebrahimzadeh ve ark., 2008). Bu metotta toplam flavonoid madde miktarı kuersetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Bu amaçla kuersetinin metanolde 0,01-1 $mg\,mL^{-1}$ konsantrasyon aralığında hazırlanan her bir çözeltiden 0,5 mL alınarak üzerine 1,5 mL metanol, 2,8 mL deiyonize su, 0,1 mL 1 M sodyum asetat ve 0,1 mL %10'luk (w/v) $AlCl_3$ çözeltisinden ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra 415 nm'de her bir çözeltinin absorbansı spektrofotometre ile kaydedilip elde edilen absorbans değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiş ve grafik denklemi bulunmuştur. Aynı işlemler *Ginkgo biloba*'nın 0,05-1 $mg\,mL^{-1}$ konsantrasyon aralığındaki metanol, aseton ve hekzan ekstraktlarına uygulanmıştır. Her bir ekstraktın absorbansı, çizilen eğri denkleminde yerine konularak kuersetine eşdeğer (KE $mg\,m\,L^{-1}$) olarak toplam flavonoid madde miktarları hesaplanmıştır. Her bir analiz 3 kez tekrarlanmıştır.

DPPH• (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) radikal süpürme etkisi:

Bitki ekstraktlarının DPPH radikalini süpürme etkisi Sanchez-Moreno (1998) metodu esas alınarak belirlenmiştir. Bu amaçla, sentetik antioksidan bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ile *Ginkgo biloba*'nın metanol, aseton ve hekzan ekstraktlarının 0,01-1 $mg\,mL^{-1}$ konsantrasyon aralığında bir seri çözeltileri hazırlanmıştır. DPPH'ın kalibrasyon eğrisi için yine farklı konsantrasyonlarda (6.10^{-5}-$0{,}25.10^{-5}$ M) çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden 0,5 mL alınarak her birinin üzerine 3 mL DPPH çözeltisi (6.10^{-5} M) ilave edilmiştir. Karışım kuvvetlice karıştırılıp ağzı kapatıldıktan sonra 30 dakika süre ile karanlıkta bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda her bir çözeltinin absorbansı spektrofotometrede 517 nm'de kaydedilmiştir. Her bir bitkinin inhibisyon değerleri aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$I\,(\%) = \left[\frac{A_{boş} - A_{numune}}{A_{boş}}\right] x\ 100$$

$A_{boş}$: kontrolün absorbansı, A_{numune}: ekstraktın absorbansıdır. Bu değerlerden ve DPPH'ın kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak her bir ekstrakt için DPPH

konsantrasyonunu yarıya indiren bitki ekstraktı konsantrasyonu (IC_{50}) hesaplanmıştır. Ekstraktların IC_{50} değerleri sentetik antioksidan olan BHT ve BHA'nin IC_{50} değerleri ile karşılaştırılmıştır. Her bir analiz 3 kez tekrarlanmıştır.

β- Karoten- lineolik asit emülsiyon yöntemi:

β- Karoten-lineolik asit emülsiyon yöntemi ile antioksidan aktivite tayini Maltas ve arkadaşlarının (2010) kullandığı metoda göre yapılmıştır. Bu metotta emülsiyon çözeltisi hazırlamak amacıyla 0,2 mg β-karoten 1 mL kloroformda çözülmüştür. Üzerine 0,02 mL lineolik asit çözeltisi ve 200 mg tween 20 ilave edilmiştir. Kloroform 40^{o}C'de tamamen uzaklaştırılmıştır. Üzerine oksijenle doyrulmuş 100 mL deiyonize su ilave edilerek şiddetlice çalkalanmıştır. Kontrol çözeltisi için de aynı işlemler tekrarlanmıştır. Konsantrasyonu 2 $mg\,mL^{-1}$ olacak şekilde metanol, aseton ve hekzanda hazırlanan ekstraktlardan ve BHA ile BHT çözeltilerinden 0,2'şer mL alınarak üzerlerine 5'er mL emülsiyon çözeltisi ilave edilmiştir. Her bir çözelti 40 ^{o}C'de su banyosunda inkübasyona bırakılıp deney tüplerindeki ekstrakt ve kontrol çözeltilerinin absorbansı 470 nm'de kaydedilmiştir. İlk andan (t_0) itibaren inkübasyondaki çözeltilerin absorbansı her 15 dakikada bir 120 dakika boyunca ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerlerinden absorbans değişim oranı (AO) ve buna bağlı olarak antioksidan aktivite (%, oksidasyonu engelleme katsayıları) aşağıda verilen eşitliklere göre hesaplanmıştır.

$$R = \ln(a/b)/120$$

$$AA = \left[\frac{R_{kontrol} - R_{numune}}{R_{kontrol}}\right] x100$$

a: ekstrakt ve kontrolün t= 0 anındaki başlangıç absorbansı, *b*: ekstrakt ve kontrolün t=120. dakikadaki absorbansı ve AA; antioksidan aktivitedir. Her bir analiz 3 kez tekrarlanmıştır.

Bakır indirgeme gücü (CUPRAC):

CUPRAC yöntemi ile bitki ekstraktlarının antoksidan aktivite tayinleri Apak ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu (2006) yönteme göre yapılmıştır. 0,5 mL 0,1 mg

bitki ekstraktına 1 mL 10^{-2} M $CuCl_2$, 1 mL $7{,}5x10^{-3}$ M neokuprein (Nc) ve 1 mL 1 M NH_4Ac eklendikten sonra üzerine toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde 0,6 mL H_2O ilave edilmiştir. Tüpler ağzı kapalı bir şekilde 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra absorbans değerleri 450 nm'de ölçülmüştür. Aynı işlemler 0,05-0,5 mg mL^{-1} konsantrasyon aralığında bir seri çözeltisi hazırlanan troloksa uygulanmış ve konsantrasyon absorbans değerlerine karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Eğri denkleminden her bir bitki ekstraktının troloksa eşdeğer antioksidan kapasiteleri (TEAK mg g^{-1}) hesaplanmıştır. Her bir analiz 3 kez tekrarlanmıştır.

Demir İndirgeme gücü (FRAP):

Bitki ekstraktlarının demir indirgeme gücü Oyaizu (1986) metotu ile tayin edilmiştir. Bitki ekstraktlarının 0,05-0,5 mg mL^{-1} konsantrasyon aralığında çözeltileri hazırlanarak her birinden 2,5 mL alınmış ve üzerine 200 mM 2,5 mL fosfat tamponu ve 2,5 mL %1'lik potasyum ferrosiyonad çözeltisi ilave edilmiştir. Tüpler 45^{o}C'de 20 dakika su banyosunda inkübe edilmiş ve bu süre sonunda her birinin üzerine 2,5 mL %10'luk trikloroasetikasit (TCA) ilave edildikten sonra 700 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst kısımlarından 5'er mL alınıp temiz tüplere aktarılmıştır. Numunelerin her birinin üzerine 5 mL deiyonize su eklenip 1 mL %0,1'lik $FeCl_3$ ilave edildikten sonra oluşan yeşil renkli çözeltilerin absorbansı spekrofotometrede 700 nm ve 450 nm'de ölçülmüştür. Aynı işlemler BHA ve BHT standartlarına uygulanarak sonuçlar ekstraktlarla karşılaştırılmıştır. Aynı işlemler 0,05-0,5 mg mL^{-1} konsantrasyon aralığında bir seri çözeltisi hazırlanan toloksa uygulanmış ve bu çözeltilerin absorbansı 450 nm'de ölçülerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin denkleminden her bir bitki ekstraktının troloksa eşdeğer antioksidan kapasiteleri (TEAK mg g^{-1}) hesaplanmıştır. Her bir analiz 3 kez tekrarlanmıştır.

Metal şelatlama tayini:

Metal şelatlama kapasitesi Que ve arkadaşlarının (2006) geliştirdiği yöntemle tayin edilmiştir. Bitki ekstraktlarının 0,05-0,5 mg mL^{-1} konsantrasyon aralığında çözeltileri hazırlanarak her birinden 1 mL alınmış eşit miktarda metanolle karıştırılmıştır. Üzerine 0,1 mL 2 mM $FeCl_2$ x $4H_2O$ ve 0,2 mL 5 mM ferrozin ilave

edilmiştir. 10 dakika sonra her bir çözeltinin absorbansı 562 nm'de kaydedilmiştir. Metal şelatlama aktivitesi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{AA (\%)} = \left[\frac{A_{boş} - A_{numune}}{A_{boş}} \right] \text{x } 100$$

$A_{\text{boş}}$: kontrolün absorbansı, A_{numune}: ekstraktın absorbansı ve AA: antioksidan aktivitedir. Metot standart olarak rutine de uygulanmıştır. Her bir analiz 3 kez tekrarlanmıştır.

Hidrojen peroksit tayini:

Bitki ekstraktlarının H_2O_2 giderme aktivitesi Benkeblia'nın (2005) metotu uygulanarak tayin edilmiştir. Bu metotta, öncelikle fosfat tamponunda (1 M PBS, pH 7,4) hazırlanan 2 mM H_2O_2 çözeltisinin 230 nm'de absorbansı ölçülmüştür. 0,01–0,5 mg mL^{-1} konsantrasyon aralığında hazırlanan bir seri ekstrakt çözeltilsinden 0,6 mL alınarak üzerine 0,5 mL H_2O_2 çözeltisi ilave edilmiş ve 230 nm'de ortamda kalan H_2O_2'nin absorbansı ölçülmüştür. H_2O_2 giderme aktivitesi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{I (\%)} = \left[\frac{A_{boş} - A_{numune}}{A_{boş}} \right] \text{x } 100$$

A_{numune}: ekstraktın absorbansı, $A_{\text{boş}}$: kontrolün (H_2O_2 ilave edilmeyen ekstrakt) absorbans değeridir. Metot rutin ve kuersetine de uygulanmıştır. Her bir analiz 3 kez tekrarlanmıştır.

5.2.2. Kromatografik analizler

Bu çalışmada gerçekleştirilen kimyasal analizlerden kalitatif ve kantitatif olarak yağ asidi analizleri gaz kromatografisi (GC) ile fenolik madde tayinleri ise yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile gerçekleştirilmiştir.

Yağ asitlerinin GC analizi:

Gaz kromotografik analizleri QP Shimadzu marka, 5050 model ve otomatik injektörlü gaz kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerde 50 metrelik Cp Wax 52 CB kapiller kolon (0,32 mm, 1,2 μm) kullanılmıştır. Gaz kromatografisinde injektör bloğu sıcaklığı 240°C, dedektör bloğu sıcaklığı 250°C olarak ayarlanmıştır. *Gingko biloba* ekstraklarından 0,1-0,2 g alınarak üzerine %5'lik sodyum metoksit ilave edilmiş ve bir gece inkübe edilmiştir. Türevlendirilen numunelerin üzerine 1 mL hekzan ilave edilerek hekzan fazının 1 mikrolitresi cihaza enjekte edilmiştir. Kolona sıcaklık programı uygulanmıştır. Kolonun başlangıç sıcaklığı 60°C'de 4 dakika bekledikten sonra dakikada 13°C'lik artışla 175°C'e çıkarılmıştır. 175°C'de 27 dakika bekletildikten sonra tekrar dakikada 4°C'lik artışla 215°C'ye çıkarılmıştır. Bu sıcaklıkta 5 dakika beklitilmiş ve son olarak 4°C'lik artışla sıcaklık 240°C'ye ulaşmıştır. Bu sıcaklıkta 15 dakika bekletilmiştir. Analizler 75 dakikada tamamlanmıştır. Gaz kromotografisinde taşıyıcı gaz olan helyumun akış hızı 10 psi dk^{-1} olarak ayarlanmıştır. Her bir analiz 3 kez tekrarlanmıştır.

Fenolik bileşiklerin HPLC analizi:

Çalışmada kullanılan standart fenolik maddeler, gallik asit, kateşin, kafeik asit, epikateşin, p-kumarik asit, ferulik asit, viteksin, rutin, naringin, hesperidin, rosmarinik asit, eriodiktiol, kuersetin, naringenin, apigenin ve karvakrol Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Analizde kullanılan cihaz DAD dedektörlü (□max: 278), SCL-10Avp sistem kontrolörlü ve SIL-10AD vp otosampler ve LC-10Advp pompa sistemine sahip Shimadzu marka yüksek performanslı sıvı kromatografisidir. Kolon ise Agilent Eclipse XDB (240x4,60 mm, 5 μm) markadır.

Ginkgo biloba ekstraklarındaki fenolik bileşiklerin HPLC analizi için öncelikle 15 farklı fenolik bileşik için ayrı ayrı kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Numunelerden ise 20 mg tartılıp 1 mL metanol, aseton ve hekzan'da çözüldükten sonra, çözeltinin 20 mikrolitresi HPLC'ye enjekte edilmiştir. Mobil faz olarak iki farklı çözücü kullanılmıştır. A: %3 asetik asit, B: metanol, akış hızı: 0,8 $mLdk^{-1}$ ve kolon sıcaklığı 30°C'dir. Öncelikle standart fenolik maddelerin enjeksiyonu yapılmıştır. Daha sonra elde edilen standart kromatograma bağlı olarak numune

injeksiyonları yapılmıştır. Analiz 75 dakikada gerçekleştirilmiş ve sonuçlar $\mu g g^{-1}$ olarak %95 güven aralığı ile verilmiştir. Her bir analiz 3 kez tekrarlanmıştır.

5.2.3. Moleküler analizler

Bitki materyali:

Bu çalışmada bitki materyali olarak kullanılan ve tıbbi önemi olan Ginkgoaceae familyasından *Ginkgo biloba,* dünyada yaşayan en eski ağaç türü olarak bilinmektedir. Bitkinin orijinine yani yetiştiği coğrafi bölgeye bağlı olarak filogenetik ilişki (Almanya ve Türkiye genotipleri için orijine bağlı olarak gelişen varyasyonları ve akrabalık ilişkilerinin tanımlanması) bir moleküler markır olan RAPD tekniği ile tesbit edilmiştir. Bu amaçla DNA izolasyonu Antalya Orman İşletmesi Bahçesi'nden temin edilen *Ginkgo biloba* ağacının kuru ve yaş yaprakları ile Mine Flora adlı firmadan temin edilen Almanya orijinli *Ginkgo biloba* fidelerinin taze yapraklarından yapılmıştır.

Moleküler materyal:

RAPD-PCR tekniği, moleküler markır tekniklerinden biridir. Bitki sistematiği amaçlı yapılan çalışmalarda RAPD-PCR'dan elde edilen verilerin filogenetik analizi farklı metotların kullanıldığı değişik bilgisayar programlarıyla değerlendirilmektedir. Bu çalışmada moleküler çalışmalarda sıklıkla kullanılan UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Aritmetic Means) ve NJ (Neighbor-Joining), analizleri kullanılarak filogenetik analizler yapılmıştır. Bu amaçla DNA'nın çoğaltılması için OPA1-OPA20 olmak üzere toplam 20 farklı RAPD primeri kullanılmıştır. Bu primerlerin adları ve baz dizilimleri Çizelge 5.4'te verilmiştir. Primerler G+C içerigi %60-70 olacak şekilde seçilerek RAPD primerleri, sentetik olarak İnvitrogen firmasına sentezlettirilmiştir. 10 nükleotid uzunluğunda stok primerler derin dondurucuda (-20ºC) saklanmış ve stok primerlerden rutin çalışmalarda kullanmak üzere çalışma primerleri hazırlanmıştır.

Genomik DNA izolasyonu:

Bitkilerin moleküler düzeyde tanımlanması amacıyla kullanılan tüm moleküler teknikler DNA izolasyonuna dayanır. Bu çalışmada DNA izolasyonları

yaş, kuru ve kurutulmuş *Ginkgo biloba* yapraklarından hem manuel olarak hem de DNA izolasyon kitlerine dayalı olarak çalışan otomatik EZ1 Nükleik Asit İzolasyon cihazı (QIAGEN) ile gerçekleştirilmiştir. Metotlara ilişkin ayrıntılı bilgi aşağıda verilmiştir.

Çizelge 5. 4. RAPD analizlerinde kullanılan primerler ve baz dizilimleri

Primer no	Primer sekansı	Primer no	Primer sekansı
OPA-1	5'-CAGGCCCTTC-3'	**OPA-11**	5'-CAATCGCCGT-3'
OPA-2	5'-TGCCGAGCTG-3'	**OPA-12**	5'-TCGGCGATAG-3'
OPA-3	5'-AGTCAGCCAC-3'	**OPA-13**	5'-CAGCACCCAC-3'
OPA-4	5'-AATCGGGCTG-3'	**OPA-14**	5'-TCTGTGCTGG-3'
OPA-5	5'-AGGGGTCTTG-3'	**OPA-15**	5'-TTCCGAACCC-3'
OPA-6	5'-GGTCCCTGAC-3'	**OPA-16**	5'-AGCCAGCGAA-3'
OPA-7	5'-GAAACGGGTG-3'	**OPA-17**	5'-GACCGCTTGT-3'
OPA-8	5'-GTGACGTAGG-3'	**OPA-18**	5'-AGGTGACCGT-3'
OPA-9	5'-GGGTAACGCC-3'	**OPA-19**	5'-CAAACGTCGG-3'
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'	**OPA-20**	5'-GTTGCGATCC-3'

Manuel DNA izolasyon metotu:

Manuel olarak yapılan yöntemle DNA izolasyonu yaş yapraklardan gerçekleştirilmiştir. RAPD-PCR analizlerine uygun miktar ve saflıkta DNA elde edebilmek amacıyla Doyle ve Doyle'un (1987) geliştirmiş olduğu yöntem bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Yöntemde yapılan değişiklikler, elde edilen DNA miktarının korunarak PCR aşamasında enzim ve primer aktivitesini engelleyen ikincil bileşiklerin ve polisakkaritlerim tamamen uzaklaştırılması amacıyla yapılmıştır. 2 aşamalı yürütülen DNA izolasyonun aşamaları aşağıda ayrıntıları ile verilmiştir.

I. Aşama:

1. -80ºC'de muhafaza edilen dondurulmuş taze *Ginkgo biloba* yaprak eksplantlarından 500 mg'ı tartılarak sterilize edilmiş porselen havan içerisinde sıvı azot yardımıyla öğütülmüş ve tüpe aktarılmıştır.
2. Öğütülen yaprak üzerine 1,5 mL 1xCTAB (%1) izolasyon tamponu eklenip, oluşan heterojen çözeltiye 3 µL β-merkaptoetanol eklenmiştir.
3. Reaksiyon tüpü 65ºC'deki su banyosunda periyodik olarak karıştırılarak 1-2 saat beklemeye bırakılmıştır.
4. Bu süre sonunda su banyosundan çıkarılan tampon içerisine, 1 mL kloroform:izoamilalkol (24/1, v/v) eklenmiş ve 50-100 kez çalkalanarak 6000 rpm hızda 15 dakika santrifüjlenmiştir.
5. Üst faz yeni bir tüpe aktarılıp üzerine 1 mL 2-propanol (-20ºC) eklenerek DNA'nın çökmesi sağlanmıştır. Daha sonra propanol uzaklaştırılıp DNA üzerine %76'lık etil alkol ilave edilmiştir.
6. Son çözelti 6000 rpm hızda 8 dakika santrifüjlenmiş ve içerisindeki %76'lık etil alkol dökülmüştür. Alkol tamamen uçuncaya kadar tüp kurumaya bırakılmış ve kurumanın ardından, tüpün dibinde kalan DNA 0,5 mL TE tamponu içerisinde çözülmüştür.

II. Aşama:

1. TE'de bulunan DNA üzerine tekrar 0,5 mL 1xCTAB izolasyon tamponu eklenmiş ve 65ºC su banyosunda periyodik olarak karıştırılarak, 30 dakika beklemeye bırakılmıştır.
2. Su banyosundan alınan tüplerin içerisine 0,5 mL kloroform: izoamilalkol (24/1, v/v) eklenmiş ve 50-100 kez çalkalanarak 13500 rpm hızda 5 dakika santrifüjlenmiştir.
3. DNA içeren üst faz yeni tüpe alınmış ve üzerine 1 mL 2-propanol eklenerek DNA çöktürülmüştür.
4. 11000 rpm hızda 5 dakika santrifüjlenmiş ve üzerindeki alkol dökülerek tüp kurumaya bırakılmıştır.
5. Kurumanın ardından tüp dibinde kalan DNA önce 0,7 mL %70'lik soğuk (-20ºC) etil alkolle yıkanmış ve 13500 rpm hızda, 5 dakika santrifüjlenmiştir.

6. Alkol dökülerek 0,7 mL %96'lık soğuk (-20ºC) etil alkol eklenmiş ve 13500 rpm hızda 5 dakika santrifüjlendikten sonra alkol dökülerek tüp kurumaya bırakılmıştır.
7. Alkol tamamen uçtuktan sonra, DNA 200-300 µL TE tamponu içerisinde çözülüp DNA üzerinde kalan RNA'ları uzaklaştırmak amacıyla 4 µL RNaz (20 μgmL^{-1}) eklenerek tüpler -20°C'de saklanmıştır.

Otomatik DNA izolasyon yöntemi:

*Ginkgo biloba'*nın taze, kuru ve kurutulmuş yapraklarından kaliteli ve yüksek miktarda DNA izolasyonu kite dayalı nükleik asit izolasyon cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla sıvı azotta parçalanan 30 mg taze, kuru ve kurutulmuş yaprak eksplantlarına cihaz kitinin prokolüne uygun olarak 190 µL G2 tamponu ilave edilmiş ve kuru, yaş ve kurutulmuş yapraklar 18 saat 56°C'de inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda inkübasyondan alınan tüpler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı alınmıştır. Bu kısımdan DNA izolasyonu 20 dakikada Qiagen doku kartı ve doku kiti ile EZ1 otomatik DNA izolasyon cihazında (QIAGEN) gerçekleştirilmiştir (Vural, 2009; Maltas ve ark., 2011).

DNA konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi:

Ginkgo biloba yapraklarından manuel ve otomatik olarak izole edilen DNA'nın kalite ve konsantrasyonunun belirlenmesi, sonraki aşamalarda gerçekleştirilecek olan polimeraz zincir reaksiyonu için son derece önemlidir. Bu nedenle DNA'nın çoğaltılması işleminde DNA konsantrasyonunun optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla izole edilen DNA'ya spektrofotometrik yöntem ve agaroz jel elektroforez yöntemi uygulanmıştır.

Elektroforetik yöntemler:

DNA ya da PCR ürünlerinin jelde görüntülenmesi amacıyla agaroz jeli agarozun Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponunda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Agaroz konsantrasyonu %1-2 (w/v) arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanmıştır. Böylece, küçük DNA fragmentleri için yüksek, büyük DNA fragmentleri için düşük agaroz konsantrasyonu kullanılarak DNA'nın jelde uygun şekilde yürümesi sağlanmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu uygulanmadan önce izole edilen genomik DNA'nın konsantrasyonunun ayarlanması gerekmektedir. Bunun için %1'lik DNA jeli hazırlanmıştır. %1'lik DNA jeli için, 1 gr agaroz tartılıp 100 mL 1xTAE tamponu içinde mikrodalga fırında eritilmiştir. Tampon sıcaklığının yaklaşık 55-50°C'ye düşmesi beklenmiş, sonra agaroz çözeltisi elektroforez tankının tepsisine dökülmüş ve uygun taraklar yerleştirilmiştir. 15-20 dakika sonra donan jelin tarakları çıkarılarak her bir kuyucuğa 10 µL TAE buffer (1xTAE), 5 µL genomik DNA ve 5 µL boyama tamponu yüklenmiştir. Son kuyucuğa ise, 10 µL 100 bp (bç) DNA markırı yüklenerek agaroz jele akım uygulanmıştır. Bunun için jelde yüklü olan DNA'lar 100V ve 50 mA'de TAE tamponunda 1-1,5 saat elektroforez cihazında (BioRad) yürütülmüş ve daha sonra önceden hazırlanmış olan EtBr ile 15 dakika boyandıktan sonra steril saf suda 30 dakika bekletilmiştir. Jel UV Transliminatörde görüntülenerek fotoğraflanıp jeldeki bantların parlaklıklarına göre izolasyondan elde edilen DNA'ların saflığı ve konsantrasyonu değerlendirilmiştir. Agaroz jel ve spektrofotometre okumaları sonucunda elde edilen verilerden yararlanılarak, DNA izolatları son konsantrasyonu 50 ng μL^{-1} olacak şekilde TE tamponu ile seyreltilmiş ve daha sonraki analizler için -20°C'de derin dondurucuda kullanım zamanına kadar saklanmıştır. PCR ürünleri için ise %2'lik agaroz jeli hazırlanmıştır.

Spektrofotometrik yöntemler:

Çalışmada absorbsiyon ölçümleri için UV-Spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. DNA konsantrasyonunu ayarlamak için Tris-asetik asit-EDTA (TAE) tamponu ile uygun seyreltmeler yapılarak her birinin absorbansı DNA'nın miktar ve saflığını belirlemek için 230, 260, 280 ve 320 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Bitkiden genomik DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA'ların miktar ve kalitesi optik densite (OD) yardımıyla kontrol edilmiştir. 260 (OD_{260}) ve 280 nm (OD_{280}) optik densite değerleri bu dalga boylarında spektrofotometrede absorbans okumaları ile hesaplanmış ve absorbansların birbirine oranları kullanılarak DNA miktar ve saflıkları belirlenmiştir.

5.2.4. RAPD-PCR metotu

Standart RAPD-PCR tekniği, primer olarak rasgele seçilmiş 10 baz uzunluğunda kısa oligonükleotidlerle nanogram miktarlarda genomik DNA'nın

polimeraz zincir reaksiyonu yardımıyla çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Bu nedenle hem polimeraz zincir reaksiyonunun temel bileşenleri olan kimyasal ve biyokimyasal yapıların konsantrasyonlarının optimizasyonu hem de DNA'nın çoğaltılması için gereken sıcaklık dereceleri optimize edilerek DNA'nın 20 adet primerle uygun koşullarda çoğaltılmasına ilişkin parametreler belirlenmiştir.

PCR Koşullarının Optimizasyonu:

DNA'nın çeşitli biyomoleküllerle in vitro çoğaltılması amacıyla gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık gradienti uygulamasına dayanır. Çift iplikçikli kalıp DNA'nın açılarak tek iplikler haline gelmesi, primerin tek iplikçik üzerindeki komplementer bölgelere bağlanması ve Taq DNA polimeraz enziminin kalıp DNA'nın bağlandığı tek iplikli DNA bölgesinde ardarda deoksiribonükleosit trifosfatların bağlaması farklı sıcaklık ve sürelerde gerçekleşmektedir. Bu nedenle her bir aşamadaki gerekli sıcaklık ve süreler ayrı ayrı optimize edilmiştir. Ancak daha önce yapılan çalışmalar bu optimizasyonda referans alınarak PCR koşullarının optimizasyonunu kolaylaştırmıştır (Youssef ve ark., 2007). Örneğin, DNA çift iplikçiği en kolay 94-95°C'de açılmakta ve Taq DNA polimeraz enzimi ise 70-72°C'de yüksek enzim aktivitesi göstererek nükleotidleri komplementeri olan bölgelere bağlamaktadır. Optimizasyonda en önemli basamak olan farklı nükleotid dizilerinden oluşan primerleri tek iplikçikli DNA'ya bağlanması ise RAPD primerlerinin 10 nükleotitten oluşması nedeniyle düşük sıcaklıkta gerçekleşmektedir. Bu bağlanmalar ise genellikle 30-40^{o}C arasında meydana gelmektedir. Bu bağlanma sıcaklıklarının tespitinde primerin Tm sıcaklığı ön bilgi sağlar. Primerler genellikle DNA tek iplikçiğine reaksiyon şartlarına bağlı olarak Tm değerinin 2-3°C üzerinde bağlanırlar. Yine RAPD-PCR da polimorfizm dolayısıyla olası PCR ürünlerinin fazla olması döngü sayısı ile doğrudan ilşkilidir.

Genomik DNA'nın oligonükleotid primerler kullanılarak çoğaltılması yalnızca PCR koşullarına bağlı değildir. Reaksiyon koşullarına karşı da oldukça duyarlıdır. Hedef DNA'nın konsantrasyonu, primer, Mg^{2+}, nükleotid trifosfatların miktarı, Taq DNA polimeraz aktivitesi ile DNA kalitesi DNA çoğaltılımını etkiler. Bundan dolayı tüm parametreler her bir primer için optimize ayrı ayrı edilmiştir. PCR reaksiyonu için hazırlanan reaksiyon tamponun içeriği ve deneme sıcaklık aralıkları Çizelge 5.5'te verilmiştir. Her bir DNA molekülünün Çizelge 5.6'da

verilen sıcaklık koşullarında her bir primer için her bir reaksiyon bileşenin konsantrasyonu ayrı ayrı optimize edilmiştir.

Çizelge 5.5. PCR reaksiyon tamponu

Reaksiyon bileşimi (µL)	**Metot 1**[a]	**Metot 2**[b]
10 X Tampon	2,5	2,5
$MgCl_2$	2	2
dNTP	1,5	1,5
Tap Polimeraz	1	1
DNA	1,8	2,5
Primer	1,2	1,2
Su	5	4,3
Toplam Hacim	15	15

[a]Metot 1, hem Türkiye hem de Almanya orijinli yaş yapraklardan izole edilen DNA'nın çoğaltılmasına ilişkin metottur.
[b]Metot 2, Türkiye orijinli kuru ve kurutulmuş yapraklardan izole edilen DNA'nın çoğaltılmasına ilişkin metottur.

DNA konsantrasyonu:

Farklı ülkelerden temin edilen her bir *Ginkgo biloba* yaprağından izole edilen DNA çözeltilerinin konsatrasyonları UV Spektrofotometre ile ölçülen miktarlarına bağlı olarak gerekli seyreltmeler yapılarak ayarlanmıştır. Her bir DNA çözeltisinden 25 µL'lik reaksiyon karışımına 2-6 µL aralığında ilave edilerek ayrı ayrı çalışılmış ve elde edilen PCR ürünlerinin kalitesi jel görüntüleri değerlendirilerek her biri için en uygun DNA konsantrasyonu belirlenmiştir.

Deoksiribonükleosit trifosfatların (dNTP) konsantrasyonunun belirlenmesi:

Bu çalışmada deoksiribonükleosit tri fosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halinde ticari olarak temin edilmiştir. PCR'ın spesifikliği ve doğruluğu için her bir dNTP'den eşit miktarda ve pek çok çalışmada en uygun konsantrasyon olan 1,5 mM dNTP konsantrasyonu kullanılmıştır. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda bu çalışmada pH 7,0

olan 100 mM'lık her bir dNTP'den eşit miktarda (25 mM) alınarak bir karışım hazırlanarak reaksiyon başına 1,5 µL dNTP (Fermantase) kullanılmıştır.

Magnezyum klorür ($MgCl_2$) konsantrasyonu:

Taq polimeraz enzim aktivitesinde kofaktör olarak rol oynayan Magnezyum konsantrasyonu PCR'da oldukça önemlidir. PCR'da Mg^{+2} miktarı 0,5-2,5 mM arasında olmalıdır. Bu çalışmada ticari olarak satılan 25 mM $MgCl_2$ (Fermantase) bulunan stok çözeltiden reaksiyon başına 2,0-2,5 µL $MgCl_2$ kullanılarak optimum konsantrasyon belirlenmiştir.

Çizelge 5.6. PCR sıcaklık koşulları

Basamak	Sıcaklık-süre	Metot 1[a]	Metot 2[b]
1. Basamak	Sıcaklık-süre	94ºC- 4 dk	94ºC- 4 dk
	Döngü	1	1
2. Basamak	Sıcaklık-süre	94ºC- 2 dk 36ºC- 1 dk 72ºC- 2 dk	94ºC- 2 dk 38ºC- 1 dk 72ºC- 2 dk
	Döngü	45	45
3. Basamak	Sıcaklık-süre	72ºC- 4 dk	72ºC- 4 dk
	Döngü	1	1
4. Basamak	Sıcaklık	4ºC	4ºC
	Döngü	∞	∞

[a]Metot 1, hem Türkiye hem de Almanya orijinli yaş yapraklardan izole edilen DNA'nın çoğaltılmasına ilişkin metottur.
[b]Metot 2, Türkiye orijinli kuru ve kurutulmuş yapraklardan izole edilen DNA'nın çoğaltılmasına ilişkin metottur.

Polimeraz tamponu:

PCR çalışmalarında kullanılan tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tamponlardır. Taq polimeraz enziminin 10x tampon çözeltisinin içeriği; 50 mM Tris-HCI (pH 8,0), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, %50 gliserol ve %1 TritonX-100'dür. Bu çalışmada kullanılan

10x tampon Fermantase firmasından Taq DNA polimeraz enzimi ile birlikte temin edilmiş olup reaksiyon başına 2,5 µL kullanılmıştır.

Enzim konsantrasyonu:

Bu çalışmada Taq DNA polimeraz enzim miktarını optimize etmek için 0,5-0,1 U (Fermantase 5UμL^{-1}) arasındaki enzim konsantrasyonları denenmiştir.

Primer seçimi ve konsantrasyonu:

20 farklı primer İontek firmasına sentezlettirilmiş ve katı olarak temin edilmiştir. PCR reaksiyonunda DNA'nın çoğaltılması için kullanılacak olan 20 adet primerin her birinden öncelikle 100 pmol mL^{-1} stok çözeltilerden hazırlanmıştır. Daha sonra her bir primerden 2-5 µL aralığında (4-20 pmol mL^{-1}) PCR karışımına ilave edilerek DNA her bir primerle ayrı ayrı çoğaltılmıştır. Elde edilen jel görüntülerinden optimum primer konsantrasyonları belirlenmiştir.

5.2.5. İstatistiksel analiz

Kimyasal çalışmalara yönelik istatistiksel analizler OriginPro 7.5 (OriginLab Corp., Northampton, MA) programı ile tek yönlü (One way) ANOVA uygulanarak Tukey testi ile p değeri 0,05'ten küçük alınarak yapılmıştır. Moleküler analizlerin değerlendirilmesine ilşkin genetik benzerlik ve uzaklıklar ise Nei (1979)'ye göre POPGENE (Yeh ve ark., 1997) programı kullanılarak hesaplanmıştır.

6. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

6.1. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Ginkgo biloba yapraklarının antioksidan kapasitesini belirlemek amacıyla üç farklı çözücüde ekstraksiyonları yapılmıştır. Bu çözücülerden metanol ve aseton polar ve hekzan ise apolar yapıdadır. Aynı ekstraksiyon şartlarında gerçekleştirilen ekstraksiyonların verimleri araştırılıp Çizelge 6.1'de gösterilmiştir. Metanolik ekstrakt veriminin diğer ekstrakt verimlerinden daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 6.1. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının farklı çözücülerdeki yüzde verimleri

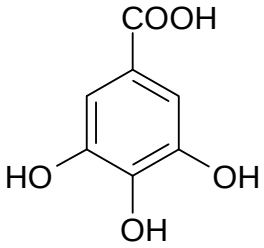
Ekstrakt	Metanol ekstraktı*	Aseton ekstraktı*	Hekzan ekstraktı*
Verim, %	17,6± 3,21	7,8±1,32	6,2±1,45

***** 3 analizin ortalaması ve bu analize ait standart sapma

6.1.1. Toplam fenolik madde tayini

Bitkilerin antioksidan özellik taşımalarının başlıca sebeplerinden biri bünyelerinde ihtiva ettikleri fenolik bileşiklerdir. Fenolik gruplar -OH grubunca zengindir. OH grubu bunlara polar olma özelliği katar. Bununla birlikte fenol grubu elektron delokalizasyonu nedeniyle serbest radikal elektronunu üzerinde tutarak kendileri serbest radikallerden daha kararlı radikaller oluşturur. Böylece antioksidan özellik kazanırlar. Antioksidan özellik gösteren yapılar üzerinde yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklerin lipit peroksidasyonunun stabilize edilmesinde önemli etkileri olduğu saptanmıştır (Kartal ve ark., 2007). Fenolik bileşik ihtiva eden gıdalarla beslenmenin kalp rahatsızlığı riskini azalttığı gibi arterosklerosisi de yavaşlattığı bazı çalışmalarla tespit edilmiştir (Halliwell ve Guttridge, 1989a; Stampfer ve ark., 2000; Vaya ve Aviram, 2001; Wada ve Ou, 2002).

Toplam fenolik madde tayini için kullanılan Folin yöntemi, Folin reaktifinin (Fosfo-Molibdo-tungstat, $(PMoW_{11}O_{40})^{-4}$) ihtiva ettiği Mo(VI)'nın ortamda bulunan indirgeyici ajanlar tarafından Mo(V)'e indirgenmesi esasına dayanmaktadır. İndirgenme reaksiyonu sonucu oluşan mavi-sarı renk 765 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (Singleton ve Rossi, 1965).



Şekil 6.1. Gallik asidin molekül yapısı

$$Mo^{+6}\ (sarı) + e^{-} \longrightarrow Mo^{+5}\ (mavi)$$

Fenolik maddeler sodyum karbonat kullanılarak bazikleştirilen reaksiyon ortamında dissosiye olur.

$$Ar\text{-}OH \rightleftharpoons Ar\text{-}O^{-} + H^{+}$$

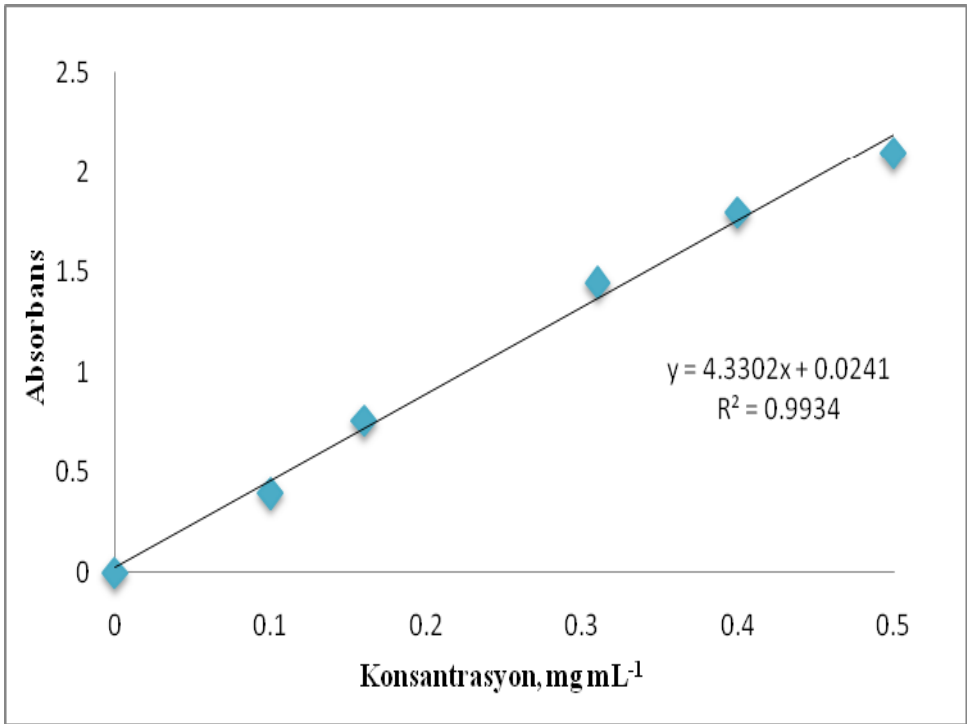
Çoğu antioksidan madde folin reaktifinin çalışma pH'larında protonunu vermiş olacağından toplam antioksidan kapasitenin, fizyolojik pH'larda gerçekleşen değerinin üzerinde hesaplanma olasılığı vardır (Ak, 2006).

Toplam fenolik madde miktarlarını belirlemek amacıyla tüm *Ginkgo biloba* ekstraktlarına Folin yöntemi uygulanarak her bir ekstraktta bulunan fenolik bileşikler Şekil 6.1'de yapısı verilen gallik asidin kalibrasyonundan gallik aside eşdeğer (GAE) olarak bulunmuştur (Şekil 6.2). Sonuçlar Çizelge 6.2'de verilerek her bir çözücü için ekstrakt içerisinde bulunan gallik aside eşdeğer toplam fenolik madde miktarıları Şekil 6.3'te karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak en fazla fenolik madde ihtiva eden *Ginkgo biloba* ekstraktının metanol ekstraktı olduğu ve sırasıyla *Ginkgo biloba*'nın aseton ekstraktının toplam fenolik madde miktarının metanol ekstraktından daha az iken hekzan ekstraktından yüksek olduğu gözlenmiştir.

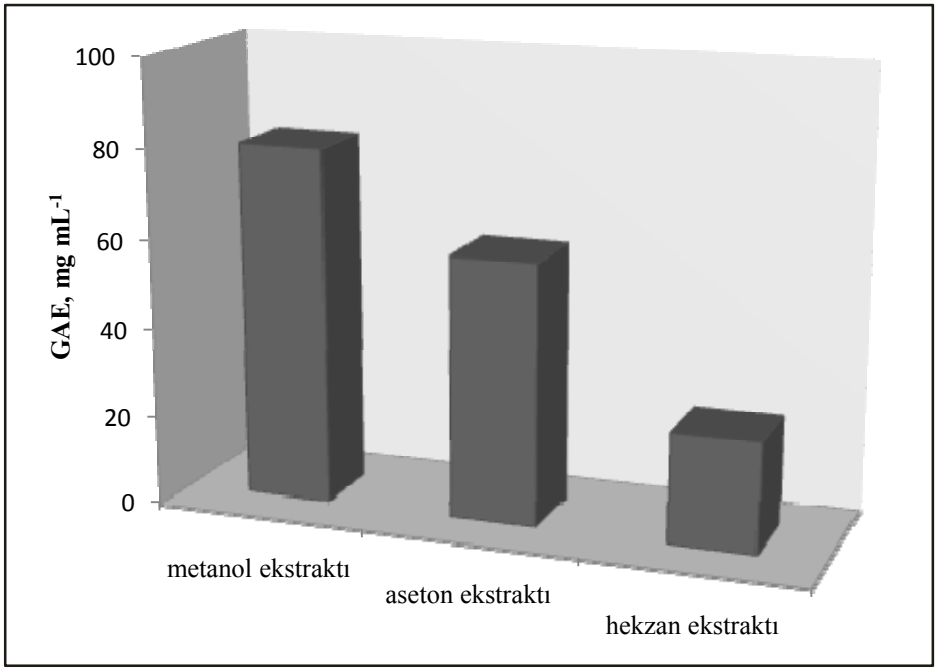
Çizelge 6.2. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının gallik aside eşdeğer (GAE) toplam fenolik madde miktarı

Ekstrakt	**Metanol ekstraktı**[1]*	**Aseton ekstraktı**[1]*	**Hekzan ekstraktı**[1]*
GAE (mg g^{-1})	76,0±2,2	59,4±1,6	27,6±3,1

* 3 analizin ortalaması ve bu analize ait standart sapma
[1]Gallik aside eşdeğer (GAE) toplam fenolik madde miktarı



Şekil 6.2. Gallik asidin 0,1-0,5 mg mL^{-1} konsantrasyon aralığındaki kalibrasyon eğrisi



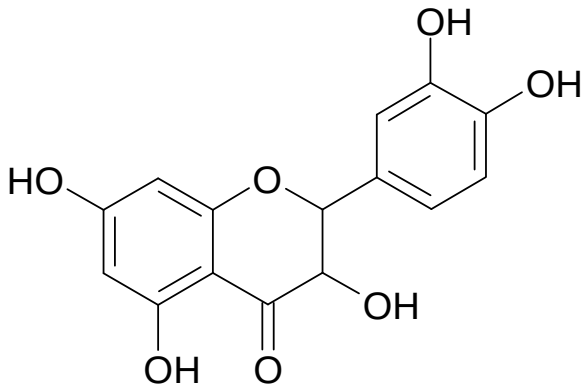
Şekil 6.3. *Ginkgo biloba* ekstraktlarındaki gallik aside eşdeğer toplam fenolik madde miktarlarının karşılaştırılmasına ilişkin grafik

Kumarin, tannin, antosiyanidin, rosmarinik asit, kafeik asit, gallik asit ve rutin gibi bazı fenolik bileşiklerin antioksidan kapasiteleri üzerine yapılan çalışmalarda serbest radikalleri süpürdükleri kanıtlanmıştır (Wada ve Ou, 2002; Javanmardi ve ark., 2003; Soong ve Barlow, 2004; Thippeswamy ve Naidu, 2005). Sonuç olarak bitkilerin sahip olduğu antioksidan kapasite miktarı ihtiva ettiği fenolik maddelerin miktarı ile doğru orantılıdır. Tüm bu fenolik bileşikleri kalitatif ve kantitatif olarak ayrı ayrı belirlemek oldukça zordur. Bu nedenle bitkilerin ihtiva ettikleri toplam fenolik madde miktarını belirlemek antioksidan özellikleri hakkında doğru, pratik ve ekonomik olarak bilgi edinmek için yeterlidir.

6.1.2. Toplam flavonoid madde tayini

Flavonoidler, fenolik bileşiklerin en önemli grubundandır. Bitkilerde bulunan flavonoid bileşimi fenolik maddelere benzer şekilde bitkinin antioksidan özelliğinin artmasına katkıda bulunur. Kuersetin, rutin, kateşin, epikateşin ve kurkumin gibi bazı flavonoidlerin serbest radikalleri süpürdüğü standart madde ve bitki ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri üzerine yapılan pek çok çalışma ile kanıtlanmıştır (Schittkoa ve ark., 1999; Chu ve ark., 2000; Trichopoulou, 2000; Herna´ndez ve ark., 2000; Kim ve ark., 2003; Pourmorad ve ark., 2006).

Ginkgo biloba ekstraktlarında bulunan flavonoid madde miktarını belirlemek amacıyla flavonoidlerin aluminyum ile kompleksleri oluşturarak 415 nm'de vermiş oldukları absorbansdan her bir ekstrakktaki toplam flavonoid madde miktarları belirlenmiştir (Ebrahimzadeh ve ark., 2008). Bu amaçla Şekil 6.4'te yapısı verilen kuersetinin aluminyumla kompleksleşmesine dayanan reaksiyonda farklı kuersetin konsantrasyonlarında aluminyum ile verdiği komplekslerin absorbsiyonları 415 nm'de okunarak Şekil 6.5'te kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Aynı metot bitki ekstraktlarına da uygulanarak her bir ekstraktta kursetine eşdeğer olarak bulunan toplam flavonoid madde miktarları Çizelge 6.3'te verilmiştir. Şekil 6.6'da karşılaştırılan sonuçlar *Ginkgo biloba'*nın en yüksek flavonoid miktarı yine metanolde olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte aseton metanolden düşük ve hekzandan ise yüksek miktarda flavonoid madde içermektedir.

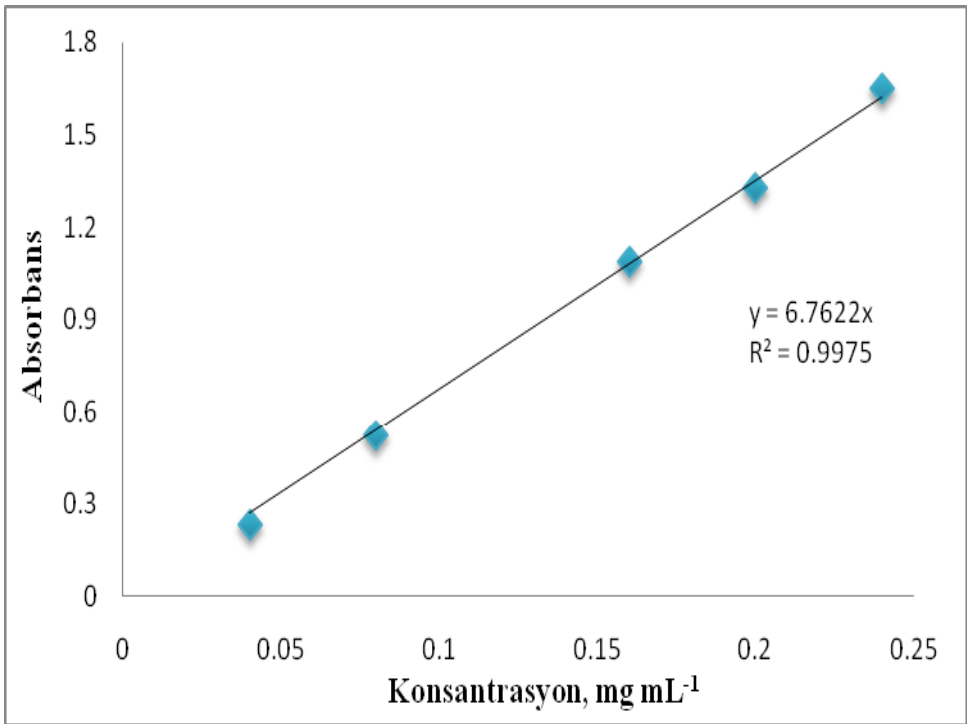


Şekil 6.4. Kuersetinin molekül yapısı

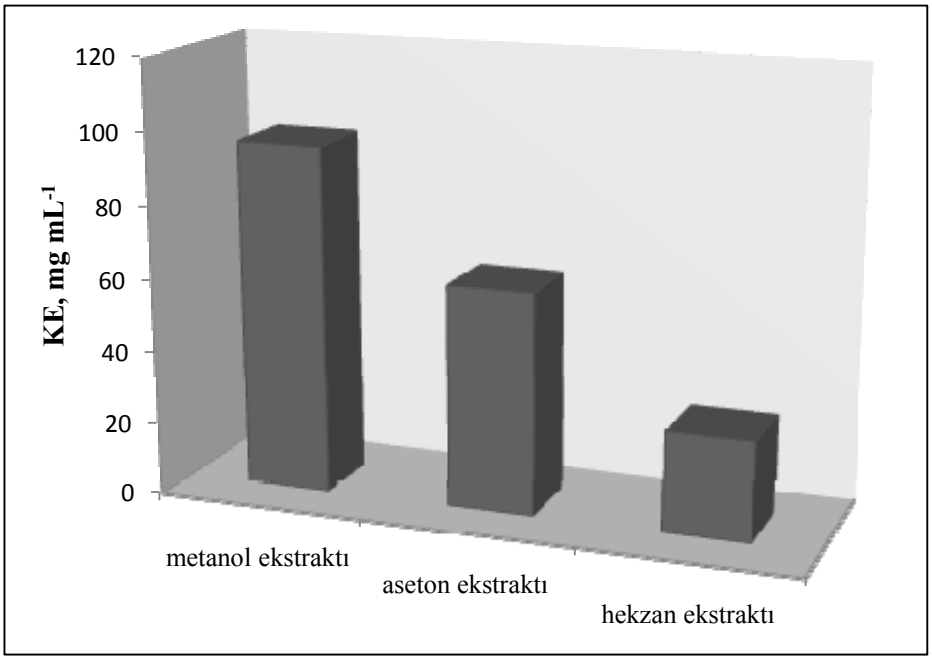
Çizelge 6.3. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının kuersetine eşdeğer toplam flavonoid madde miktarı

Ekstrakt	Metanol ekstraktı[1,*]	Aseton ekstraktı[1,*]	Hekzan ekstraktı[1,*]
KE (mg g^{-1})	98,15±4,31	28,30±1,13	60,95±1,76

***** 3 analizin ortalaması ve bu analize ait standart sapma
[1] Kuersetine eşdeğer (KE) toplam flavonoid madde miktarı



Şekil 6.5. Kuersetinin 0,05-0,25 mg mL^{-1} konsantrasyon aralığındaki kalibrasyon eğrisi



Şekil 6.6. *Ginkgo biloba* ekstraktlarındaki kuersetine eşdeğer toplam flavonoid madde miktarlarının karşılaştırılmasına ilişkin grafik

Son yıllarda özellikle hakkında en çok araştırma yapılan doğal antioksidan gruplarından biri olan flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit (O_2•$^-$), lipit alkoksil (RO•) ve peroksit (ROO•), nitrik oksit (NO•) radikal temizleme, demir ve bakır şelatlama, α-tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatatör, immünstimülan, antiallerjik, östrojenik, antiviral (HSV, HIV, infuenza ve virüslere karşı) etkileri de sözkonusudur (Vaya ve Aviram, 2001; Wada ve Ou, 2002). Flavonoidlerin diğer bir önemli grubu ise flavonollerdir. Bunların başlıcası pek çok sebze ve deniz yosunundan elde edilen kuersetindir. Kuersetin çok güçlü bir antioksidan olup, bu antioksidanın yemek borusu, mide ve deri kanseri gibi birçok hastalıklara karşı koruyucu, kolesterolü düşürücü, pıhtılaşmayı azaltıcı, kalp ve damar sistemi hastalıklarını önleyici etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Neuhouser, 2004; Edwards ve ark., 2007; Egert, 2009; http://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin).

6.1.3. DPPH serbest radikal süpürme etkisi

Uzun ömürlü bir azot radikali olan DPPH• radikali bitki ekstraktlarının ya da gıda katkı maddelerinin antioksidan aktivitelerini belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır (Katalinic ve ark., 2004). Bir azot radikali olan DPPH'in alkol ya da

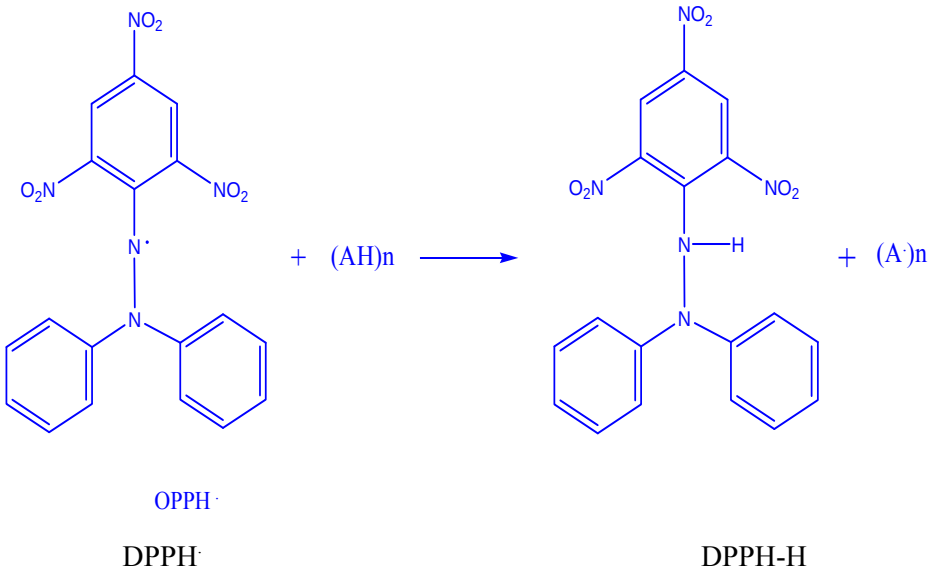
sudaki çözeltisi 517 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Bununla birlikte H verici bir madde varlığında aşağıdaki reaksiyonu vererek protonlanmakta (indirgenmekte) ve radikal olmayan bir yapıya dönüşmektedir. Bu dönüşüm mor renkli DPPH çözeltisinin renginin açılmasıyla da gözlenmektedir. DPPH radikalinin 517 nm'de vermiş olduğu absorbans değeri ortamda bulunan H konsantrasyonuna bağlı olarak düşürmektedir.

Şekil 6.7'de verilen reaksiyonda gösterildiği gibi radikal gideren antioksidan veya antiradikal türlerin $(AH)_n$ varlığında DPPH• radikali DPPH-H formuna dönüşmektedir. Ancak basit olmasına karşın DPPH• yönteminin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Birçok antioksidan bileşik, lipit peroksidasyonunda rol oynayan peroksil radikalleri ile çok hızlı tepkime verirken DPPH• radikali ile yavaş tepkime vermektedir.

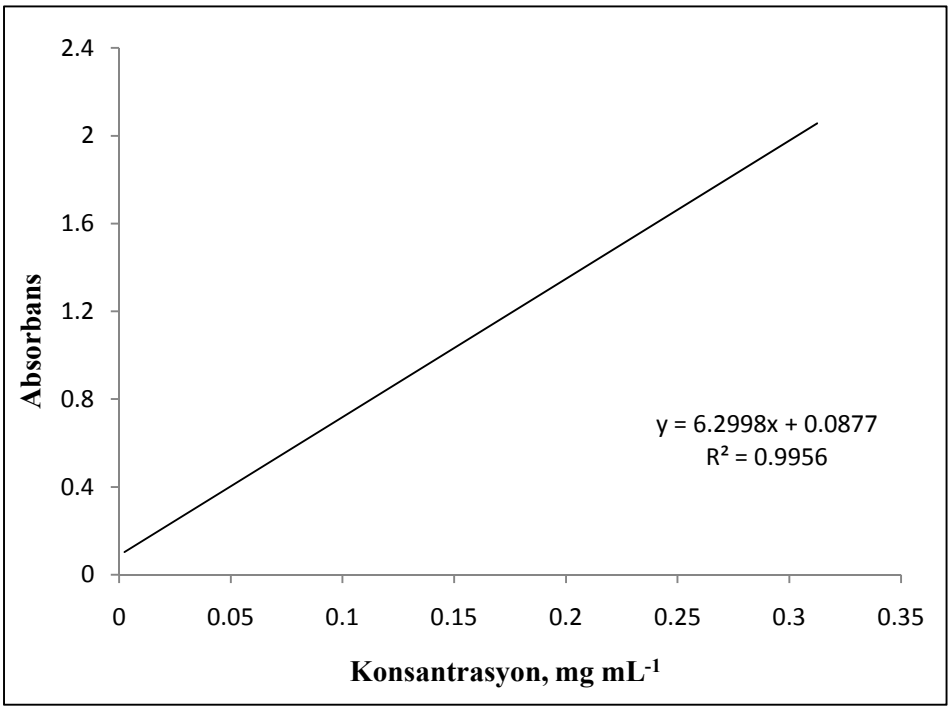
Çizelge 6.4. *Ginkgo biloba* ekstraktları ile sentetik antioksidanların (BHA ve BHT) DPPH serbest radikalini giderme aktivitelerine ilişkin inhibisyon (%) değerleri

Ekstrakt	Metanol ekstraktı*	Aseton ekstraktı*	Hekzan ekstraktı*	BHA	BHT
İnhibisyon (%)	85,0±3,0	30,5±1,8	31,2±3,2	98,1±0,6	95,8± 1,0

* 3 analizin ortalaması ve bu analize ait standart sapma

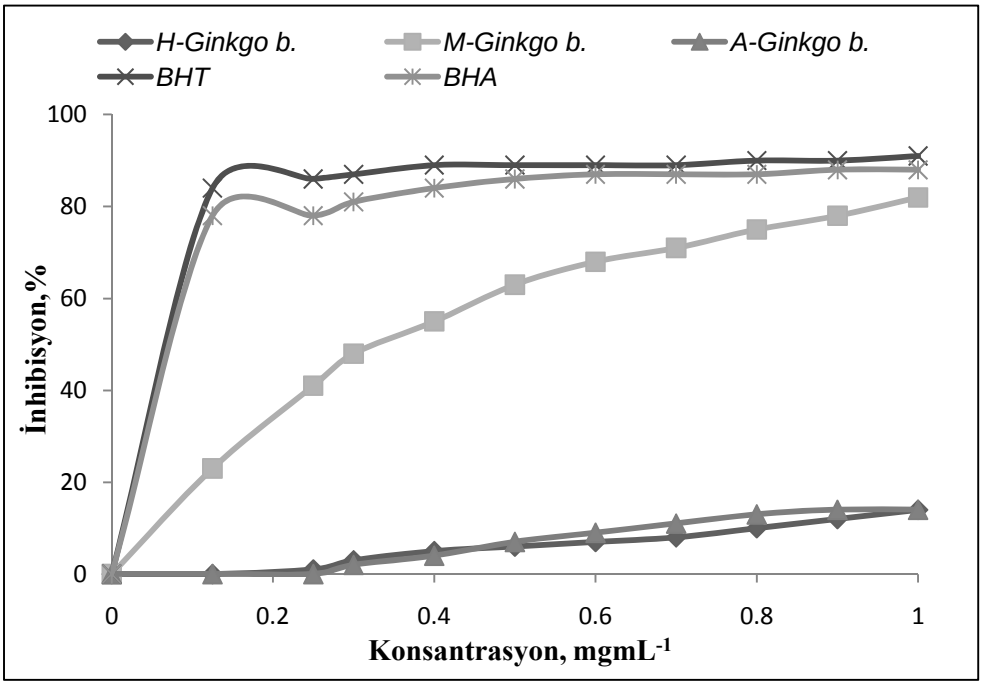


Şekil 6.7. DPPH• radikalinin bir antioksidan tarafından indirgenmesine ilişkin reaksiyon

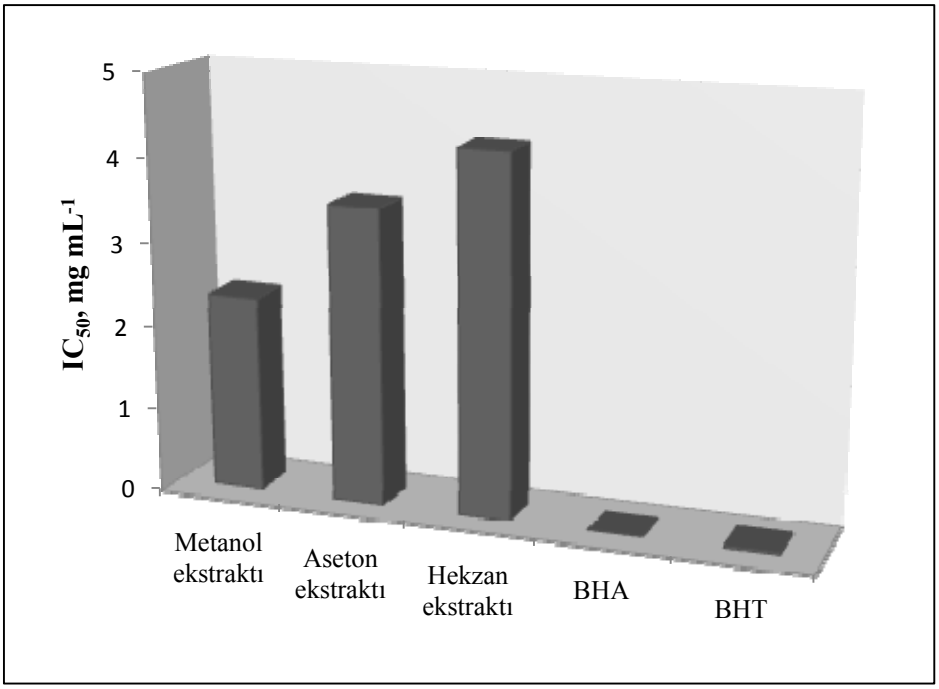


Şekil 6.8. DPPH radikalinin 0-0,3 mg mL^{-1} konsantrasyon aralığındaki kalibrasyon eğrisi

Bu metotta radikal süpürme etkisini araştırmak amacıyla *Ginkgo biloba*'nın metanol, aseton ve hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarıyla 30 dakikalık muamelesinden sonra kalan DPPH radikalinin absorbansı ölçülmüştür. Şekil 6.8'de çizilen DPPH'ın kalibrasyon eğrisinden DPPH konsantrasyonunu yarıya düşüren ekstrakt miktarı mg cinsinden IC_{50} değeri ile farklı numune konsantrasyonlarında ekstraktların ve standartların radikal giderme aktiviteleri % inhibisyon değeri olarak hesaplanmıştır. Şekil 6.9'da verilen *Ginkgo biloba* ekstraktları ile standart olarak kullanılan BHA ve BHT'nin 1 $mgmL^{-1}$ konsantrasyondaki % inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında sırasıyla aşağıdaki şekilde DPPH radikali giderme aktivite göstermişlerdir; BHA □ BHT □ metanol ekstraktı □hekzan ekstraktı ≥ aseton ekstraktıdır. Bu değerler sırasıyla %98±0,6, %95,8± 1,0, %85,0±3,0, %31,2±3,2, %30,5±1,8 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 6.4). *Ginkgo biloba'*nın metanol ekstraktının standart antioksidanlara yakın değerde ve yüksek antioksidan aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Hekzan ve aseton ekstraktları ise yaklaşık aynı değerde ve metanol, BHA ve BHT'den çok daha düşük aktivite göstermişlerdir.



Şekil 6.9. *Ginkgo biloba* ekstraktları ve sentetik antioksidanların (BHA ve BHT) DPPH radikalini giderme aktivitelerine ilişkin konsantrasyon-absorbans grafiği



Şekil 6.10. *Ginkgo biloba* ekstraktları ile sentetik antioksidanların (BHA ve BHT) IC_{50} değerlerinin karşılaştırılmasına ilişkin grafik

Ekstraktların Çizelge 6.5'te verilen IC_{50} değerleri karşılaştırdığında yine % inhibisyon değerlerine benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Ekstraktlar içerisinde en düşük konsantrasyonda DPPH radikalinin konsantrasyonunu yarıya düşüren ekstrakt Şekil 6.10'da görüldüğü gibi metanol ekstraktıdır. Ancak sentetik antioksidanlarla karşılaştırıldığında metanol ekstraktının IC_{50} değerinin BHA ve BHT'nin IC_{50} değerlerinden oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir.

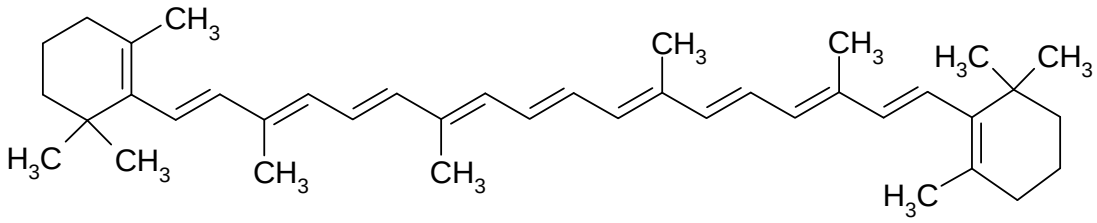
Çizelge 6.5. *Ginkgo biloba* ekstraktları ile sentetik antioksidanlara (BHA ve BHT) ilişkin IC_{50} değerleri

Ekstrakt	Metanol ekstraktı*	Aseton ekstraktı*	Hekzan ekstraktı*	BHA*	BHT*
IC_{50}(mg)	2,36±0,01	3,55±0,49	4,30±0,14	0,020±0,001	0,035±0,007

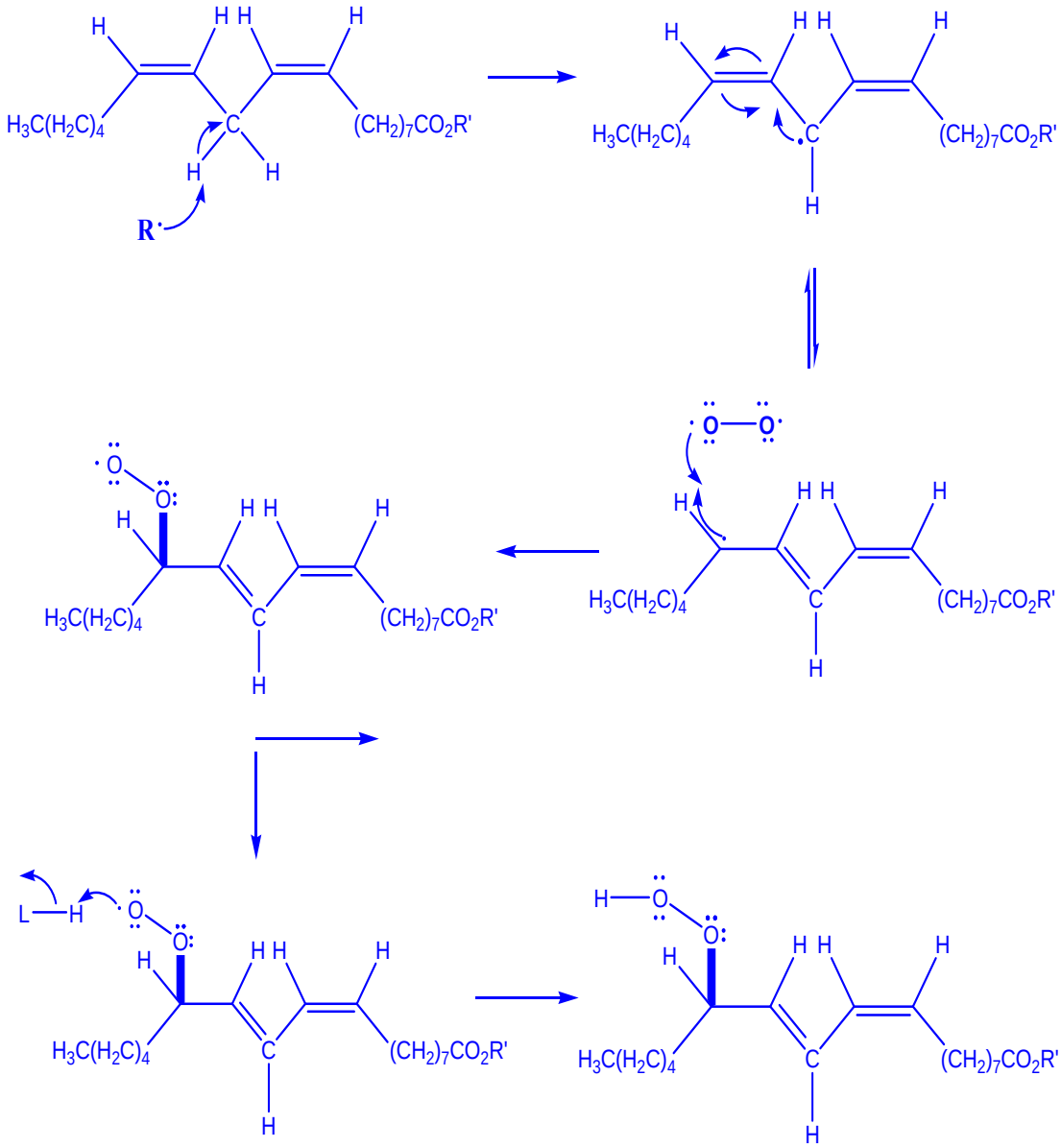
***** 3 analizin ortalaması ve bu analize ait standart sapma

6.1.4. β-Karoten-linoleik asit emülsiyon sistemi

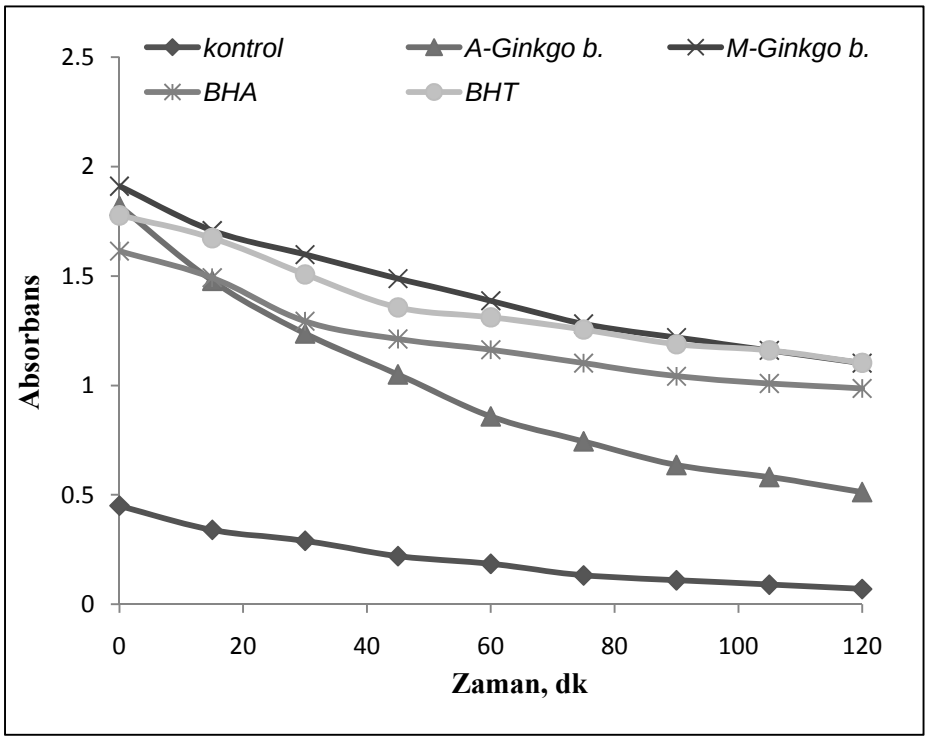
Serbest radikaller, hücre zarının ihtiva ettiği yağ moleküllerine saldırdığında yağ molekülü değişime uğrar. Bitkisel yağların yapılarında meydana gelen bu değişiklik yağların acılaşmasına sebep olur. Yağlar vücutta değişime uğradığında ise hücre zarının yapısı ile fonksiyonları zarara uğrar ve hücre zarı gıdaların, oksijenin ve suyun uzun süreli olarak transferini yapamaz. Bununla birlikte harcanan ürünlerin atılmasını da düzenleyemez. Serbest radikallerin saldırısı uzun süre devam ederse hücre zarının yapısında bulunan yağların parçalanmasına, bitki zarının yırtılmasına ve hücre bileşenlerinin dağılmasına sebep olur. Hücre içi bileşenlerin hücre dışına akması çevredeki dokulara da zarar verir. Serbest radikal saldırısı ve hücre zarının tahribatı "Yağların Oksidasyonu" veya "Oksidatif Zarar" olarak adlandırılmaktadır.
β-karoten-linoleik asit emülsiyon yöntemi linoleik asit ve oksijenle doyrulmuş sulu ortmada linoleik asidin oksidasyonuna dayanmaktadır. Oksidasyon sonucu oluşan konjuge dienler ve diğer uçucu bozunma ürünleri Şekil 6.11'de verilen β-karotenin bozunmasını sağlar. Böylece β-karotenin karakteristik sarı renginin kaybolması ile birlikte 470 nm'deki absorbansı düşer (Kartal ve ark., 2007). Antioksidan maddelerin varlığında ise oluşan bozunma ürünleri antioksidanlar tarafından süpürüldüğünden β-karotenin bozunması engellenir ve sarı renk değişmeden kalır (Şekil 6.12).



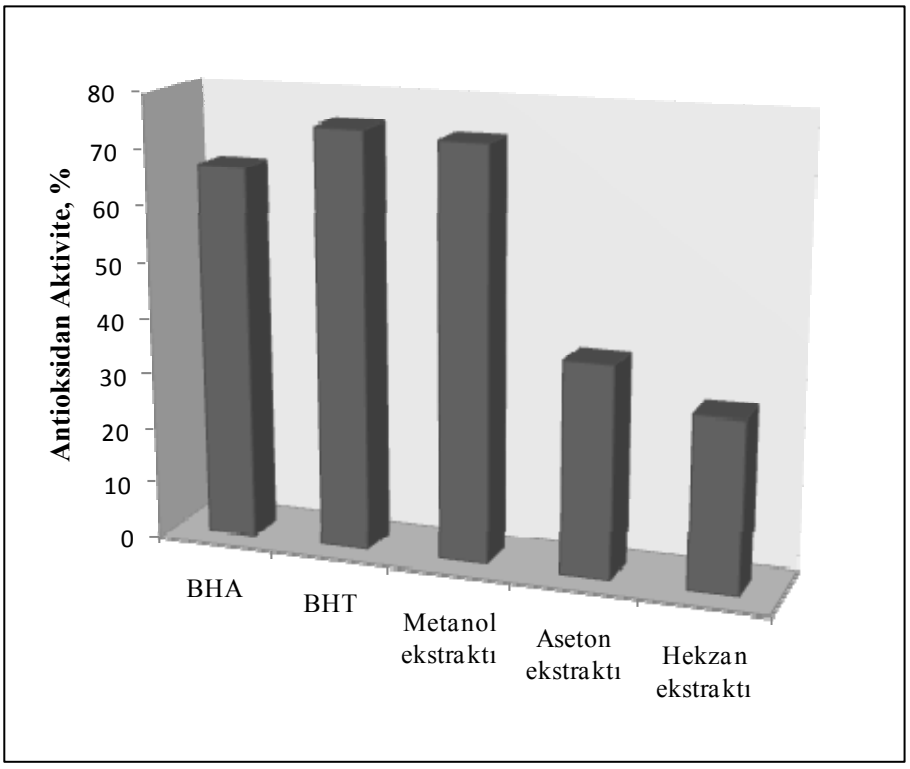
Şekil 6.11. β-karotenin molekül yapısı



Şekil 6.12. β-karoten-linoleik asit emülsiyon sistemindeki linoleik asidin oksidasyonuna ilişkin reaksiyonun mekanizması



Şekil 6.13. *Ginkgo biloba* ekstraktları ile sentetik antioksidanların (BHA ve BHT) zamana karşı absorbans grafiği



Şekil 6.14. *Ginkgo biloba* ekstraktları ile sentetik antioksidanlara (BHA ve BHT) ilişkin antioksidan aktivite değerlerinin karşılaştırılmasına ilişkin grafik

Bu çalışmada *Ginkgo biloba* ekstraktlarının varlığında linoleik asit sisteminde β-karoten varlığında, linoleik asidin oksidasyonu ölçülerek antioksidan aktivite tayin edilmiştir. Bu yöntemle emülsiyon sisteminde ekstraktların varlığında meydana gelen absorbsiyon düşüşü 470 nm'de 120 dakika boyunca ölçülmüştür (Şekil 6.13). Elde dilen verilerden tüm ekstraktların ve sentetik antioksidanların antioksidan aktiviteleri hesaplanmıştır. Çizelge 6.6'da verilen 2 $mgmL^{-1}$ konsantrasyonda metanol ekstraktı (%76,5±2,3) standart antioksidanlardan BHT (%78,8±2,1) ile eşdeğer aktivite gösterirken BHA'dan (%79,5±2,0) daha yüksek aktivite göstermiştir. Aseton (%38,2±1,3) ve hekzan (%31,4±2,7) ekstraktları ise düşük antioksidan aktivite göstermişlerdir (Şekil 6.14).

Çizelge 6.6. *Ginkgo biloba* ekstraktları ile sentetik antioksidanlara (BHA ve BHT) ilişkin antioksidan aktivite (%) değerleri

Ekstrakt	Metanol ekstraktı*	Aseton ekstraktı*	Hekzan ekstraktı*	BHA*	BHT*
AA (%)	76,5±2,3	38,2±1,3	31,4±2,7	79,5±2,0	78,8±2,1

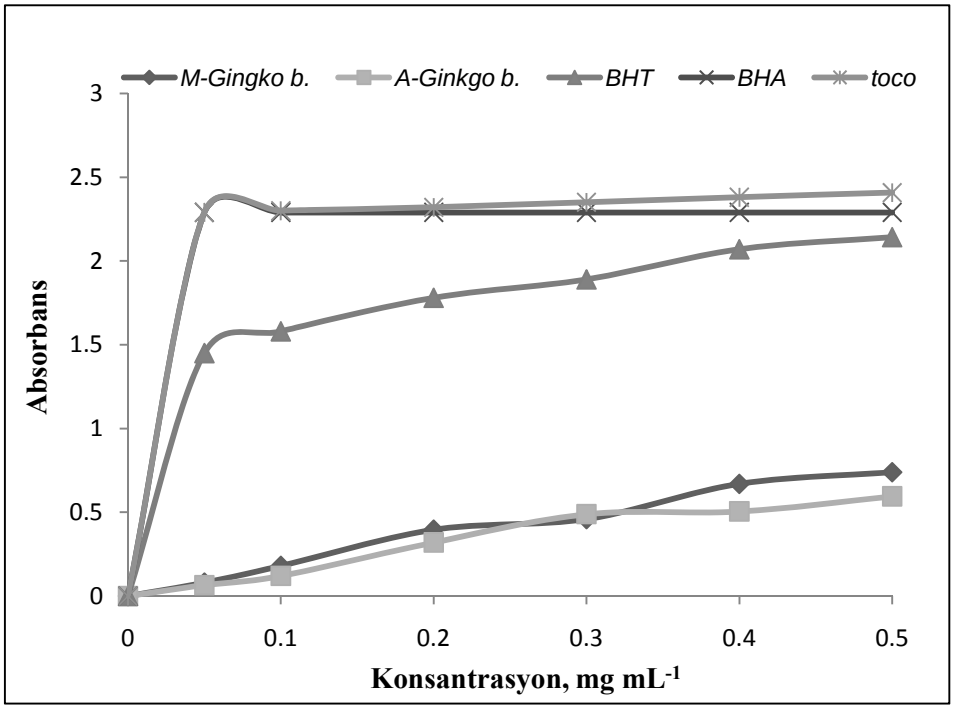
***** 3 analizin ortalaması ve bu analize ait standart sapma

6.1.5. Demir indirgeme gücü (FRAP yöntemi)

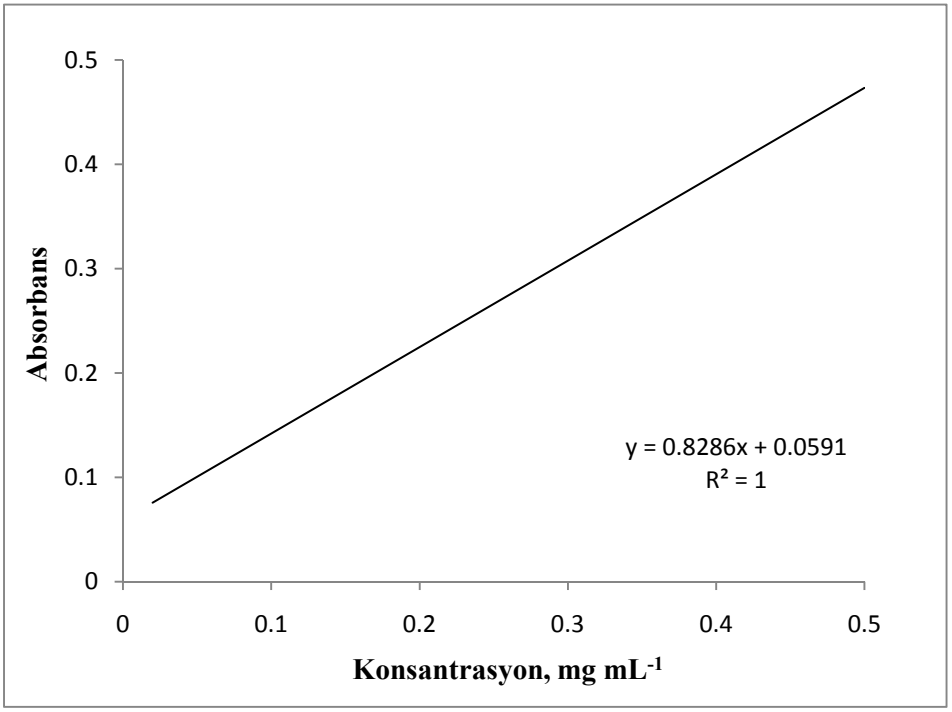
Oyaizu tarafından geliştirilen antioksidan kapasite ölçüm metodunda çözeltisinin sarı rengi fenolik bileşikler gibi antioksidan özellik gösteren maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlarda yeşil renge dönüşmektedir (Gulcin, 2003 ve ark; Gulcin, 2005). Standart antioksidanlar ya da bitki ekstraktları gibi indirgeyici ajanların varlığında ferrik iyonları (Fe^{+3}), ferröz iyonlarına (Fe^{+2}) indirgenerek Fe^{+3}-ferriksiyanit kompleksi Fe^{+2}-ferriksiyanit kompleksi olan ferröz formuna indirgenir. Yöntemde kullanınlan potasyum ferrosiyanad ($K_3Fe(CN)_6$) ilave edilen $FeCl_3$ ile mavi renkte $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ kompleksi oluşturarak 700 nm'de maksimum absorbans verir. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının indirgeme kapasiteleri Şekil 6.15'te gösterildiği gibi konsantrasyon artışı ile doğru orantılı olarak artmıştır. Absorbans değerleri karşılaştırıldığında *Ginkgo biloba*'nın metanol ve aseton ekstraktları standart antioksidanlar olan BHT, BHA ve α-tokoferolden daha düşük bir antioksidan etki (indirgeme kapasite) göstermiştir. Bununla birlikte metanol ve aseton ekstraktı karşılaştırıldığında 0,5 $mgmL^{-1}$ konsantrasyonda metanol ekstraktının indirgeme gücünün aseton ekstraktının indirgeme gücünden daha fazla

olduğu gözlenmiştir. Hekzan ekstraktının indirgeme gücü FRAP metoduna ilişkin deney çözeltileri ile hekzan ekstraktı karışmadığı için tayin edilememiştir.

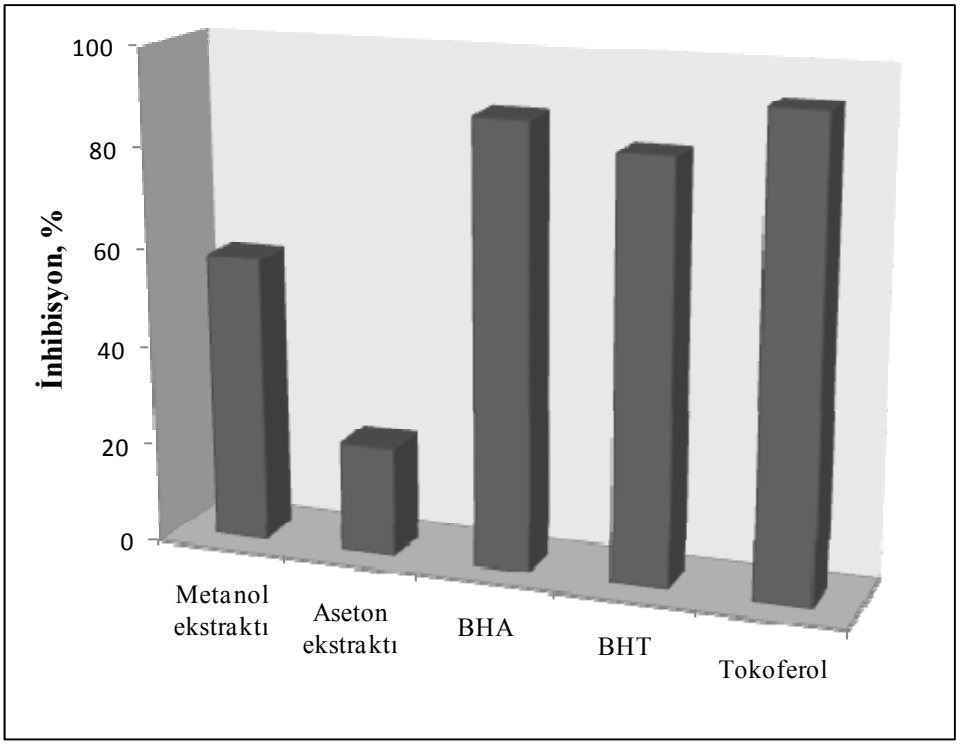
FRAP yöntemi ile *Ginkgo biloba* ekstraktlarının antioksidan kapasitesi 450 nm'deki absorbans değerleri ölçülerek Şekil 6.16'da verilen troloksun kalibrasyon eğrilerinden elde edilen grafik denkleminden troloksa eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Şekil 6.17, *Ginkgo biloba*'nın metanol ekstraktının TEAK değerinin aseton ekstraktının TEAK değerinden hemen hemen altı kat fazla olduğunu göstermiştir. Hekzan ekstraktının ise FRAP yönteminde kullanılan çözelti sistemde çözünmediği için troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesi ölçülememiştir. Çizelge 6.7'de her bir ekstraktın troloksa eşdeğer antioksidan kapasite (TEAK) değerleri verilmiştir. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının konsantrasyonlarındaki artış ile troloksa eşdeğer antioksidan kapasite arasında doğru orantılı bir ilişki vardır (Şekil 6.18 ve 6.19).



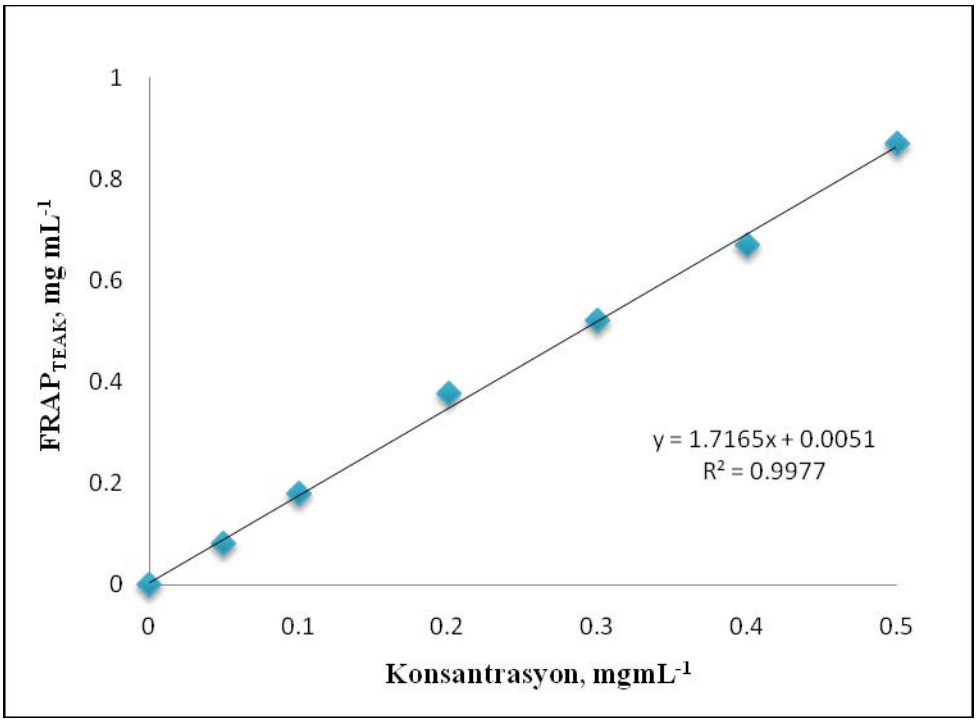
Şekil 6.15. *Ginkgo biloba* ekstraktları ile sentetik antioksidanlara (BHA ve BHT) ilişkin konsantrasyon absorbans grafiği



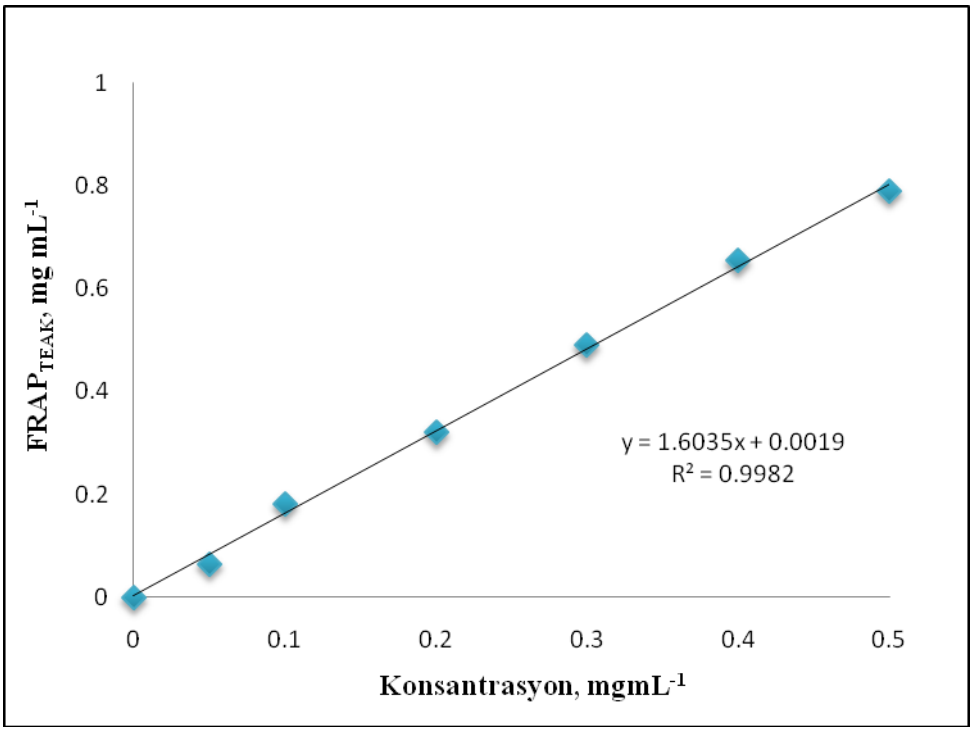
Şekil 6.16. Troloksun 0,025-0,5 mg mL^{-1} konsantrasyon aralığındaki kalibrasyon grafiği



Şekil 6.17. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının troloksa eşdeğer antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılmasına ilişkin grafik



Şekil 6.18. *Ginkgo biloba*'nın metanol ekstraktının troloksa eşdeğer antioksidan kapasitenin ($FRAP_{TEAK}$) konsantrasyonla değişim grafiği



Şekil 6.19. *Ginkgo biloba*'nın aseton ekstraktının troloksa eşdeğer antioksidan kapasitenin ($FRAP_{TEAK}$) konsantrasyonla değişim grafiği

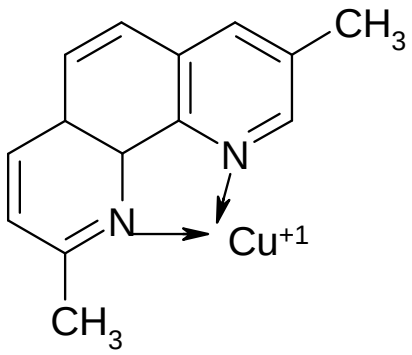
Çizelge 6.7. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının troloksa eşdeğer antioksidan kapasiteleri (mg TEAK g^{-1})

Ekstrakt	Metanol ekstraktı*	Aseton ekstraktı*
TEAK (mg g^{-1})	0,87±0,17	0,79±0,11

***** 3 analizin ortalaması ve bu analize ait standart sapma

6.1.6. Bakır indirgeme gücü (CUPRAC metotu)

Apak tarafından geliştirilen bakır (II) indirgeme kapasitesi kısaca CUPRAC yönteminin esası, bitki ekstraktlarında mevcut olan antioksidan bileşikler varlığında kuprik iyonlarının (Cu^{+2}) oluşturduğu Cu(II)-neokuproin kompleksinde bulunan kuprikin kupröz iyonlarına (Cu^{+}) indirgenmesiyle Şekil 6.20'de verilen renkli Cu(I)-Nc şelatına dönüşmesi esasına dayanmaktadır. Farklı konsantrasyonlarda antioksidan madde varlığında oluşan bu şelatın 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülerek troloksa eşdeğer antioksidan kapasite değerleri bulunmaktadır.



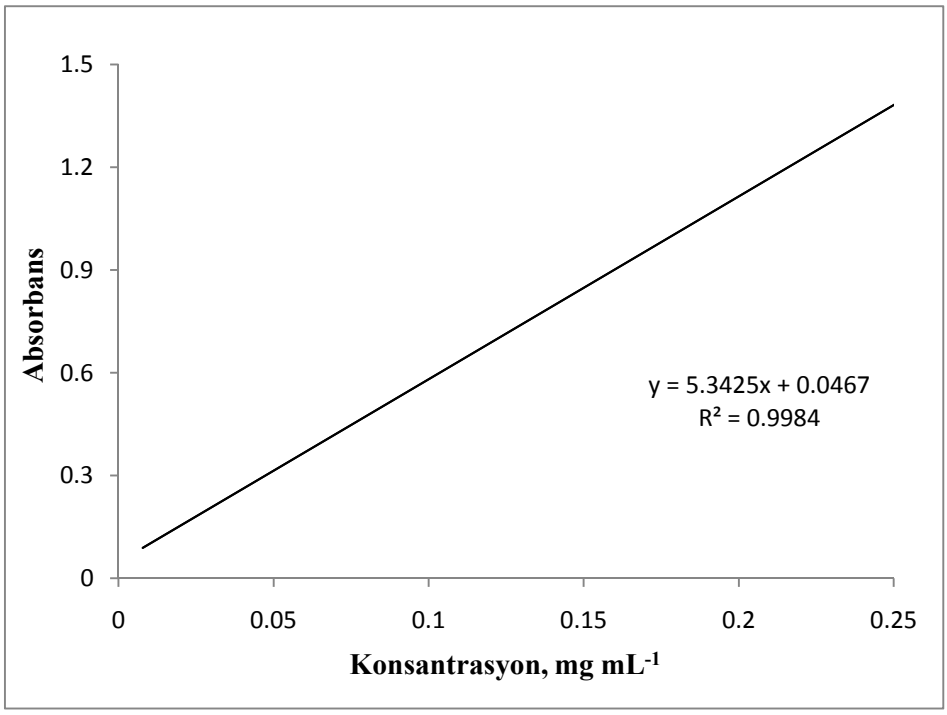
Şekil 6.20. Bakır(I)-neokuproin şelatının (Cu(I)-Nc) kimyasal yapısı

Geliştirilen CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifi, antioksidanlarla (Ar(OH)n) aşağıdaki reaksiyonu vermektedir:

$$n\ Cu(Nc)_2^{2+} + Ar(OH)_n \quad \rightarrow \quad n\ Cu(Nc)^{+} + Ar(=O)_n + n\ H^{+}$$

Bu reaksiyonda $Ar(=O)_n$, hidroksi grubu içeren antioksidan polifenolden oluşan kinonu ifade etmektedir. Tepkime sonunda 2 proton açığa çıkmakta ve $Ar(OH)_n$ grubu antioksidan bileşikler kinona dönüşmektedir. Bu reaksiyonda, n-OH

gruplu antioksidan bileşik 2n e^- donör olarak hareket etmektedir (Apak ve ark., 2004; Gulçin, 2008).



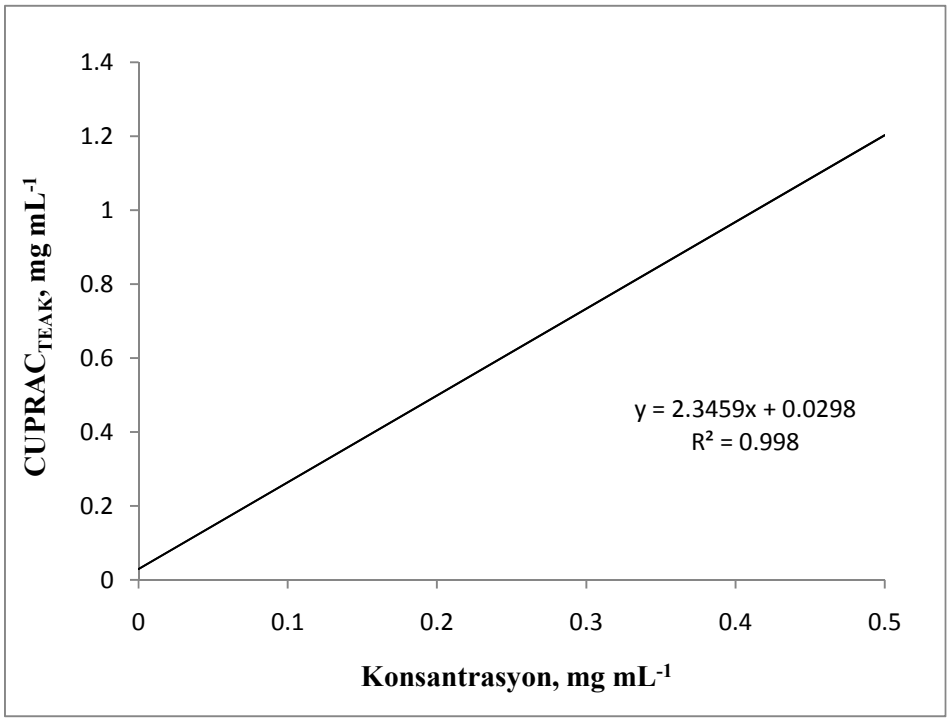
Şekil 6.21. Troloksun 0,025-0,25 mg mL^{-1} konsantrasyon aralığındaki kalibrasyon grafiği

Cu(II) klorür çözeltisi, neokuprein çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra üzerine *Ginkgo biloba* ekstraktları ilave edilmiş ve çözeltinin 450 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Şekil 6.21'de verilen troloksun kalibrasyon eğrisinin denklemi kullanılarak hesaplanan *Ginkgo biloba* ekstraktlarının belirlenen troloksa eşdeğer antioksidan kapasiteleri (TEAK) Çizelge 6.8'de verilmiştir. Şekil 6.22'ye göre CUPRAC yöntemi ile belirlenen *Ginkgo biloba'*nın metanol ekstraktının troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesi aseton ekstraktının antioksidan kapasitesinden daha yüksektir.

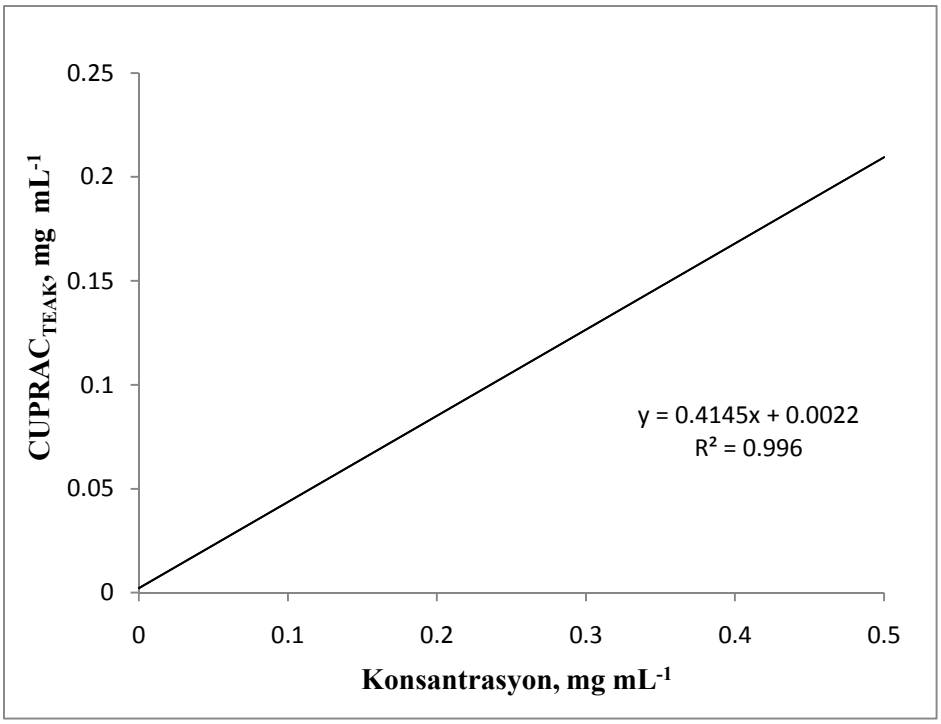
Çizelge 6.8. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının troloksa eşdeğer antioksidan kapasite ($CUPRAC_{TEAK}$) değerleri

Ekstrakt	Metanol ekstraktı*	Aseton ekstraktı*
TEAK (mg g^{-1})	1,2±07	0,21±0,4

***** 3 analizin ortalaması ve bu analize ait standart sapma

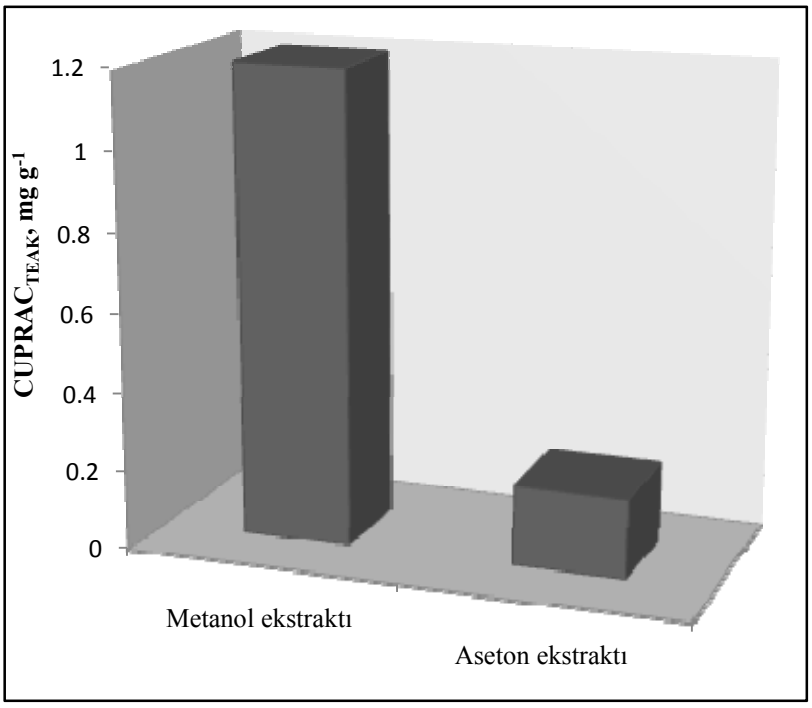


Şekil 6.22. *Ginkgo biloba*'nın metanol ekstraktının troloksa eşdeğer antioksidan kapasite değerlerinin ($CUPRAC_{TEAK}$) konsantrasyonla değişim grafiği



Şekil 6.23. *Ginkgo biloba*'nın aseton ekstraktının troloksa eşdeğer antioksidan kapasite değerlerinin ($CUPRAC_{TEAK}$) konsantrasyonla değişim grafiği

Şekil 6.22 ve 6.23'te görüldüğü gibi troloksa eşdeğer antioksidan kapasite değerleri ekstrakt konsantrasyonlarındaki artış ile doğru orantılı olarak artmıştır. Çizelge 6.8'de verilen troloksa eşdeğer antioksidan kapasite sonuçlarına göre *Ginkgo biloba*'nın metanol ekstraktı aseton ekstraktına göre yüksek miktarda fenolik madde içerdiğinden daha fazla kuprik iyonunu kupröz iyonuna indirgediği buna bağlı olarak $CUPRAC_{TEAK}$ miktarının metanolde asetona göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 6.24).

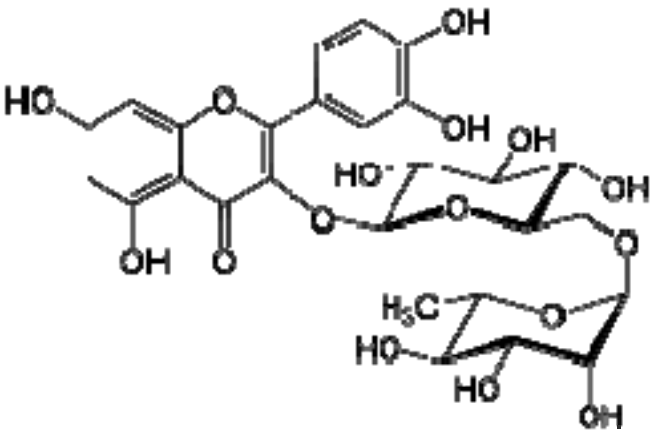


Şekil 6.24. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının troloksa eşdeğer antioksidan kapasitelerinin ($CUPRAC_{TEAK}$) karşılaştırılmasına ilişkin grafik

6.1.7. Metal şelatlama aktivitesi

Metal iyonlarının şelatlama aktivitesi metallerin katalizlediği oksidasyon reasksiyonlarını engellemek veya geciktirmek için sıklıkla kullanılan önemli bir antioksidan metottur. Geçiş metalleri arasında demir, yüksek reaktivitesinden dolayı lipitleri oksitleyen en önemli oksitleyici metal olarak bilinmektedir. Metal iyonları arasında, ferröz iyonları (Fe^{+2}) bilinen en önemli pro-oksidan iyonlardır. Fenton tipi reaksiyonlarda peroksitlerin ortamda bulunmaları esnasında ferrik iyonları (Fe^{+3})

meydana gelebilir, fakat ferröz iyonlarının (Fe^{+2}), ferrik iyonlarından (Fe^{+3}) on kat daha fazla reaktif oldukları bilinmektedir. Bu reaksiyonlar sonucu peroksitlerden daha reaktif olan OH radiklalleri de oluşabilmektedir (Halliwell ve Gutteridge 1984; Gülçin, 2006; Gülçin, 2007a). Ferozin, ferröz iyonları gibi 2+ değerlikli metal iyonları ile kantitatif miktarda bile kompleks oluşturmaktadır. Oluşan renkli ferrozin-metal kompleksi ise 562 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Metal şelatlayıcı ajanların varlığında ferrozin-metal kompleksi oluşmaz. Dolayısıyla 562 nm'de absorbansta meydana gelen azalma metal şelasyonunun göstergesidir. Bu çalışmada, *Ginkgo biloba* ekstraklarında bulunan fenolik yapıların ferröz iyonları (Fe) ile metal şelatlama özelliği incelenmiş ve Şekil 6.25'te kimyasal yapısı verilen rutinle karşılaştırılmıştır. Şekil 6.26'da *Ginkgo biloba* ekstraktlarının konsantrasyonlarına bağlı olarak kompleks oluşturduğu gözlenmiştir. Ekstraktların Çizelge 6.9'da verilen metal şelatlama yüzdeleri karşılaştırıldığında metanol ekstraktının (%89,4 ±1,2) aseton ekstraktından (%25,3 ±0,6) yüksek olduğu, buna karşın rutinden (%92,2 ±1,1) daha düşük aktivite gösterdiği bulunmuştur (Şekil 6.27 ve 28).

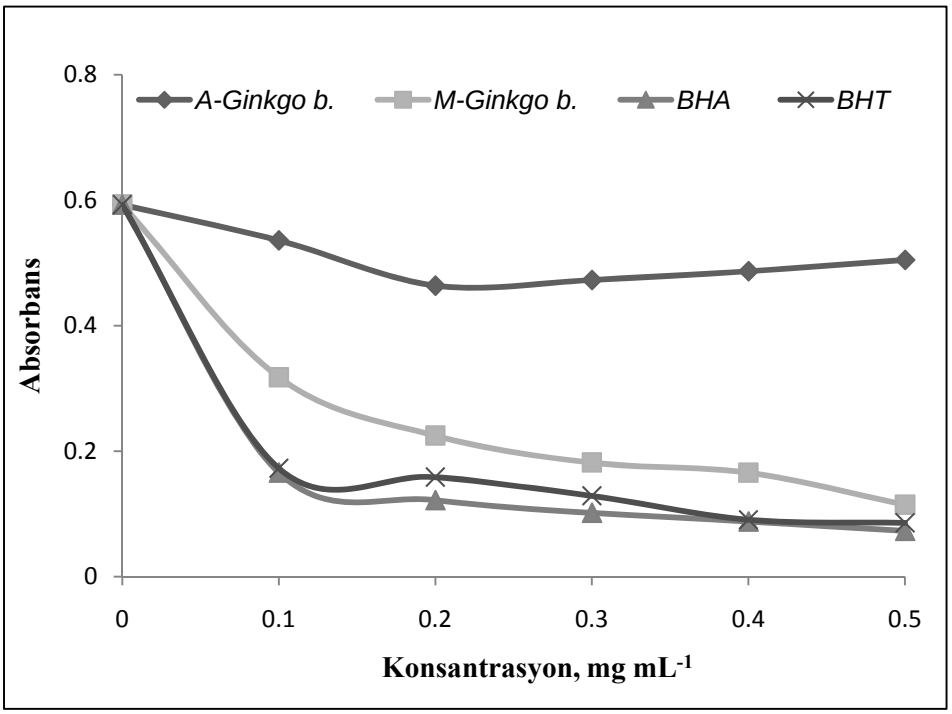


Şekil 6. 25. Rutinin molekül yapısı

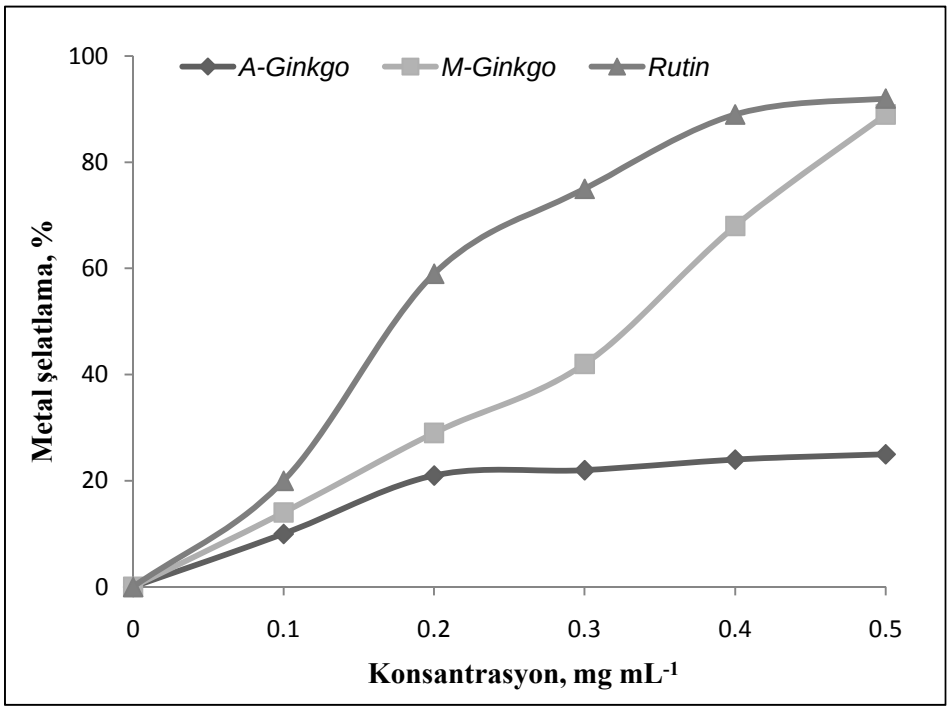
Çizelge 6.9. *Ginkgo biloba* ekstraktları ile sentetik antioksidanın (rutin) metal şelatlama değerleri

Ekstrakt	**Metanol ekstraktı***	**Aseton ekstraktı***	**Rutin***
İnhibisyon (%)	89,4 ±1,2	25,3 ±0,6	92,2 ±1,1

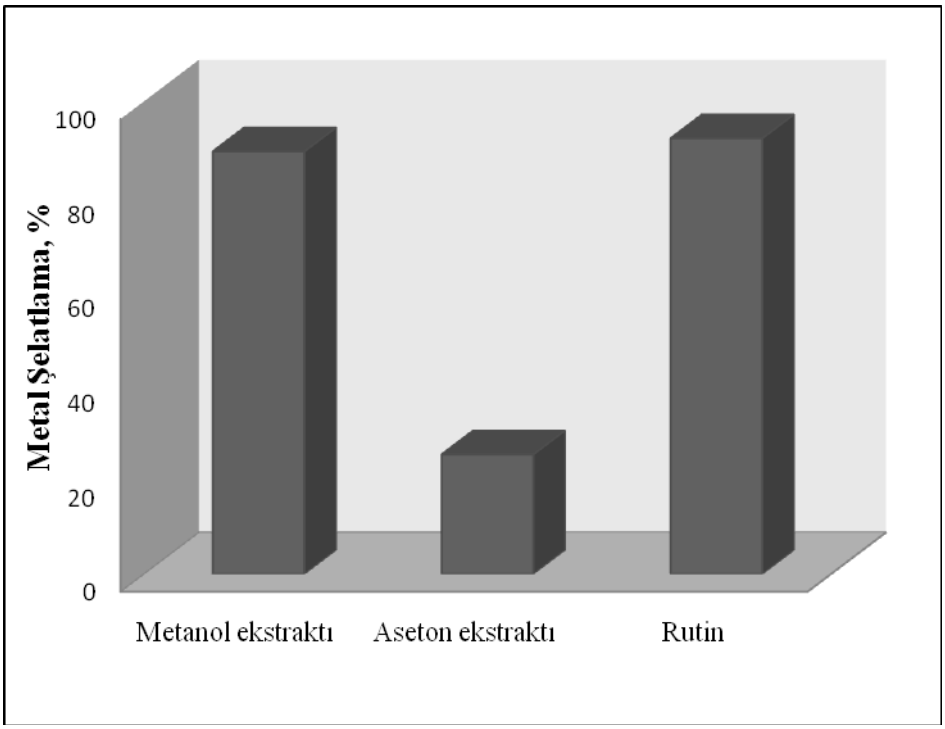
***** 3 analizin ortalaması ve bu analize ait standart sapma



Şekil 6. 26. *Ginkgo biloba* ekstraktları ile sentetik antioksidanların (BHA ve BHT) metal şelatlama aktivitesine ilişkin konsantrasyon absorbsiyon grafiği



Şekil 6. 27. *Ginkgo biloba* ekstraktları ile sentetik antioksidanın (rutin) metal şelatlama aktivitesine ilişkin konsantrasyona bağlı metal şelatlama grafiği



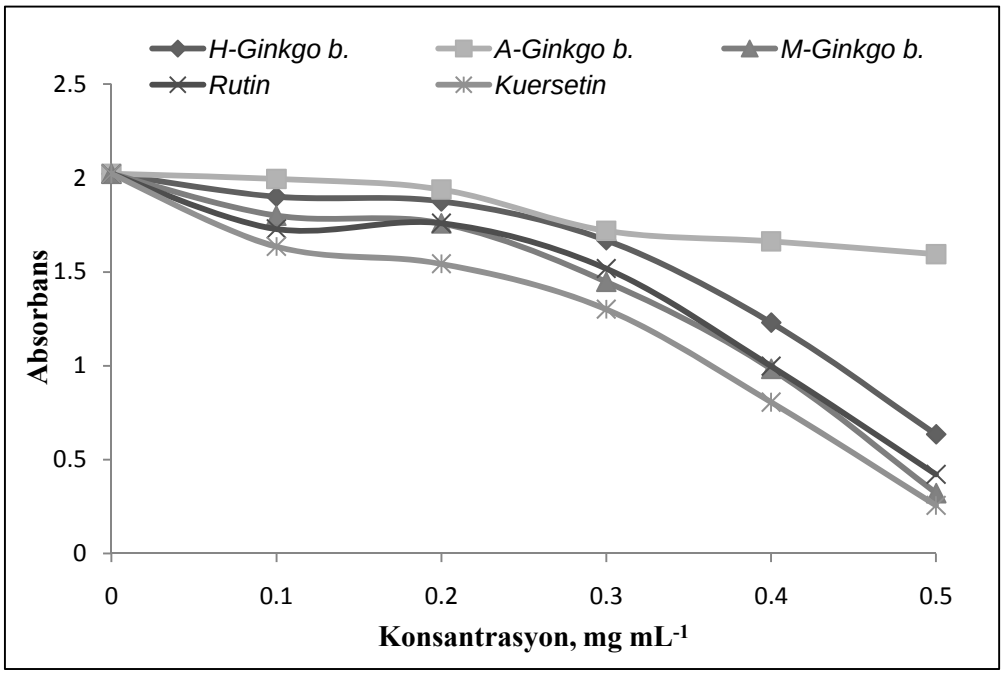
Şekil 6.28. *Ginkgo biloba* ekstraktları ile sentetik antioksidanın (rutin) metal şelatlama değerleri

6.1.8. Hidrojen peroksit giderme aktivitesi

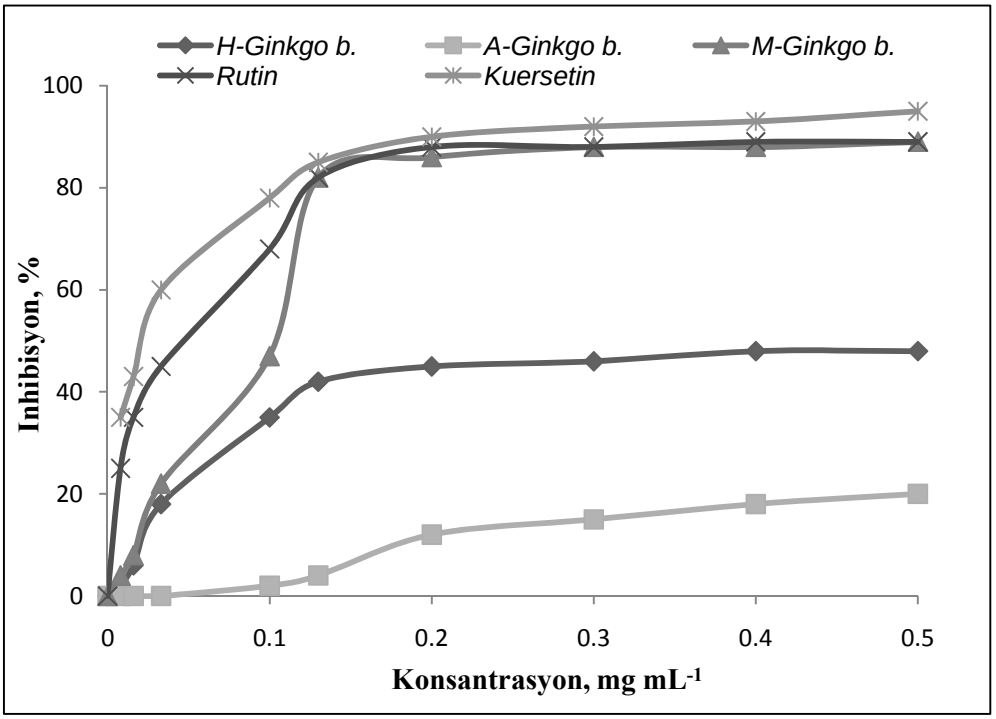
Hidrojen peroksit hücrede süperoksidin enzimatik ya da non-enzimatik dismutasyonu ile oluşmaktadır. Ayrıca glukoz oksidaz, ksantin oksidaz, monoamnin oksidaz gibi bazı oksidaz enzimleri tarafından da üretilmektedir. H_2O_2 suda çözünebildiği için hücre membranından kolayca geçmektedir. Yüksek konsantrasyonda fizyolojik şartlara ve muamele süresine bağlı olarak insan, bitki, hayvan ve bakteriler için toksik etkiye sahiptir. Hidrojen peroksit, aktivite bakımından diğer reaktif türlerden daha zayıf olduğu için protein, lipid ve DNA'yı kolayca oksitleyemez. Ancak hücre membranından kolayca geçmesi nedeniyle daha aktif bir radikal tür olan OH radikaline dönüşmesi muhtemeldir (Ak, 2006; Gülçin ve ark., 2007b).

Çizelge 6.10. *Ginkgo biloba* ekstraktları ile sentetik antioksidanların H_2O_2 giderme aktiviteleri % inhibisyon değeri

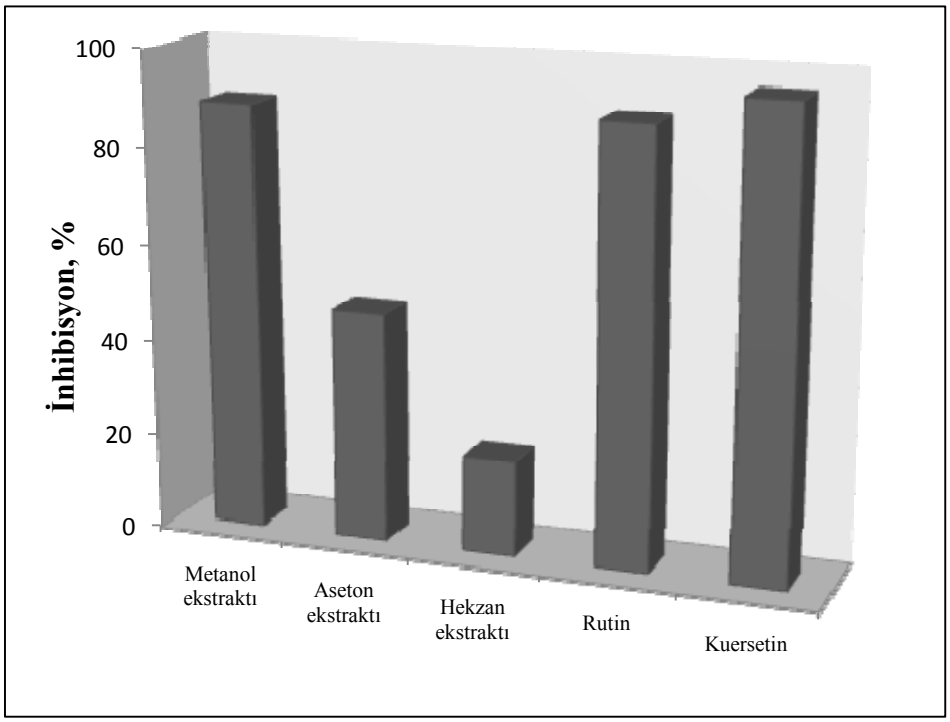
Ekstrakt	Metanol ekstraktı*	Aseton ekstraktı*	Hezan ekstraktı*	Rutin*	Kuersetin*
İnhibisyon (%)	89,1±1,1	48,1 ±0,8	20,5 ±0,9	89,9±0,8	96,1±0,5



Şekil 6. 29. *Ginkgo biloba* ekstraktları ile sentetik antioksidanların (kuersetin ve rutin) H_2O_2 radikali söndürmelerine ilişkin konsantrasyon absorbsiyon grafiği



Şekil 6. 30. *Ginkgo biloba* ekstraktları ile sentetik antioksidanların (kuersetin ve rutin) H_2O_2 gidermesine ilişkin konsantrasyon inhibisyon grafiği



Şekil 6.31. *Ginkgo biloba* ekstraktaları ile sentetik antioksidanların (kuersetin ve rutin) H_2O_2 giderme aktivitelerinin karşılaştırılmasına ilişkin grafik

Şekil 6.29'da *Ginkgo biloba* ekstraktlarının konsantrasyonlarına bağlı olarak farklı oranlarda hidrojen peroksiti giderdikleri gözlenmiştir. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının hidrojen peroksit giderme aktiviteleri analizlerinden elde edilen sonuçlara göre hidrojen peroksit giderme aktivitesi % inhibisyon olarak hesaplanmaştır. Ekstrakt ve standartların H_2O_2 giderme aktiviteleri % inhibisyon değeri olarak hesaplanarak Şekil 6.30'da gösterilmiştir. Çizelge 6.10'da verilen değerlere göre % inhibisyon değeri en yüksek olan kuersetin en yüksek hidrojen peroksit giderme aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir. *Ginkgo biloba*'nın metanol ekstraktı ile rutinin (%89,9±0,8) ve kuersetinin (%96,1±0,5) % inhibisyon değerleri birbirine çok yakın iken, aseton ekstraktı (%48,1 ±0,8) metanolden (%89,1±1,1) daha düşük ancak hekzan ekstraktından (%20,5 ±0,9) daha yüksek % inhibisyon değeri vermiştir. Sonuç olarak hidrojen peroksit giderme aktiviteleri sırasıyla; kuersetin □ metanol ≥ rutin □aseton □ hekzan'dır (Şekil 6.31).

6.2. Kromatografik Analiz Sonuçları

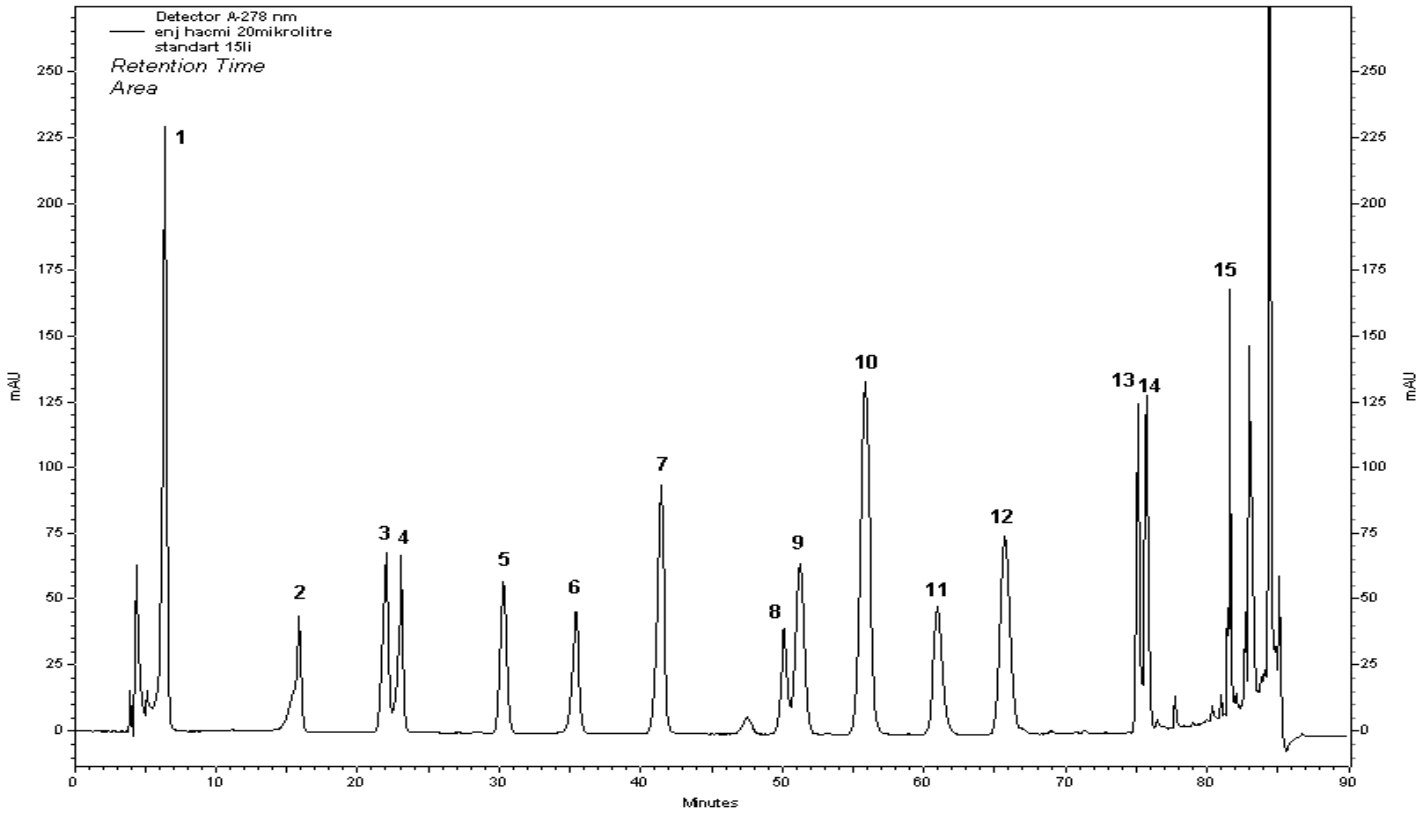
6.2.1. HPLC ile fenolik madde tayini

Antioksidan kapasiteleri çeşitli metotlarla belirlenen *Ginkgo biloba* ekstraktlarına antioksidan özellik sağlayan fenolik asit ve flavonoidlerden bazıları yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilmiştir (Şekil 6.32). Analizi yapılan bu bileşikler ve bu bileşiklerin metanol, aseton ve hekzan ekstraktlarının her birinde $\mu g g^{-1}$ cinsinden ne kadar bulunduğu Çizelge 6.11'de verilmiştir. Tüm ekstraktlarda bulunması muhtemel flavonoid standartların analizine ilişkin kromatogram ise Şekil 6.33'te verilmiştir.

Çizelge 6.11. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının ihtiva ettiği fenolik maddeler ve miktarları ($\mu g\ g^{-1}$)

Bileşen	Metanol Ekstraktı*	Aseton Ekstraktı*	Hekzan Ekstraktı*	**Σ Toplam**
Gallik asit	-	-	-	-
Kateşin hidrat	935,4	-	-	935,4
Kafeik asit	49,2	39,55	-	88,75
Epikateşin	-	-	-	-
p-kumarik asit	25	-	25	25
Ferulik asit	39,66	-	-	39
Viteksin	-	-	-	-
Rutin	-	904,2	39,50	941,70
Naringin	-	-	-	-
Hesperidin	-	-	-	-
Rosmarinik asit	-	-	-	-
Eriodiktiol	136,8	49,8	-	186,6
Kuersetin	-	22,3	39,66	61,96
Naringenin	-	39,50	-	39,50
Karvakrol	-	-	-	-
Σ Toplam	1160	1180	79,16	2419,16

***** 3 analizin ortalaması



Şekil 6.32. 1:Gallik asit, 2:kateşin, 3:kaffeik asit, 4:epikateşin, 5:p-kumarik asit, 6:ferulik asit, 7:viteksin, 8:rutin, 9:naringin, 10:hesperidin, 11:rosmarinik asit, 12:eriodiktiol, 13:kuersetin, 14:naringenin, 15:karvakrol

*Ginkgo biloba'*nın yüksek miktarda ihtiva ettiği bileşenlerin, metanol ekstraktında kateşin hidrat (935,4 $\mu g g^{-1}$), aseton ekstraktında rutin (904,2 $\mu g g^{-1}$), hekzan ekstraktında ise eşit miktarda bulunan kuersetin (39,66 $\mu g g^{-1}$) ve rutin (39,50 $\mu g \mu g^{-1}$)'dir. 15 bileşiğin analizi ile elde edilen sonuçlardan toplam fenolik asit ve flavonoid miktarları metanol, aseton ve hekzanda sırasıyla 1160 $\mu g g^{-1}$, 1180 $\mu g g^{-1}$ ve 79,16 $\mu g g^{-1}$'dır.

Sonuç olarak *Ginkgo biloba* ekstraktlarında analizlenen tüm antioksidan özellik gösteren standartlar *Ginkgo biloba* ekstraktlarının antioksidan kapasitelerine katkıda bulunmuştur. En büyük katkıyı ise ekstraktlarda yüksek oranda bulunan kateşin hidrat ve rutin sağlamıştır. Ancak bu standartlardan naringin, hesperidin, rosmarinik asit, viteksin, karvakrol ve gallik aside hiçbir ekstraktta rastlanmamıştır. Bununla birlikte her bir ekstraktta standart kromatogramda verilmeyen onlarca antioksidan maddenin de bulunması muhtemeldir.

6.2.2 GC ile yağ asidi bileşimi tayini

Ginkgo biloba ekstraktlarında bulunan yağ asitleri gaz kromatografisi ile analiz edilmiştir (Şekil 6.34; 6.35 ve 6.36). Bu amaçla yapılan analizlerden yağ asitlerinin karbon bileşiminin 14-18 arasında değişiklik gösterdiği kanıtlanmıştır. Bununla birlikte yağ asitleri doymuş, tekli doymamış ve çoklu doymamış çift bağları da belirlenerek her birinin total miktarları % oran şeklinde Çizelge 6.12'de verilmiştir. Tüm ekstraktlarda yüksek oranda C 16:0 (palmitik asit) ve C 18:1'e (oleik asit) rastlanmıştır. Ayrıca ekstraktlarda düşük miktarda C 14:0 (mistirik asit), C 16:1 (palmitoleik asit) ve C 18:0 (stearik asit) olduğu gözlenmiştir. Doymuş yağ asitleri (SFA) bakımından en zengin ekstrakt %42,061 oranıyla metanol, tekli doymamış yağ asidi (MUFA) bakımından en zengin %44,195 değeri ile hekzan ve çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) bakımından en zengin %24,405 ile yine metanol ekstraktı olarak bulunmuştur. Aseton ekstraktı ise %40,145 oranıyla tekli doymamış yağ asidi bakımından zengindir.

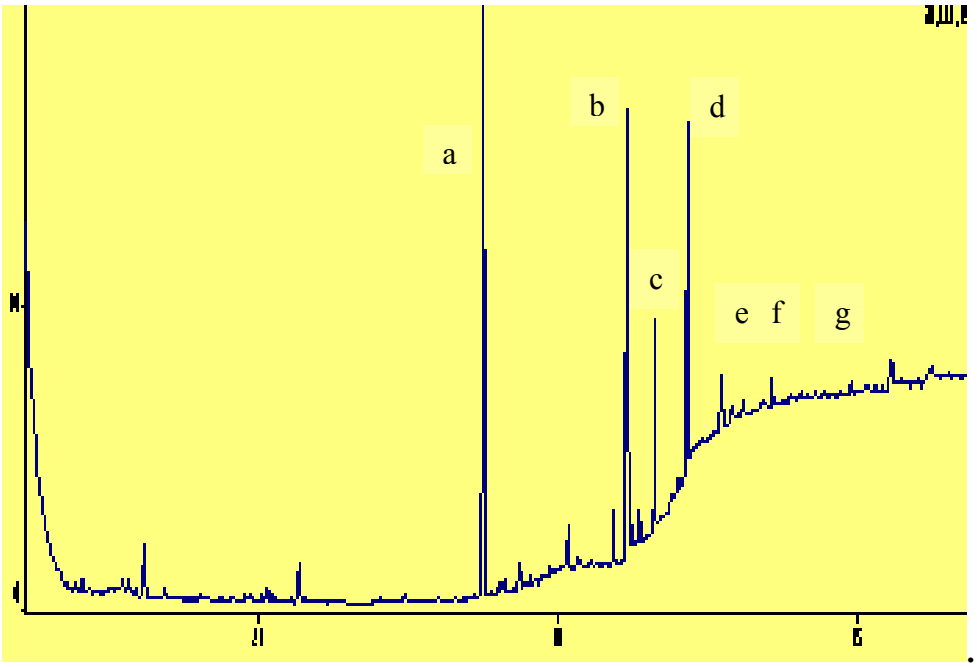
Ginkgo biloba'nın metanol, aseton ve hekzan ekstraklarında yağ asidi bileşiminde toplam 7 farklı yağ asidi bulunmuştur. Bileşimlerdeki yağ asitlerinin karbon sayıları 10-18 arasında değişiklik göstermektedir. *Ginkgo biloba*'nın ekstraklarını yağ asidi bileşimleri incelendiğinde en yüksek yüzdeye sahip yağ asidinin hekzan estraktında olduğu oleik asit (%43,465) olduğu tespit edilmiştir. Oleik asit aseton estraktında %39,66, metanol estraktında ise %27,135 olarak belirlenmiştir. *Ginkgo*

biloba ekstraktlarının ikinci en büyük yüzdeye sahip yağ asidi palmitik asittir. Palmitik asidin metanol, aseton ve hekzan estraklarındaki yüzdeleri sırasıyla %37,695, %28,04 ve %29,275 olarak belirlenmiştir.

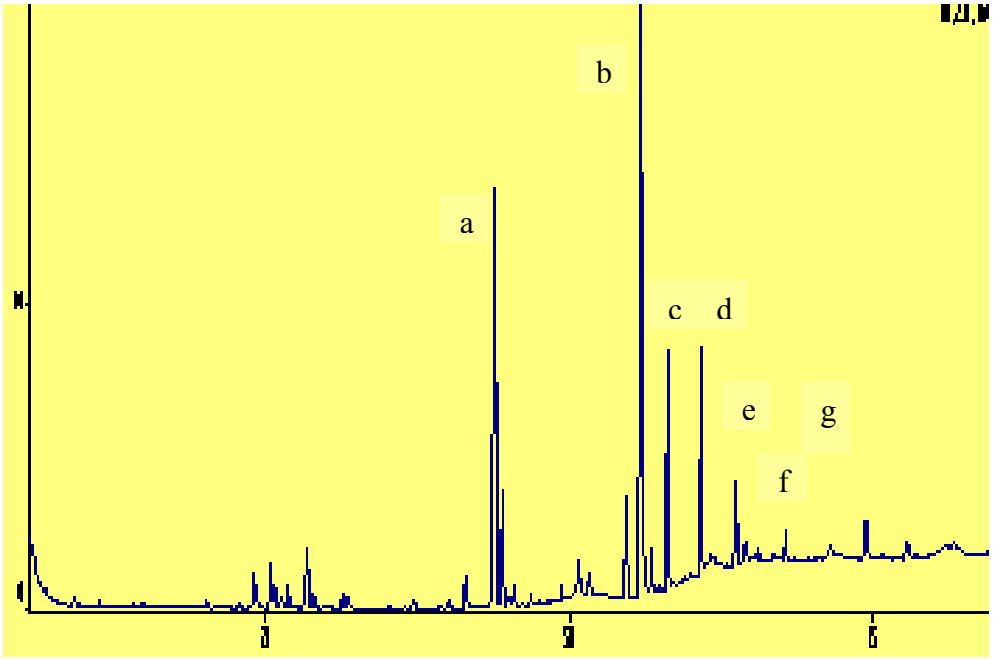
Çizelge 6.12. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının yağ asidi kompozisyonu (%)

Yağ Asitleri	Metanol Ekstraktı	Aseton Ekstraktı	Hekzan Ekstraktı
C 8:0	-	-	-
C 10:0	-	-	-
C 11:0	-	-	-
C 12:0	-	-	-
C 13:0	-	-	-
C 14:0	1,46	1,79	1,965
C 15:0	-	-	-
C 16:0	37,695	28,04	29,275
C 17:0	-	-	-
C 18:0	2,965	4,53	4,39
C 20:0	-	-	-
Σ SFA**	**42,061**	**34,36**	**35,620**
C 14:1	-	-	-
C 15:1	-	-	-
C 16:1	0,74	0,485	0,73
C 17:1	-	-	-
C 18:1	27,135	39,66	43,465
Σ MUFA**	**27,875**	**40,145**	**44,195**
C 18:2	9,9	8,86	9,655
C 18:3	14,505	7,375	5,27
Σ PUFA**	**24,405**	**16,235**	**14,925**

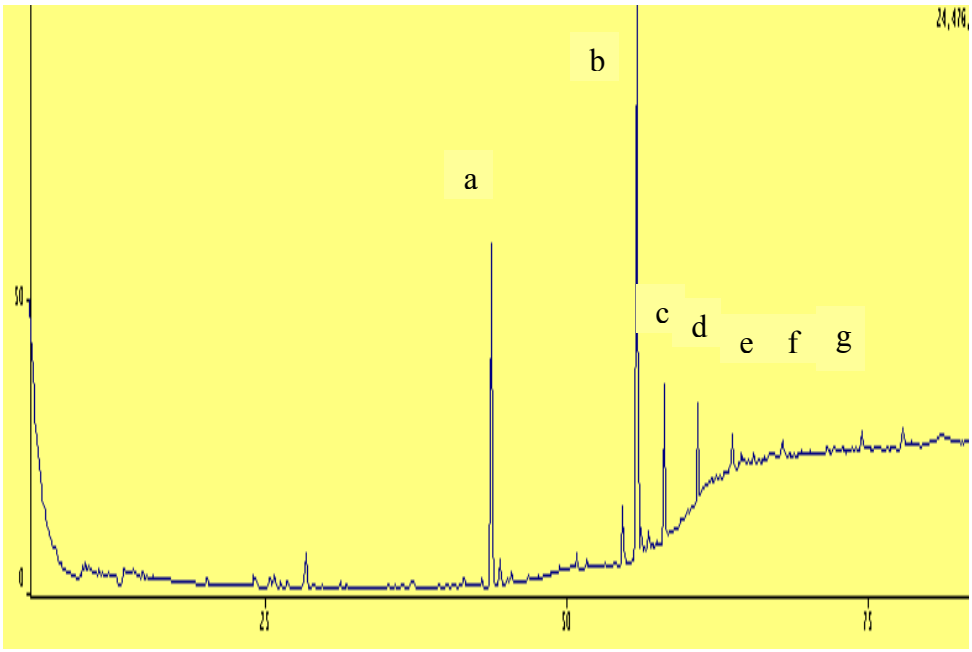
SFA; Doymuş yağ asitleri, **MUFA;** Tekli doymamış yağ asitleri, **PUFA;** çoklu doymamış yağ asitleri



Şekil 6.34. *Ginkgo biloba*'nın metanol ekstraktına ait kromatogram, **a**: C14:0, **b**: C16:0, **c:** C16:1, **d**: C18:0, **e**: C18:1, **f**: C18:2, **g**: C18:3



Şekil 6.35. *Ginkgo biloba*'nın aseton ekstraktına ait kromatogram, **a**: C14:0, **b**: C16:0, **c:** C16:1, **d**: C18:0, **e**: C18:1, **f**: C18:2, **g**: C18:3



Şekil 6.36. *Ginkgo biloba*'nın hekzan ekstraktına ait kromatogram **a**: C14:0, **b**: C16:0, **c:** C16:1, **d**: C18:0, **e**: C18:1, **f**: C18:2, **g**: C18:3

Ginkgo biloba ekstraktlarının üçüncü en yüksek yüzdeye sahip olan yağ asidinin C 18:3 (linolenik asit) olduğu tespit edilmiştir. Linolenik asidin metanol estraktında %14,505, aseton ekstraktında %7,375 hekzan ekstraktında %5,27 olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte C 18:2 linoleik asitin metanol, aseton ve hekzan ekstraktlarındaki % bileşimleri sırasıyla %9,9, %8,86 ve %9,655 ile linolenik asit bileşimine yakın değerdedir.

Ginkgo biloba ekstraktlarından en düşük yüzdeye sahip olan yağ asidi her üç ekstraktta da C 16:1 (palmitoleik asit) olarak tespit edilmiştir. *Ginkgo biloba'*nın metanol, aseton ve hekzandan oluşan tüm ekstraktlarının yağ asidi bileşiminin kantitatif olarak farklı olmakla birlikte kalitatif olarak aynı olduğu ve C 14:0 (miristik asit), C 16:0 (palmitik asit), C 18:0 (sterarik asit), C 16:1 (palmit oleik asit), C 18:1 (oleik asit), C 18:2 (linoleik asit), C 18:3 (linolenik asit)'ten oluştuğu gözlenmiştir.

6.3. Moleküler Analiz Sonuçları

6.3.1. Moleküler yapı

Tüm canlı hücreleri bile karmaşık bir yapıya sahip olup çok sayıda molekülden oluşmaktadır. Bu nedenle öncelikle ilgilenilen molekül grubunun hücredeki diğer

kısımlardan ya da moleküllerden ayırmak ve daha sonra da yapılacak çalışmaların durumuna göre saflaştırma işlemi yapılması gerekmektedir. Moleküler biyolojideki araştırmalar, büyük ölçüde saflaştırılmış moleküllerle yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Biyolojik moleküllerin izolasyonu amacıyla gerçekleştirilen işlemlere genel olarak ekstraksiyon (çıkarma-ayırma) denilmektedir (Temizkan ve Arda, 1999; Temizkan ve Arda, 2004).

DNA hücrede serbest halde bulunan bir molekül değildir. Bazı proteinler (histonlar ve histon olmayan proteinler) DNA ile kompleks halinde bulunmaktadır. Bu komplekse sentromer adı verilir. Histon proteinleri üzerine adeta paketlenmiş olan DNA molekülleri bu şekliyle kromozomları oluşturur. Kromozom sayıları da canlıdan canlıya farklılık göstermektedir. Bununla birlikte DNA'ya bağlı olarak hücrede sentezlenen tüm enzim, protein, ikincil metabolitler ve metabolomların yapısı da canlıdan canlıya ve dokudan dokuya değişir. Ayrıca hücre membranı da canlı türünden türüne değişen bir yapıdıdadır. DNA'nın izolasyonu değişik organizma gruplarında hatta aynı organizma grubu içerisindeki tür ve dokularda farklılıklar gösteriyor olsa da temelde 3 aşamadan oluşmaktadır (Olgun, 1999).

- Hücre duvarının parçalanması
- DNA - protein kompleksinin çözülmesi
- DNA' nın ortamdaki diğer moleküllerden ayrılması

Organizmalardaki bu yapısal farklılıklar çeşitli izolasyon yöntemlerinin kullanılmasını gerektirmektedir. İzolasyonun başarısı çoğu kez üzerinde çalışılan bitkinin üretilmesi, yetiştirilmesi ve çoğaltılması aşamaları ile de ilişkilidir. Bundan dolayı özellikle bitkilerde erken dönemdeki genç yapraklar başarılı bir izolasyon için uygundur. Bu çalışmada DNA izolasyonu daha çok *Ginkgo biloba'*nın taze ve genç yaprakları ile gerçekleştirilmekle birlikte, kurutulmuş taze yapraklara ve birkaç yıllık kuru *Ginkgo biloba* yapraklarına da iki farklı izolasyon yöntemi uygulanarak izolasyon metotları optimize edilmiştir.

6.3.2. DNA izolasyonu

Bitkilerin moleküler düzeyde tanımlanması amacıyla kullanılan tüm moleküler teknikler DNA izolasyonuna dayanır. Bu tekniklerin doğru, hassas ve tekrarlanabilir

sonuçlar vermesi gerek yaş, gerek kuru gerekse fosil yapraklardan DNA'nın uygun miktar ve kalitede izole edilmesine bağlıdır (Puchooa ve Khoyratty, 2004; Deshmukh ve ark., 2007; Joshi ve ark., 2004). Ancak bitkilerde bulunan yüksek polisakkarit miktarı DNA izolasyonlarını zorlaştırmaktadır. Çünkü polisakkaritler izolasyon esnasında DNA sarmalına yapışarak DNA ile birlikte çökmekte ve çözünmesini engellemektedirler (Kaufman ve ark., 1999). Bunun yanında polisakkaritler moleküler analizlerde kullanılan pek çok enzimi inaktive ederek DNA'nın enzimlerce işlenmesini engellemektedir. *Ginkgo biloba* yapraklarına antioksidan özellik sağlayan birçok ikincil metabolit (polifenol, flavonoid ve tanen) yine polisakkaritler gibi başarılı bir DNA izolasyonu engelleyerek enzim aktivitelerini inhibe etmektedir (Michaelis ve ark., 2008; Wulff ve ark., 2002). Bununla birlikte bu yapılar elde edilen DNA'nın saklanması sırasında zamanla DNA'yı degrade etmektedirler (Asif ve Cannon, 2005). Bu nedenle izolasyonda tüm bu bileşikleri kimyasal olarak bağlayarak DNA'yı bu yapılardan saf bir şekilde ayıran ve ayırıken de DNA'nın biyokimyasal yapısına zarar vermeyen reaktifler kullanılmalıdır. Bitkilerden kaliteli ve saf bir DNA izolasyonu için uygulanan metotlar bitki türüne ya da yaprak, meyve ve tohum gibi bitkilerin doku tiplerine bağlıdır. Ayrıca DNA izolasyonu örneğin yaş, kuru ve fosil olması gibi yaprağın yaşına da bağlıdır. Başarılı bir DNA izolasyonunun ölçütü DNA'nın çeşitli restriksiyon enzimleriyle kesilmesi, polimeraz zincir reaksiyonuyla çoğaltılması ya da ligazlarla etkileşime girebilmesi ile kontrol edilebilir (Manen ve ark., 2005). Bitkinin türüne göre izolasyonlarda kullanılan kimyasallar da hem miktar hem de yapı olarak farklılık gösterir. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallardan CTAB (setiltriamonyum bromid), SDS'le (sodyum dodesilsülfat) birlikte hücre duvarını parçalandıktan sonra DNA'nın seçici olarak hücredeki organellerinden ayrılmasını sağlarken, PVP (polivinil propilen), DNA izolasyonu esnasında hücre çekirdeğinden ayrılan ve hücrenin diğer yapıları ile bir arada bulunan polifenolik yapıları kimyasal olarak bağlar (Angeles ve ark., 2005). β-merkaptoetanol protein yapılarındaki disülfit bağlarını kırarak proteinlerin DNA'dan ayrılmasını kolaylaştırır. EDTA hücre içinde bulunan DNA nükleazların kofaktörü olan Mg^{+2} ile kompleks oluşturarak enzimleri inhibe eder. Sezyum klorit ise DNA'yı temizlemek amacıyla kullanılmaktadır (Çalışkan, 2005). *Ginkgo biloba ve Ekinezya* gibi yüksek fenolik bileşiminden dolayı antioksidan özellik gösteren bitkilerden bu fenolik yapılarından PVP ile uzaklaştırılması şarttır. Aksi takdirde DNA'yı saklama esnasında fenolikler degrade ederek DNA kaybına sebep olurlar. Bununla birlikte DNA izolasyonu sonrasında genomu tanımlamaya yarayan moleküler

tekniklerden polimeraz zincir reaksiyonunun temel bileşeni Taq DNA Polimeraz ile HindIII, EcoR1 ve MspI gibi DNA'yı belirli dizilerinden keserek türler arası polimorfizmi tanımlayan restriksiyon endonükleazları inhibe eder. Eğer bitki fenolik yapılarca zengin bir tür değilse PVP kullanımına gerek yoktur. Yine yüksek polisakkarit yapılı bitkilerden DNA izolasyonunda CTAB kullanımı oldukça yaygındır. Yapılan bazı çalışmalarda CTAB metotu ile gerek çam, meşe, kayın ağacı gibi çok yıllık bitkilerde gerekse semiz otu, lahanagiller, gül yaprakları gibi tek yada iki yıllık bitkilerde saf, kaliteli ve yüksek miktarda DNA elde edildiği kanıtlanmıştır (Michiels ve ark., 2003; Jitu ve Kr, 2008).

Çeşitli reaktifler kullanmanın yanında hücre duvarını parçalama ve organelleri uzaklaştırma gibi işlemler de fiziksel etkide kullanılmaktadır. Özellikle bitki eksplantını kuru buz içinde sıvı azotla dondurarak ya da sıcak tamponla havanda ezerek yapılan işlemlerde hücre içi madde ve organeller uzaklaştırılabilir. Ancak hücre içi sıvılar bu ezme esnasında müsilaj bir yapı oluştururlar. Bu yapı santrifüjleme ile uzaklaştırılabilir (Hanania ve ark., 2004). Bu işlemden sonra fenol-kloroform ekstraksiyonu ve jel filtrasyonu gibi saflaştırma işlemleri gerekmektedir. Yapılan son çalışmalar ve üretilen kitler, DNA'nın magnetik beadler üzerine immobilizasyonunu sağlayarak DNA'nın diğer biyokimyasal yapılardan hızlı bir şekilde ayrılmasını sağlar (Xu ve ark., 2005). DNA'nın oluşturduğu sarmal yapıda bulunan histon proteinlerini ayırmada fenol-kloroform ekstraksiyonundan faydalanılmaktadır (Skujiene ve Soroka, 2003). Bu organik çözücüye geçen DNA ise soğuk izopropanolle çöktürülerek saflaştırılır. Elde edilen DNA'ya etil alkol yıkaması yapılarak saflığı artırılır (Hill-Ambroz ve ark., 2002). Biyokimyasal yapıların uzaklaştırılmasında zaman zaman Proteinaz K, lizozim ve RNAaz gibi enzimlerden de faydalanılır (Puchooa ve Khoyratty, 2004). Ancak tüm bu fiziksel işlemler esnasında DNA yapısında kırılmalar meydana gelebilir. Bu kırıklar daha sonra DNA'ya uygulanacak moleküler tekniklerden elde edilen sonuçları değiştirmektedir (Fu ve ark., 2004).

Bu çalışmada *Ginkgo biloba*'nın taze, kurutulmuş ve birkaç yıllık kuru yapraklarından DNA izolasyonu, tüm bu izolasyon şartları baz alınarak manuel olarak ve son yıllarda kullanımı oldukça fazla olan magnetik yapılara dayalı kitlerle otomatik olarak gerçekleştirilmiştir.

Manuel DNA izolasyon metotu:

Bu çalışmada tür içi ya da türler arası gen polimorfizmini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen RAPD-PCR analizi için uygun miktar ve saflıkta DNA elde edebilmek amacıyla Doyle ve Doyle (1987;1990) yöntemi bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Pek çok farklı bitki türüne uygulanan CTAB metotu ile yaş yapraktan, fosil yaprağa, bitki tohumundan çiçek kısmına kadar bitkilerin pek çok kısmından DNA izolasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir (Michiels ve ark., 2003). Yöntemde yapılan değişiklikler, elde edilen DNA miktarının korunarak, PCR aşamasında enzim aktivitesini engelleyen ikincil bileşiklerin ve kimyasalların temizlenmesi amacıyla yapılmıştır. İkincil bileşikler özellikle *Ginkgo biloba* gibi antioksidan özellik gösteren ve bitkisel ilaç olarak kullanılan bitkilerde yüksek miktarda bulunmaktadır (Pirttilä ve ark., 2001; Deshmukh ve ark., 2007). Bu nedenle PVP *Ginkgo biloba'*nın yapısında bulunan kateşin, kaffeik asit, rutin ve kuersetin gibi miktarları HPLC analizi ile de belirlenmiş ve DNA ekstraksiyonunu olumsuz yönde etkileyen fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasında kullanılmıştır. SDS hücre duvarını parçalanması ve CTAB polisakkaritelerin DNA'dan ayrılmasını sağlamıştır. β-merkaptoetanol proteinlerin disülfit bağlarını kırarak DNA'dan ayrılmalarını kolaylaştırmıştır. 2 aşamalı yürütülen izolasyonda 2. aşama DNA saflığını artırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. RNAaz ise DNA ile birlikte izole edilen hücrenin bir diğer nükleik asidi olan RNA'nın parçalanması amacıyla kullanılmıştır. Yine izolasyon esnasında gerçekleştirilen fenol-kloroform ekstraksiyonu DNA'nın proteinlerden özellikle de histon proteinlerinden tamamiyle ayrılması için proteinlerin denature olmalarını sağlamıştır. Son aşamada gerçekleştirilen alkol yıkaması ise gerek hücreden gelen gerekse izolasyon esnasında kullanılan reaktif ya da enzim çözeltilerinden gelen kirlilikleri ya da safsızlıkları giderme amacıyla yapılmıştır. Elde edilen saf DNA Tris-EDTA tamponunda çözülerek sonraki aşamalar için kullanıma hazır hale getirilmiştir. DNA çözeltileri -20^{o}C'de saklanmıştır (Mbogori ve ark., 2006).

Çizelge 6.13. *Ginkgo biloba* DNA'larının miktar ve saflık dereceleri

Orijin	**Türler**	**Manuel metot (CTAB)**				**Otomatik metot (EZ1)**			
		DNA miktarı μgmL^{-1}	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	A_{320}	DNA miktarı μgmL^{-1}	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	A_{320}
Türkiye	Taze	780	1,89	2,30	0,001	1150	1,95	2,20	0,000
	Kurutulmuş	775	1,86	2,42	0,001	1112	1,74	2,25	0,001
	Kuru	710	1,74	2,53	0,003	934	1,80	2,31	0,002
Almanya	Taze	790	1,81	2,35	0,001	1062	1,81	2,25	0,000

Bu çalışmada kullanılan Qiagen izolasyon kiti de 20 dakika gibi kısa bir sürede DNA'nın silika beadlere tutunması sağlanarak saf bir şekilde izole edilmiştir. Bu metotla hem yaş hem kurutulmuş ve hem de kuru bitki yaprağından yüksek kalite ve konsantrasyonda DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve sonraki DNA'nın sonraki moleküler tekniklerle işlenmesini sağlamıştır. Metot yalnızca hücre duvarının parçalanarak DNA ve diğer hücre içi organellerin tampona geçişini sağlayan ön aşamasında bitkinin yaşına göre protokol farklılıkları göstermiştir. Bu amaçla kuru yaprakların kitin G2 adlı tamponunda 65^{o}C'deki inkübasyon süresi yaş ve kurutulmuş *Ginkgo biloba* yapraklardan daha uzun sürmüştür. Yaş ve kurutulmuş yaprak 65^{o}C'de 16 saat ve kuru yapraksa 24 saat tamponla inkübe edilmiştir.

DNA konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi:

DNA konsantrasyon ve saflığının belirlenmesinde spektrofotometrik bir metot kullanılmıştır. Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Lambert Beer yasasına göre nükleik asitlerin (DNA ve RNA) konsantrasyonundaki artışla doğru orantılı olarak 260 nm'de vermiş oldukları absorbsiyon artmaktadır. DNA miktarı aşağıdaki eşitlikten absorbsiyona bağlı olarak hesaplanmıştır. Buna göre;

DNA (μgmL^{-1}) = 260 nm'deki Absorbans x sulandırma oranı x 50

Absorbansın 1 değeri çift iplikli DNA için 50 μgmL^{-1}, tek iplikli DNA veya RNA için 40 μgmL^{-1} ve oligonükleotidler için 20 μgmL^{-1}'ye karşılık gelmektedir. Her bir bitkiden izole edilen DNA miktarı Çizelge 6.13'te verilmiştir. DNA miktarları 780-1150 μgmL^{-1}arasında bulunmuştur. Her bir DNA RAPD-PCR reaksiyonları için 50 ng'a seyreltilmiştir.

6.3.3. RAPD-PCR metotudunu optimizasyonu

Türkiye ve Almanya orijinli *Ginkgo biloba*'nın genotipik olarak tanımlanması, bitkiler arasındaki polimorfizmin tayin edilmesi ve iklime bağlı mutasyonları tanımlanması için gerçekleştirilen RAPD-PCR yöntemi tüm moleküler markırlar içerisinde en ucuz, en hızlı ve en kolay olanıdır. RAPD-PCR tekniği primer olarak rasgele seçilmiş 10 baz uzunluğundaki oligonükleotidlerle çok küçük miktardaki DNA moleküllerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmasına dayanmaktadır.

düzenlenerek optimize edilen RAPD-PCR şartlarında *Ginkgo biloba*'nın primer dizilerine bağlı olarak vermiş olduğu DNA ürünlerinin oranları incelenmiş ve farklı ülkelerdeki iklim şartlarına bağlı olarak göstermiş oldukları mutasyonlara ilişkin polimorfizm oranları tanımlanmıştır.

PCR koşullarının optimizasyonu: Genomik DNA'nın kısa oligonükleotid primerler kullanılarak çoğaltılması sadece reaksiyonda kullanılan enzim ve kimyasal maddelerin miktarları ile izole edilen DNA'nın kalitesine bağlı değildir. DNA'nın çoğalmasında sıcaklık parametreleri de son derece önemlidir. Bu çalışmada *Ginkgo biloba*'dan elde edilen DNA'ların polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması 3 basamakta gerçekleştirilmiştir (McPherso ve Møller, 2006).

1- Denaturasyon: DNA'nın çift zincirli sarmal yapısının açılarak iki adet tek zincir haline getirilmesi denaturasyon olarak adlandırılır. Çift zincirli DNA molekülünün 94-95°C sıcaklıkta denatüre olması sağlanır.

2- Primerin bağlanması: Denatüre olarak zincirleri ayrılan DNA molekülünün primerlere komplementer olan bölgelerine primerlerin bağlanması 34-60°C sıcaklık aralığında gerçekleşmektedir. RAPD-PCR yönteminde kullanılan primerler 10 baz uzunluğunda olduklarından bağlanmalar düşük sıcaklıkta gerçekleşmiştir. Genellikle primerlerin Tm sıcaklıklarının 2-3°C altındaki sıcaklıklar çoğaltma yönünden olumlu sonuçlar vermiştir.

3- Uzama: Primer DNA tek zincirindeki komplementer bölgelerine bağlanmasından sonra *Taq* polimeraz enzimi ile deoksiribonükleotidlerin DNA'ya komplementer olarak bağlanması 72°C'de gerçekleşmiştir. Çünkü Taq polimeraz enzimi 72°C'de maksimum aktivite göstermektedir. RAPD reaksiyonları için yapılan ön optimizasyon çalışmaları; 25 µL'lik reaksiyon tüplerine; 3 µL genomik DNA (50 ng μL^{-1}), 2,0 µL $MgCl_2$, 2,5 µL 10 X *Taq* polimeraz tamponu, 2 µL primer, 2 µL dNTP karışımı, 1,5 µL *Taq* polimeraz enzimi (1U) ve 11,7 µL distile su olacak şekilde hazırlanan PCR çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir (Çizelge 6.14). Bu çalışmada, DNA'nın ön denatürasyonu 94°C'de 4 dakika sürmüştür. Bu aşamadan sonra asıl denatürasyon basamağında 94°C'de 2 dakika boyunca DNA'nın çift zincirinin açılması sağlanmış ve primerin açılan DNA zincirlerine bağlanmasında her bir DNA örneği için farklı sıcaklıklar kullanılmıştır. Yaş

karışımında; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 µL (25 mM Mg^{2+}) konsantrasyonları denenmiş, elde edilen sonuçlara göre 2,0-2,5 µL Mg^{2+} (2,0-2,5 mM) konsantrasyonunun parlak RAPD bantları verdiği gözlenmiştir (Çizelge 6.14).

dNTP konsantrasyonunun optimizasyonu: DNA biyopolimerinin monomeri olan dört farklı deoksiribonükleosit tri fosfat (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) kalıp DNA'nın tek zincirine komplementer olarak hidrojen bağları ile kalıp DNA'ya ve fosfodiester bağları ile birbirlerine bağlanırlar (Şekil 6.39 ve 6.40). Bu şekilde kalıp DNA'ya komplementer yeni DNA zincirini uzatarak çift iplikçikli PCR ürünü oluşmasını sağlarlar. Bu dört farklı dNTP'nin birleşme hatalarının en aza indirgenmesi için eşit konsantrasyonlarda kullanılması gerekmektedir. Düşük dNTP konsantrasyonu hedef olmayan yerlerde yanlış primerlerin birleşme şansını en aza indirir. Hedef dizinin uzunluğu ve kompozisyonu için uygun olan en düşük dNTP konsantrasyonu seçilmelidir. Ayrıca deoksinükleosit tri fosfat konsantrasyonlarının düşük miktarda kullanımı PCR'ın güvenilirliğini artırmakta, nükleotidlerin DNA'ya yanlış bağlanma olasılığını azaltmaktadır (Yuryev, 2007). Bu nedenle çalışmada öncelikle her bir nükleotitten eşit konsantrasyonda (25 mM) olacak şekilde bir nükleotid karışımı hazırlanmış ve 25 µL'lik reaksiyon karışımına 1; 1,5; 2 ve 2,5 µL (1; 1,5; 2; 2,5 mM) konsantrasyonlarda dNTP ilave edilerek PCR yapılmıştır. Buna göre uygun dNTP konsantrasyonu 2 mM olarak belirlenmiştir (Çizelge 6.14).

Taq Polimeraz ve Hot start Taq polimeraz konsantrasyonlarının optimizasyonu: Taq DNA ve Hot start Taq DNA polimeraz, dNTP'lerin kalıp DNA zincirine komplementer şekilde yan yana gelerek fosfodiester bağları ile bağlanmasıyla enzim katalizli reaksiyonun in vivo'da meydana gelmesini sağlayan ve DNA polimeraza karşılık gelen in vitro enzimleridir. Sıcak su kaynaklarında yaşayan bir *Thermus aquaticus* adlı bakteriden izole edilmektedirler (Klug ve Cummings, 2000). Yüksek sıcaklıkta maksimum aktivite gösteren bu enzimlerin keşfi ile moleküler biyoloji ve genetik alanlarındaki çalışmalar ivme kazanmıştır.

Bu çalışmada DNA'nın laboratuvar şartlarında çoğaltılmasını sağlayan enzimlerden izole edildikleri canlıya göre farklı isimlerle adlandırılan farklı konsantrasyonlarda *Taq* DNA ve Hot Start Taq polimeraz enzimleri kullanılarak en kaliteli PCR ürünü elde etmek üzere enzim konsantrasyonu optimize edilmiştir. 25 µL'lik reaksiyon karışımında, enzim aktivitesi 0,25-0,6 U μL^{-1} olacak şekilde

çalışılmıştır. Reaksiyon karışımında enzim m bağlı olarak yüksek enzim aktivitesinde spesifik olmayan yan ürünler ve smear bir görüntü meydana gelmiştir. Düşük enzim aktivitesinde ise istenen ürünlerin miktarı yetersiz olmakta bu da az sayıda bant oluşumuna yol açmaktadır (Devos ve Gale, 1992; Yuryev, 2007). Her iki enzimle aynı şartlarda amplifikasyon gerçekleştirildiğinde Hot Start Taq polimerazın aynı şartlarda daha belirgin bantlar verdiği görülmüştür. Çalışmada ön denemeler sonucunda uygun Hot Start *Taq* polimeraz konsantrasyonunun 25 µL'lik reaksiyon karışımında aktivitesinin 1 U olarak belirlenmiştir (Çizelge 6.14)

Enzim tamponlarının konsantrasyonunun optimizasyonu: Çalışmada Taq Polimeraz enzimine ait tampon ve Hot Start Taq polimeraz enzimine ait tampon birbirlerinden farklı olup enzimleri ile birlikte temin edilmiştir. Enzimlerin çalışması için onlara uygun pH sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Bu amaçla PCR karışımının pH'nı sabit tutmak için mümkün olan en yüksek miktarda tampon kullanmak gerekir. Reaksiyonda tampondan her PCR tüpü için 2,5 µL olacak şekilde kullanılması daha iyi sonuçlar vermektedir (Çizelge 6.14).

Primer seçimi ve konsantrasyonunun optimizasyonu: Oligonükleotid primerler, primer sentezi yapan laboratuvarlardan elde edilmektedir. Gen çoğaltılması dahil PCR'ın birçok uygulamaları için kalıp DNA'nın belirli bir bölgesine tamamlayıcı olan primerlere ihtiyaç vardır. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınarak bu bölgelere tamamlayıcı olan primerlerin dizisi tasarlanır. Primer tasarımı yapmak için bilgisayar programları da geliştirilmiş olmakla beraber, çoğu zaman araştırıcılar ilgilendikleri genleri ya da DNA parçalarını çoğaltmak için kendileri primer tasarımı yapmak durumundadırlar (Yuryev, 2007). Tasarım yapılırken mümkün olduğunca dört bazın eşit sayıda kullanımına dikkat edilmektedir. İstenmeyen PCR ürün oluşumlarını en az indirgemek için dikkat edilmesi gereken bazı noktalar vardır. Özellikle tasarlanan primelerin tekrar dizinleri içermemesine dikkat edilmelidir. Bununla birlikte polipirimidin ya da polipürin grupları taşıması da PCR analizini olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca primer çiftlerinin 3' uçlarının birbirine ya da primer içindeki bir bölgeye tamamlayıcı olması primer dimerlerin yada spesifik olmayan PCR ürünlerin oluşumuna sebep olmaktadır (Weeden ve ark., 1992). Primer dimerlerin molekül ağırlıkları PCR ürünlerinden çok daha düşük olduğu için jele potansiyel uygulandığında daha hızlı yürürler ve jelin en tepe

noktasında bir bant olarak kendilerini gösterirler. Primer konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda ise istenen üründen az miktarda oluşması jelde silik ya da eksik bant oluşumuna yol açmaktadır. Bu da özellikle RAPD-PCR metotu gibi bant polimorfizmlerinin belirlendiği ve çoklu bant istenildiği durumlarda analizin doğruluğunu etkilemektedir. Bu nedenle RAPD yönteminde primerin konsantrasyonunun DNA bantlarının üretilebilirliğini önemli derecede etkilediği söylenebilir. DNA bantlarının üretilebilirliğini artırmak amacıyla her bir primer için ayrı ayrı optimizasyon yapılması önerilmektedir.

Primerlerin Tm değerleri primerin PCR'da DNA'ya bağlanma sıcaklığı hakkında ön bilgi verir (White, 1997). Reaksiyon koşullarına bağlı olarak primerin DNA'nın tek iplikçiğine bağlanması Tm değerinin 2-3°C üzerinde çıkabilir. Bu nedenle primerlerin Tm değerlerinin hesaplanması gerekmektedir. Tm değerlerinin hesaplanması için kullanılan çeşitli formüller vardır. Bu çalışmada aşağıdaki formül kullanılmıştır.

Tm = [(A+T lerin sayısı) x 2 °C + (G+C lerin sayısı) x 4°C]

Primer seçiminde öncelikli olarak daha önce *Ginkgo biloba* türlerinde çalışılmış olanlar tercih edilmiş daha sonra pek çok bitki türünde yaygın olarak kullanılnan primer setleri seçilmiştir. OPA serilerinin genel olarak kullanımları bu primerlere komplementer gen bölegelerinin açık okunan bölgeler (Open Readin Frame, ORF) olarak bu genlerin sürekli eksprese edilmesi nedeniyle bitki DNA'ları üzerinde korunmuş bölegeler olmasındandır (Vural ve Dageri, 2009).

Primer konsantrasyonun belirlenmesi için yapılan çalışmalarda stok çözeltiler 10 pmol μL^{-1} olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu stok çözeltiden 1; 1,5; 2,0 ve 2,5 µL kullanılarak bant oluşumları gözlenmiştir (Çizelge 6.14). En iyi sonuç son çözeltide 0,8 pmol μL^{-1} primer konsantrasyonunda elde edilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarında konsantrasyona ilişkin test edilen parametreler ve elde edilen sonuçlar toplu olarak Çizelge 6.14'te özetlenmiştir. PCR koşullarının optimizasyonu sırasında primerin bağlanma sıcaklığı optimize edilirken her bir primer için Tm sıcaklığının ±5 °C aralığı ayrı ayrı denenerek en ideal bağlanma (annealing) sıcaklığı tesbit edilmiştir (Çizelge 6.15).

Çizelge 6.14. PCR bileşenlerinin optimizasyon sonuçları

Reaksiyon karışımı	**Bileşen**	**Konsantrasyon (µL 25 µL^{-1})**	**Sonuç**
$MgCl_2$ (2,5 µL)		2,0	Belirgin olmayan bant
Primer (4 µL)		**2,5**	**Amplifikasyon çok iyi**
dNTP (2,5µL)		3,0	Amplifikasyon iyi
Taq pol. (0,3 µL)	DNA	3,5	Smearlı bant
10 x Tampon (2,5 µL)			
DNA (2,5 µL)		2,0	Silik bant oluşumu
Primer (4 µL)		**2,5**	**Çok belirgin bantlar**
dNTP (2,5 µL)	$MgCl_2$	3,0	Belirgin bantlar
Taq pol. (0,1, 0,3 µL)		3,5	Belirgin ancak smearlı
10 x Tampon (2,5 µL)			
DNA (2,5 µL)		1,0	Amplifikasyon yok
$MgCl_2$ (2,5µL)		1,5	**Amplifikasyon çok iyi**
dNTP (2,5µL)	Primer	2,5	Amplifikasyon zayıf
Taq pol. (0,3 µL)		**3,5**	Amplifikasyon yok
10 x Tampon (2,5 µL)			
DNA (2,5 µL)		1,0	Amplifikasyon yok
$MgCl_2$ (2,5 µL)		1,5	Amplifikasyon yok
Primer (3,5 µL)	dNTP	**2,0**	**Amplifikasyon iyi**
Taq pol. (0,3 µL)		2,5	Amplifikasyon zayıf
10 x Tampon (2,5 µL)			
DNA (3,0 µL)		1 (0,5 U)	Silik bant
$MgCl_2$ (2,5 µL)	*Taq*	**1,25 (1,0 U)**	**Amplifikasyon iyi**
dNTP (2,0 µL)	polimeraz	1,5 (1,5 U)	Smearlı bant
Primer (3,5 µL)			
10 x Tampon (2,5 µL)			

Çizelge 6.15. Primerlerin bağlanma sıcaklıkları

Primer	Bağlanma sıcaklığı[1]	Bağlanma sıcaklığı[2]	Tm	Primer	Bağlanma sıcaklığı[1]	Bağlanma sıcaklığı[2]	Tm
OPA-1	34	35	39,5	**OPA-11**	34	36	39,5
OPA-2	35	35	39,5	**OPA-12**	34	37	39,5
OPA-3	35	37	39,5	**OPA-13**	35	36	43,6
OPA-4	35	36	39,5	**OPA-14**	36	36	39,5
OPA-5	34	37	39,5	**OPA-15**	34	36	39,5
OPA-6	36	36	39,5	**OPA-16**	36	37	39,5
OPA-7	35	35	39,5	**OPA-17**	35	37	39,5
OPA-8	34	36	39,5	**OPA-18**	34	35	39,5
OPA-9	35	37	43,6	**OPA-19**	35	36	39,5
OPA-10	36	36	39,5	**OPA-20**	-	-	39,5

[1]Türkiye orijinli yaş ve kuru ve Almanya orijinli yaş yapraklardan izole wee DNA'lara primerlerin bağlanması
[2]Türkiye orijinli kurutulmuş yapraklardan izole edilen DNA'ya primerlerin bağlanması

Agaroz jel elektroforezi: Agaroz, bir kırmızı alg türü olan *agar agar'*dan izole edilen lineer bir polisakkarittir. Agaroz sıcak suda çözünür ve soğutulduğu zaman karşılıklı hidrojen bağları ile çapraz bağlı bir polimer oluşturması ile gözenekli bir jel yapısı oluşur. Bu oluşum tersinirdir (Sambrook ve ark., 1989; Temizkan ve Arda, 2004). Agaroz konsantrasyonu jelin por çapını etkilemektedir. Bu durumda düşük agaroz konsantrasyonunda por çapı büyük iken yüksek agaroz konsantrasyonunda por çapı daha küçüktür. DNA molekülünün primerlerle polimeraz zincir reaksiyonunda çoğaltılmasından elde edilen DNA fragmentlerinin molekül ağırlıklarına bağlı olarak jelde ayrılması için jel konsantrasyonu %0,5-2 arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilmektedir. Bu çalışmada, izole edilen yüksek molekül ağırlıklı DNA moleküllerinin por çapı daha büyük olan %1'lik agarozda, PCR ürünlerinin ise daha küçük porlu %1,5-2'lik agarozda elektroforez tankında 100-150 V ve 50-75 mA'de 1-2 saat yürütülerek fragmentlerine ayrılması sağlanmıştır. DNA jelde görüntülenmek üzere etidium bromürle (EB) boyanmıştır. UV ışık altında fluoresan etki gösteren etidium bromür kullanımı ile çok düşük konsantrasyonlarda (1-10 ng) DNA ve PCR sonrası

oluşan DNA fragmentlerinin jeldeki yerleri jel üzerinde gösterilmiş ve molekül ağırlıkları da jelde 100 bp ve 1 kb'lık DNA markırlar yürütülerek belirlenmiştir.

Çizelge 6.16. Almanya ve Türkiye orijinli *Ginkgo biloba* DNA'larının PCR bantları

Almanya	Bant Sayısı	ORTAK BANTLAR	Türkiye	Bant Sayısı
OPA-1	6	0	OPA-1	6
OPA-2	4	1	OPA-2	2
OPA-3	3	2	OPA-3	3
OPA-4	6	4	OPA-4	4
OPA-5	5	0	OPA-5	3
OPA-6	5	5	OPA-6	5
OPA-7	7	7	OPA-7	7
OPA-8	10	10	OPA-8	10
OPA-9	8	8	OPA-9	8
OPA-10	4	4	OPA-10	4
OPA-11	6	6	OPA-11	6
OPA-12	4	4	OPA-12	4
OPA-13	3	3	OPA-13	3
OPA-14	2	2	OPA-14	2
OPA-15	2	2	OPA-15	2
OPA-16	3	2	OPA-16	5
OPA-17	5	5	OPA-17	5
OPA-18	6	4	OPA-18	3
OPA-19	5	2	OPA-19	2
OPA-20	Amp. yok	-	OPA-20	Amp. Yok

6.3.4. RAPD polimorfizmi ve genetik mesafenin tespiti

Almanya ve Türkiye'den temin edilmiş olan *Ginkgo biloba*'nın DNA izolasyonundan sonra RAPD-PCR için reaksiyon koşullarının optimize edilmesi

amacıyla her bir DNA örneği her bir primerle optimum koşullarda PCR yapılarak çoğaltılmaya çalışılmıştır. Bunların bazıları Şekil 6.41 ve 6.42'de gösterilmiştir.

Kullanılan bu primerlerden OPA-20 ile amplifikasyon göstermemiş olup, primerlerden amplifikasyon gösterenler ve Çizelge 6.16'da gösterilmiştir. RAPD-PCR sonucu oluşan kısa zincirli DNA fragmentleri olan PCR ürünlerinin bantları jel elektroforez görüntüleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir.

Genetik analizler için çekilen jel fotoğrafları incelenerek RAPD-PCR bantları monomorfik ve polimorfik bantlar olarak değerlendirilmiş ve kullanılan her primer için, bireye özgü olarak tespit edilen her bant bir lokus olarak tanımlanmıştır. Her bir RAPD bandının varlığı 1, yokluğu ise 0 olarak kodlanmıştır. Bantlardan sadece güvenilir olanları değerlendirilmiştir. Dendrogramların oluşturulmasında NTSYS (Numerical Taksonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0) paket programı kullanılmıştır (Rohlf, 1998). Öncelikle Jaccard (1908) yöntemi kullanılarak bir benzerlik matriksi oluşturulmuştur. Bu matriks kullanılarak UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average*) metotu ile kümeleme (Cluster) analizleri yapılmış ve dendrogramlar elde edilmiştir. Dendrogramların benzerlik matriksi Mantel Matriks Uyum Testi (*Mantel's matrix correspondence test*) ile belirlenmiştir (Mantel, 1967). Elde edilen veri matrisi ile bireyler arasında genetik benzerlik oranı, polimorfizm oranı ve populasyonların genetik mesafeleri Nei'nin (1972) UPGMA dendogramı kullanılarak hesaplanmıştır.

Bantların okunması ve değerlendirilmesinde net olarak oluşan DNA bantları değerlendirmeye alınırken, oluşan silik ya da smear'lı (kırık) bantlar değerlendirme dışı bırakılmıştır. Almanya ve Türkiye orijinli *Ginkgo biloba* genotipleri arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan 20 adet RAPD primer bazılarının polimorfizm seviyelerinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 6.16'dan elde dilen verilere göre polimorfizm oranının yüksek olması Almanya ve Türkiye orijinli *Ginkgo biloba* genotipleri arasındaki iyi bir polimorfizm olduğunu göstermiştir. Buna göre Almanya orijinli DNA'nın 20 adet primer ile çoğaltılması sonucu jelde toplam 87 bant görülmüş yani 87 adet DNA parçası üretilmiştir. Türkiye orijinli DNA ise 84 adet bant vermiştir. Bu bantlardan bazıları her iki DNA'da da çoğaltılarak yaşlaşık 52 monomorfik bant elde edilmiştir. Sonuç olarak bantlardan yaklaşık 47 tanesi polimorfiktir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

7.1. Sonuç

Türler arasındaki geleneksel taksonomi (sınıflandırma) ve filogeni (akrabalık ilişkileri) çoğunlukla organizmaların morfolojik ve anatomik özelliklerine dayanır. Ancak günümüzde moleküler biyoloji tekniklerinin geliştirilmesi ile kimyasal özelliklerine bakılarak ayırt edilemeyen bazı türlerin ve özellikle bitki genotiplerinin tesphiti kolaylaşmıştır. Aynı cins-tür veya varyeteye ait olan organizmalar farklı yaşam ortamlarında (habitatlarda) farklı morfolojik ve anatomik özellikler gösterebilmektedirler. Doğal habitatlar içinde genomun yapısı üzerine çevre şartlarının etkisi olmaktadır. Bu nedenle genotip, tür belirleme ve tanımlamada fenotipten daha kesin sonuçlar vermektedir. Kısaca genetik özellikler, kimyasal analizlere dayalı olan morfolojik ve anatomik özellikleri kesinleştirmeye yardımcı olmaktadır (Tanksley, 1983; Tanksley ve ark., 1989; Uzun, 2004).

Morfolojik markırlar bilindiği gibi genotipik tanımlama amacıyla kullanılmaktadır. Morfolojik markırlar kolay elde edilebilmelerine karşın, iklim değişikliği, bitkinin yetişme koşulları ve toprak yapısı gibi çevresel faktörlerden kolayca etkilenebilmektedirler. Özellikle farklı ülkelerde yetişen aynı tür bitkilerin çevresel faktörlerden oldukça fazla etkiledikleri ve genotipik olarak çeşitlilik gösterdikleri pek çok çalışma ile kanıtlanmıştır (Weeden, 1989; Welsh ve Clelland, 1990; Weissing, 1995). Bu genotipik özellikler direk olarak bitkilerin morfolojik karakterlerine yansımaktadır. Ancak fenotipik özelliklerin genetik kontrol mekanizmasının tam bilinmemesi, yetersiz varyasyon ve aranılan fenotipik özelliklerin uygun büyüme aşamasında ortaya çıkışının uzun zaman alması, bitki ıslahçılarını daha hızlı ve doğru karar vermede, DNA markır sistemlerine yönelten sınırlayıcı etkenlerdir. Özellikle çalışılan bitki materyalinin morfolojik olarak diğer bazı bitkilere benzerliği kullanılan genotiplerin gerçekte farklı olup olmadığı konusunda yanılgıya düşürmektedir. Bu durumda çalışılan genotiplerin farklı yöntemlerle karakterizasyona tabi tutulması gerekmektedir. Bu nedenle bitki ıslahı çalışmalarında bitkisel kaynakların hem morfolojik hem de genetik olarak tanımlanması bu gen kaynaklarının daha hızlı ve etkin bir şekilde karakterize edilmesine ve kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Genetik çeşitliliğin belirlenmesinde, morfolojik, biyokimyasal ve moleküler markırlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Moleküler markırlar DNA düzeyinde izlenüebilen karakterlerdir. Bu karakterler markır olarak

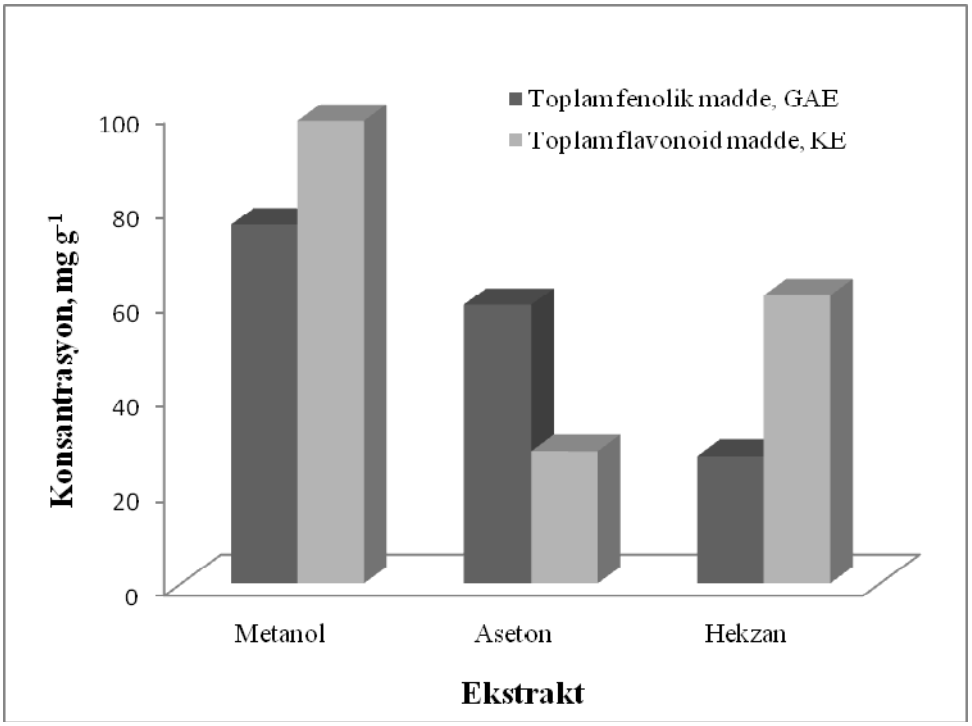
isimlendirilirler ve PCR metodu ile laboratuvar şartlarında çoğaltılıp bireyler arasındaki DNA polimorfizmini belirlemede yaygın olarak kullanılırlar. Bununla birlikte gen kaynaklarının tespiti ve korunması için bitkilerin hızlı ve doğru olarak tanımlanması gerekmektedir. RFLP gibi hibridizasyon esaslı ve RAPD, ISSR ve AFLP gibi PCR esaslı geliştirilmiş DNA tekniklerinin bu amaçla kullanılabilirliği pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Williams ve ark., 1990; Dodds ve Watanabe, 1990).

Bu çalışmada, Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba*'nın kimyasal ve moleküler olarak tanımlanması amacıyla morfolojik markır olarak *Ginkgo biloba* ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri belirlenmiş ve ikincil metabolitleri ile yağ asidi bileşimleri tanımlanmıştır. Moleküler tanımlama için ise RAPD-PCR markırı kulanılarak 20 adet primer ile *Ginkgo biloba*'nın moleküler karakterizasyonu yapılmaya çalışılmıştır. Elde edilen çoğaltım ürünleri Almanya orijinli *Ginkgo biloba* ile karşılaştırılmıştır. Böylece endemik olmamasına rağmen Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba*'nın endemik olduğu bölgelerde gösterdiği morfolojik ve moleküler karakterlerle benzerlik gösterip göstermediği ortaya koyulmuştur. Bu çalışma sonucunda elde edilen bilgiler ile moleküler filogeniye dayalı (akrabalık ilişkileri) cinslerin taksonomik problemlerinin çözümlenmesi, moleküler ıslah amaçlı çalışmaların başarılması, tür/gen erozyonunun önlenmesi ve biyoçeşitliliğin sürdürülebilir anlamda korunabilmesi alanlarına katkıda bulunulması hedeflenmiştir. Özellikle *Gingko biloba* gibi dünyada yüzyıllardır canlılığını sürdüren ve türünün ayakta kalan son örneği olan, bununla birlikte moleküler ve biyokimyasal yapı bakımından eşsiz özelliklere sahip olması nedeniyle 1945 yılında Hiroşimaya altılan atom bombasından sonra o bölgede yaşayabilen ve yeniden sürgün vererek canlılığını sürdüren bu eşsiz bitkinin özelliklerinin tanımlanarak Türkiye ikliminde yetiştirilmesi, korunması ve yaygınlaştırılması konusunda yapılabilecek çalışmalara öncülük etmesi de bu çalışmanın bir diğer amacıdr (http://kwanten.home.xs4all.nl/hiroshima.htm).

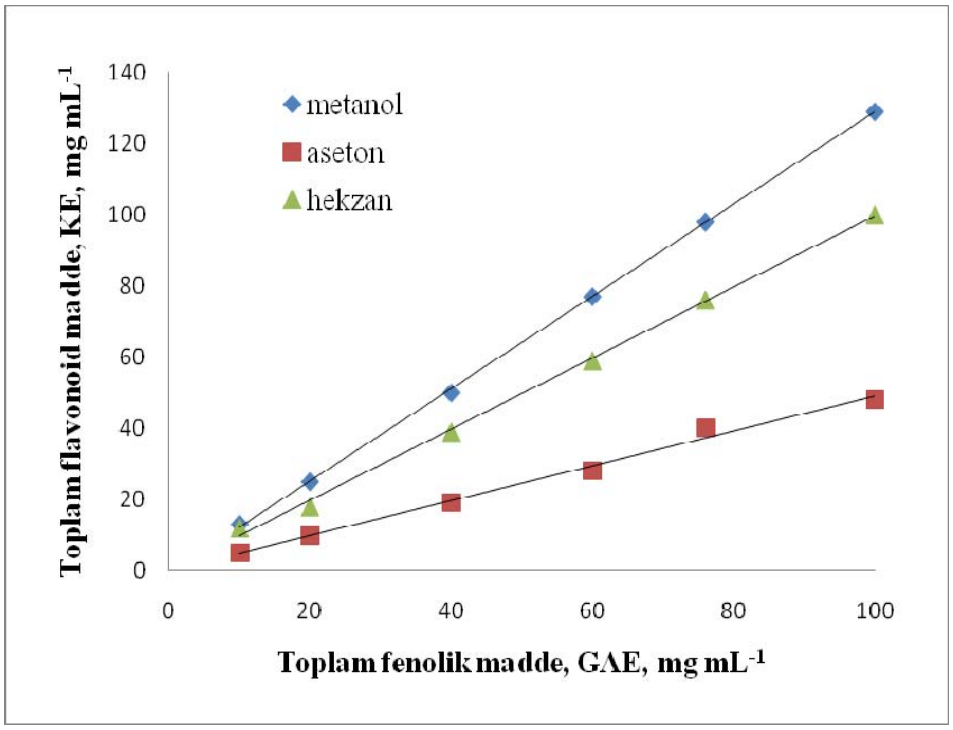
Çalışmada morfolojik karakterlerin incelenmesine yönelik olarak Antalya'da yetişen *Ginkgo biloba* ağacının yapraklarının metanol, hekzan ve aseton ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları tayin edilmiştir. Bunların yanında her bir ekstraktın DPPH• radikalinin süpürme etkisi, β-karoten lineolik asit emülsiyon sistemi ile antioksidan aktiviteleri, CUPRAC yöntemi ile bakır indirgeme kapasiteleri ve FRAP yöntemi ile demiri indirgeme gücü, metal şelatlama ve hidrojen peroksit giderme aktiviteleri ayrı ayrı belirlenmiştir. Bu antioksidan aktivite tayin yöntemleri uygulanarak belirlenen *Ginkgo biloba*'nın antioksidan aktiviteleri farmasötik ve gıda sanayinde

yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanlardan BHA, BHT, rutin, kuersetin ve troloksun antioksidan özellikleri ile karşılaştırılmıştır.

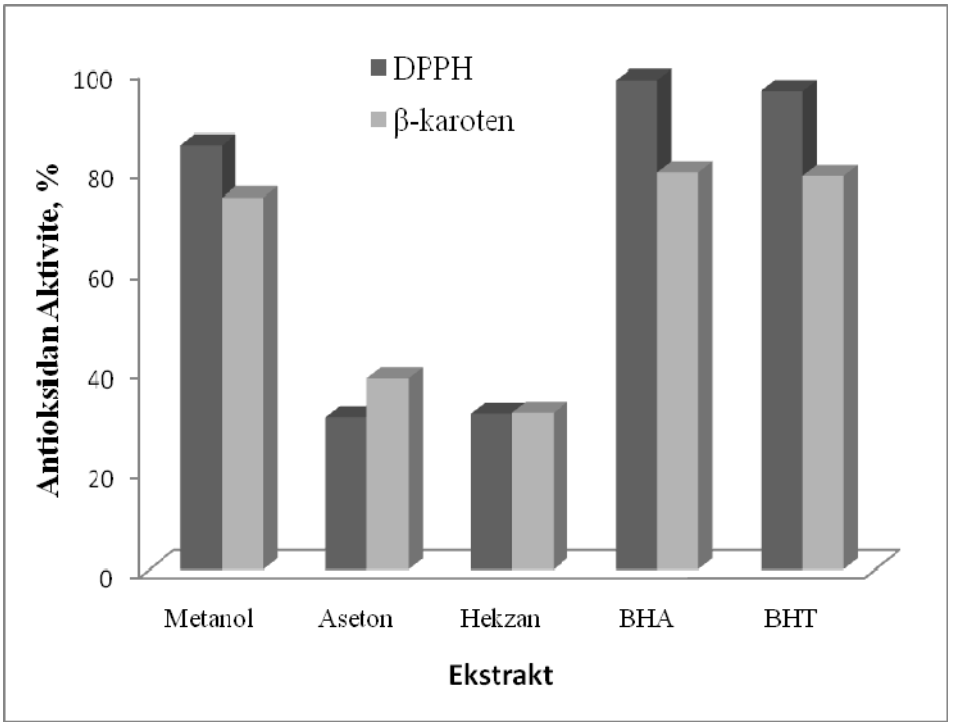
Ginkgo biloba yaprakları içerisinde dünyada 6500'den fazlası tanımlanmış pek çok fenolik ve flavonoid maddeden bir kısmının olduğu düşünüldüğünde her birinin konsantrasyon değerlerini tek tek hesaplamak mümkün değildir. Bu nedenle literatürler esas alınarak toplam fenolik madde bitki içerisinde gallik aside ve toplam flavonoid madde ise yine bitki içerisinde kuersetin var olduğu düşünülenerek tayin edilmiştir. Bu amaçla *Ginkgo biloba*'nın metanol, aseton ve hekzan ekstraktlarının ihtiva ettiği toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları sırasıyla gallik aside (GAE) ve kuersetine (KE) eşdeğer olarak hesaplanarak Şekil 7.1'de tüm ekstraktların ihtiva ettiği toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları karşılaştırılmış ve metanol ekstraktının aseton ve hekzan ekstraktından daha fazla miktarda fenolik (76, $mg\,g^{-1}$ GAE) ve flavonoid madde (95 $mg\,g^{-1}$ KE) ihtiva ettiği gözlenmiştir (Çizelge 7.1). Şekil 7.2 ise her bir ekstrattaki toplam fenolik madde miktarının toplam flavonoid madde miktarı ile doğru orantılı olarak arttığını göstermiştir.



Şekil 7.1. *Ginkgo biloba* ekstraktlarında bulunan toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarlarının karşılaştırılmasına ilişkin grafik



Şekil 7.2. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarlarının toplam flavonoid madde miktarları ile değişimi gösteren grafik



Şekil 7.3. *Ginkgo biloba* ekstraktları ve standart antioksidanların DPPH ve β-karoten yöntemlerinden elde edilen antioksidan aktivitelerinin karşılaştırılmasına ilişkin grafik

Ginkgo biloba ekstraktlarının 0,001-2 $mg\,mL^{-1}$ konsantrasyon aralığında DPPH• radikalini süpürme oranları yüzde olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlardan DPPH radikalinin %50'ni söndüren ekstrakt miktarları (IC_{50}) belirlenmiştir. Şekil 7.3'te 1 $mg\,mL^{-1}$ konsantrasyonda ekstrakt ve standardın hesaplanan DPPH• süpürme aktiviteleri ile 2 $mg\,mL^{-1}$ konsantrasyondaki β-karoten-linoleik asit sisteminde göstermiş oldukları antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Çizelge 7.2'ye göre her iki yöntemle elde eldilen antioksidan aktivite değerleri karşılaştırıldığında *Ginkgo biloba'*nın metanol ekstraktının BHT ve BHA'nın aktivitelerinden düşük ancak diğer ekstraktlardan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Buna göre DPPH radikalini süpürme aktiviteleri sırasıyla metanol > BHT > BHA > hekzan > aseton iken β-karoten-linoleik asit sistemindeki antioksidan aktiviteleri sırasıyla BHT > BHA > metanol > aseton > hekzan'dır. Bu sıralamaya bağlı olarak elde edilen DPPH radikalini süpürme aktivite değerleri sırasıyla %98,1±0,6, %95,8±1,0, %85,0±3,0, %30,5±1,8, %31,2±3,2 iken DPPH konsantrasyonuna yarıya indiren IC_{50} değerleri ise 0,035±0,007, 0,020±0,001, 2,36±0,01, 3,55±0,49 ve 4,30±0,14 $mg\,mL^{-1}$'dir. Düşük IC_{50} değeri yüksek antioksidan aktiviteyi göstermektedir. β-karoten lineolik asit yönteminden elde edilen sonuçlar detaylı olarak incelendiğinde ise antioksidan aktivite değerlerinin sırasıyla %79,5±2,0 (BHA), %78,8±2,1 (BHT), %74,5±2,3 (metanol), %38,2±1,3 (aseton) ve %31,4±2,7 (hekzan) olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 7.1. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının ihtiva ettiği toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları

E**ksrakt**	**Toplam fenolik madde*,[1] (mg g^{-1} GAE)**	**Toplam flavonoid madde*,[2] (mg g^{-1} KE)**
Hekzan ekstraktı	27,6±3,1[a]	60,95±1,76[a]
Aseton ekstraktı	59,4±1,6[b]	28,30±1,13[c]
Metanol ekstraktı	76,0±2,2[c]	98,50±4,31[b]

***** 3 analizin ortalaması, analize ait standart sapma ve istatiksel analizi (*a-c*).
[1] Gallik aside eşdeğer (GAE) toplam fenolik madde
[2]Kursetine eşdeğer (KE) toplam flavonoid madde

Çizelge 7.2'de görüldüğü gibi DPPH ve β-karoten lineolik asit sistemine ilişkin antioksidan aktivitelerinin toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları ile doğru orantılı olarak artmıştır. Bunun nedeni ekstraktlarda bulunan fenolik bileşikler ve

flavonoidlerin hidroksil gruplarındaki hidrojenlerini kolaylıkla vermeleridir. Fenolik bileşiklerdeki hidroksilin oksijeni ile hidrojen arasındaki bağ fenol radikalinin kararlılığından dolayı kolaylıkla homolotik olarak parçalanabilir ve üzerinde bir tane elektron bulunduran hidrojen verebilir. Böylece ekstrakt içerisinde bulunan fenolik yapılı bileşikler radikali söndürürken kendileri daha kararlı birer radikale dönüşmektedirler. Bu nedenle ekstraktlarda bulunan toplam fenolik ya da flavonoid madde miktarı arttıkça ekstraktların antioksidan kapasiteleri artmaktadır. Sonuç olarak metanol ekstraktı aseton ve hekzan ekstraktlarından daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Bu metanol ekstraktının daha fazla fenolik ve flavonoid madde ihtiva etmesinden kaynaklanmaktadır.

Ginkgo biloba ekstraktlarının demir indirgeme gücü (FRAP) troloksa eşdeğer olarak tayin edilmiştir. Ancak hekzan ekstraktı çözelti sisteminde çözünmediği için yalnızca metanol ve aseton ekstraktlarının troloksa eşdeğer antioksidan kapasite değerleri hesaplanmıştır. Çizelge 7.2'de verilen sonuçlara göre 1 gram metanol ekstraktının antioksidan kapasitesi 0,87±0,1

7 mg TEAK iken asetonun 0,79±0,11 mg TEAK'dır. Sonuç olarak aseton ekstraktının metanol ekstraktından daha düşük antioksidan kapasitesine sahip olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 7.2. *Ginkgo biloba* ekstraktları ve standartların DPPH süpürme aktiviteleri ve β-karoten-linoleik asit sistemindeki antioksidan aktiviteleri ile toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları

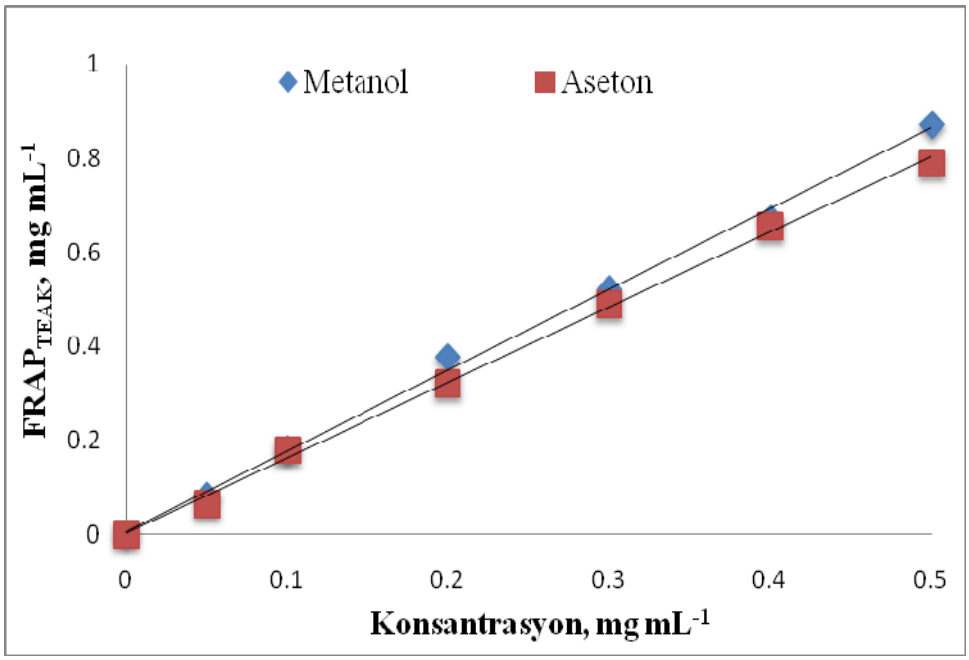
Eksrakt	**DPPH**[1,*] **(%)**	**AA**[2,*] **(%)**	**Fenolik madde**[2,*] **(mg g^{-1} GAE)**	**Flavonoid madde**[3,*] **(mg g^{-1} KE)**
Hekzan ekstraktı	31,2±3,2^{a}	31,4±2,7^{b}	27,6±3,1^{d}	60,95±1,76^{b}
Aseton ekstraktı	30,5 ±1,8^{a}	38,2±1,3^{d}	59,4±1,6 ^{b}	28,30±1,13^{c}
Metanol ekstraktı	85,0±3,0^{b}	74,5±2,3^{c}	76,0±2,2^{d}	98,50±4,31^{b}

***** 3 analizin ortalaması, analize ait standart sapma ve istatiksel analizi (*a-c*)
1 DPPH, 1 mg mL^{-1} ekstrakt ya da standartların DPPH süpürme aktivitesi
*2*AA, 2 mg mL^{-1} ekstrakt ya da standartların β-karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan aktiviteleri
3 Gallik aside eşdeğer (GAE) toplam fenolik madde
4 Kursetine eşdeğer (KE) toplam flavonoid madde

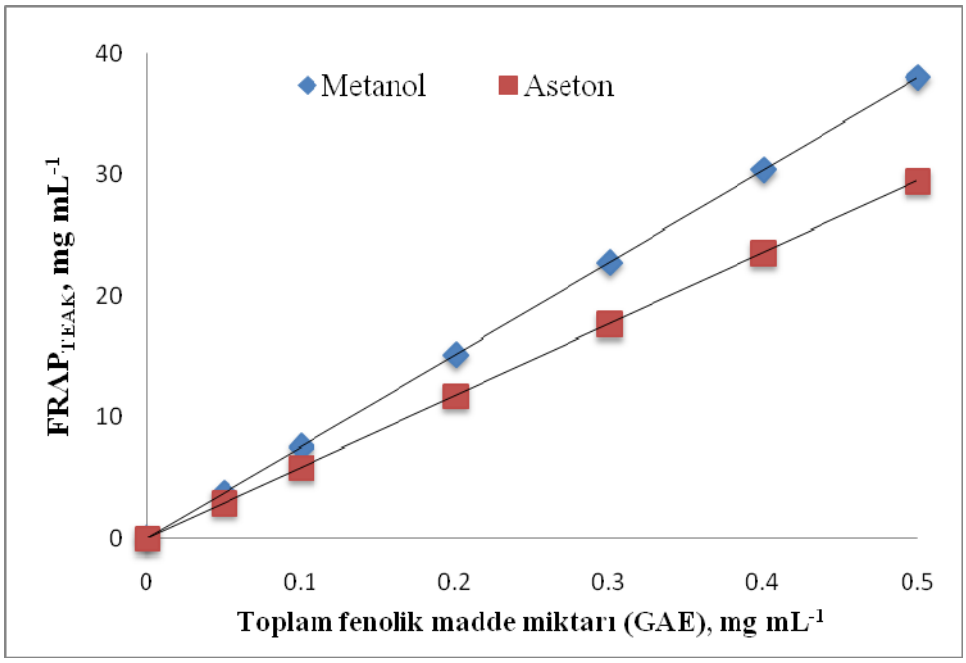
Şekil 7.4 antioksidan kapasitenin her iki ekstrakt içinde konsantrasyon artışı ile doğru orantılı olarak arttığını göstermiştir. Bununla birlikte ekstraktların toplam fenolik madde konsantrasyonlarına bağlı olarakta antioksidan kapasitenin arttığı ve metanol

ekstraktının diğer metotlarda olduğu gibi toplam fenolik madde miktarına bağlı olarak daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 7.5). Bununla birlikte ekstraktların demiri indirgeme gücü ele alındığında metanol ve aseton ekstraktlarının 0,05-0,5 $mgmL^{-1}$ konsantrasyon aralığında 700 nm'deki absorbans değişimine bağlı olarak indirgeme güçlerinin BHT, BHA ve α-tokoferolle kıyaslandığında, her iki ekstraktın demir indirgeme gücünün bu standartlarınkinden daha düşük olduğu gözlenmiştir.

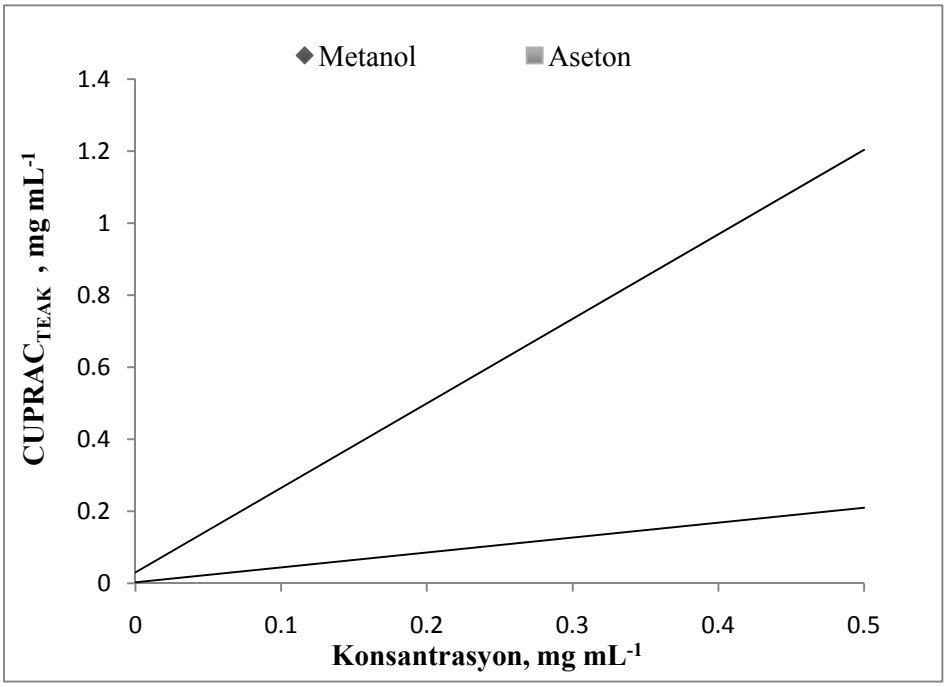
Çizelge 7.3 metanol ve aseton ekstraktlarına ilişkin FRAP değerlerinin yanında CUPRAC yöntemi ile ekstraktların Cu(II) iyonunu Cu(I)'e indirgeyen antioksidan kapasite tayin sonuçlarını da göstermektedir. Buna göre ekstraktların bakırı indirgeme kapasiteleri de 450 nm'deki absorbansına bağlı olarak troloksa eşdeğer olarak hesaplanmıştır. 1 gram ekstraktta tayin edilen troloksa eşdeğer antioksidan kapasite değerleri metanol ekstraktı için 1,2±0,7 mg TEAK iken ve aseton ekstraktı için ise 0,21±0,4 mg TEAK olarak bulunmuştur. Şekil 7.6, her iki ekstraktın antioksidan kapasitelerinin ekstrakt konsantrasyon ile doğru orantılı bir şekilde artışını göstermektedir. Şekil 7.7 ve Şekil 7.8 ise antioksidan kapasitenin metanol ve aseton ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarlarındaki artış ile de doğru orantılı olarak arttığını göstermektedir.



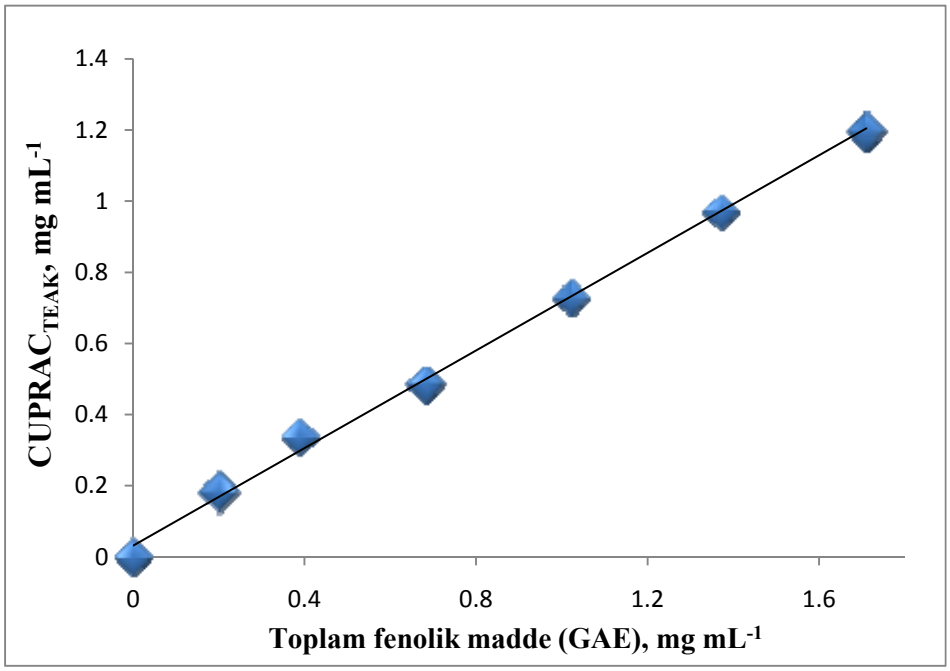
Şekil 7.4. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının troloksa eşdeğer antioksidan kapasitelerinin ($FRAP_{TEAK}$) ekstrakt konsantrasyonuyla değişimini gösteren grafik



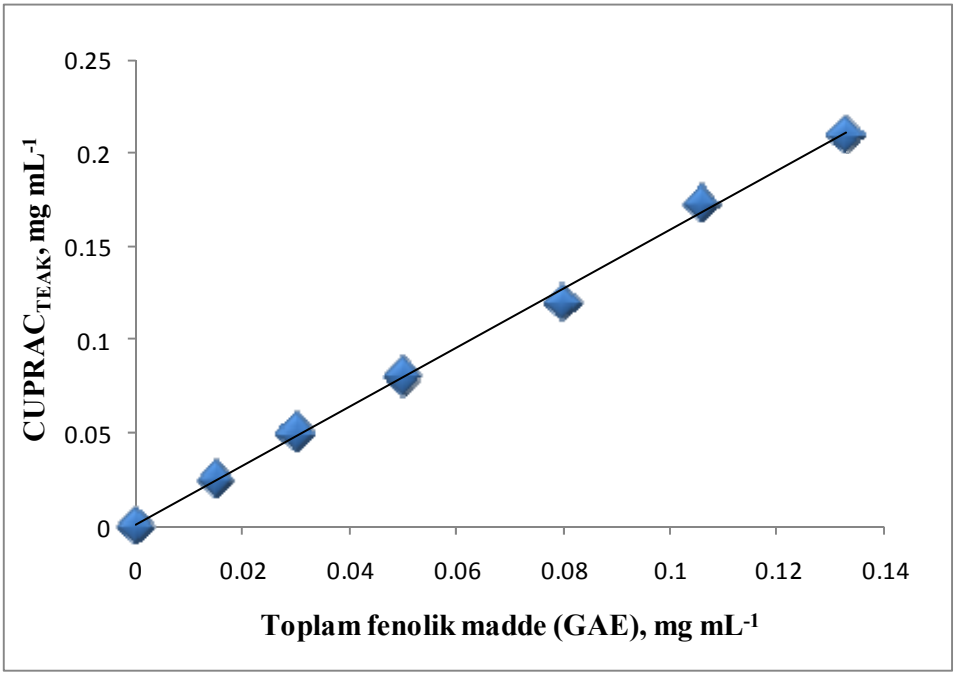
Şekil 7.5. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının troloksa eşdeğer antioksidan kapasitelerinin ($FRAP_{TEAK}$) toplam fenolik madde miktarları (GAE) ile değişimini gösteren grafik



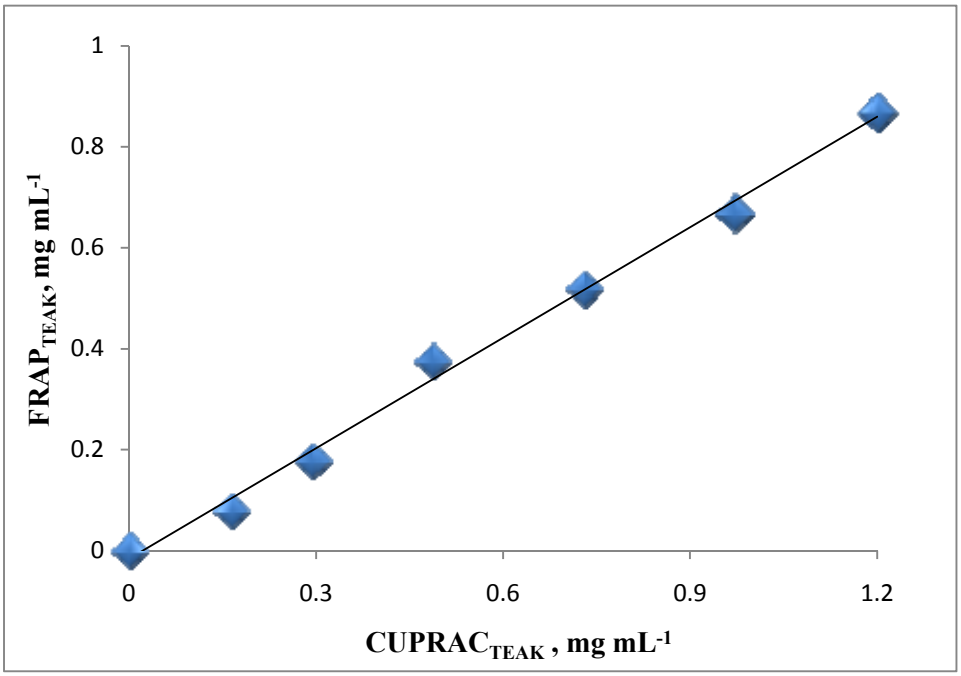
Şekil 7.6. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının troloksa eşdeğer antioksidan kapasitelerinin ($CUPRAC_{TEAK}$) ekstrakt konsantrasyonu ile değişimini gösteren grafik



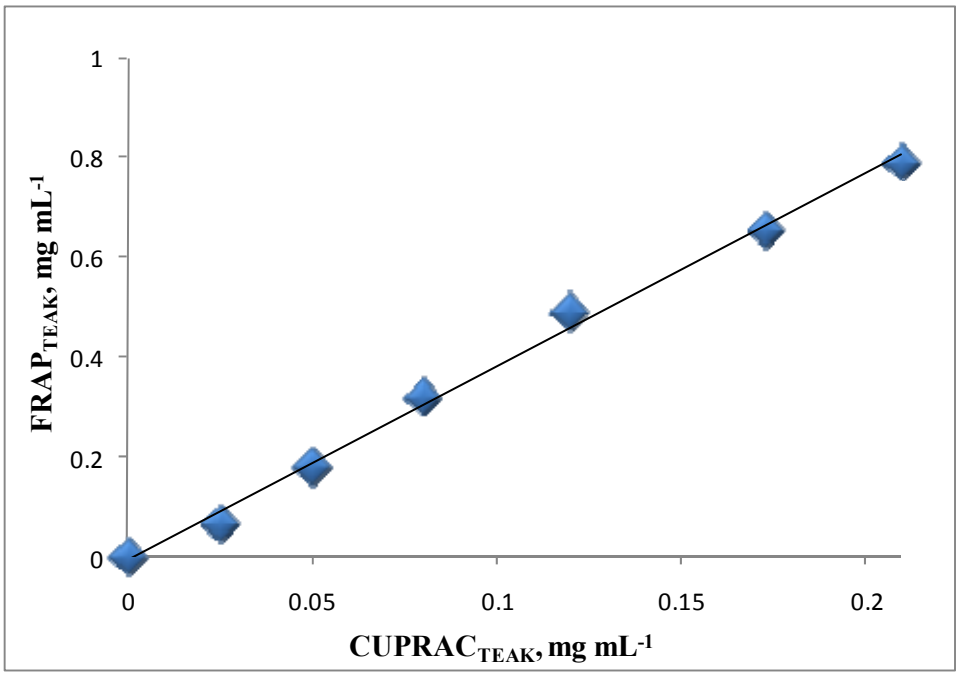
Şekil 7.7. *Ginkgo biloba*'nın metanol ekstraktının troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesinin ($CUPRAC_{TEAK}$) gallik aside eşdeğer (GAE) toplam fenolik madde miktarı ile değişimini gösteren grafik



Şekil 7.8. *Ginkgo biloba*'nın aseton ekstraktının troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesinin ($CUPRAC_{TEAK}$) gallik aside eşdeğer (GAE) toplam fenolik madde miktarı ile değişimini gösteren grafik

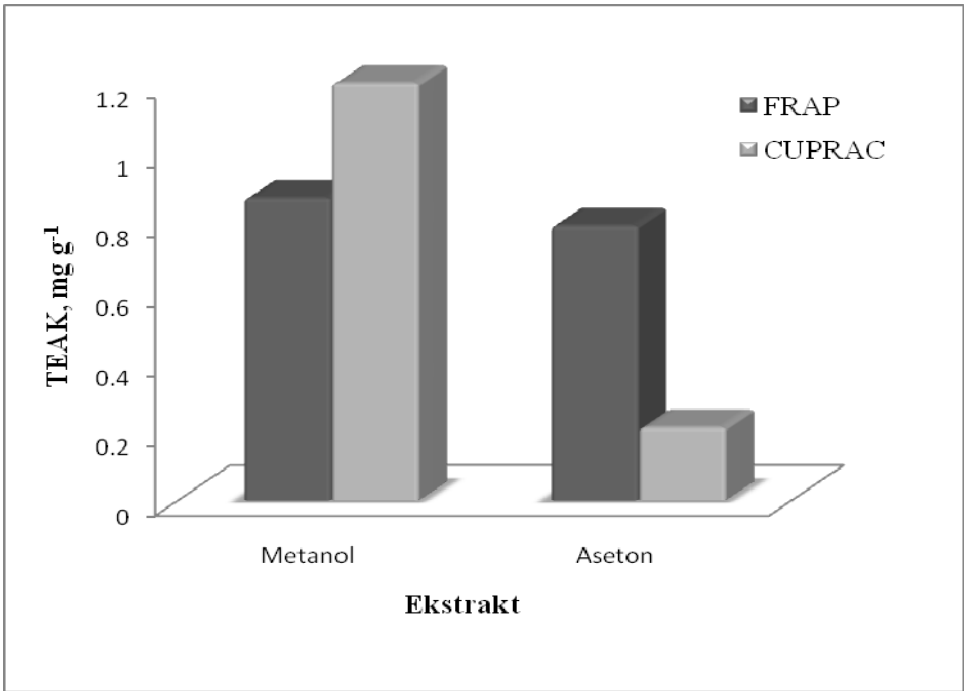


Şekil 7.9. *Ginkgo biloba*'nın metanol ekstraktının troloksa eşdeğer bakır indirgeme kapasitesinin ($CUPRAC_{TEAK}$) troloksa eşdeğer emir indirgeme kapasitesi ($FRAP_{TEAK}$) ile değişimini gösteren grafik



Şekil 7.10. *Ginkgo biloba*'nın aseton ekstraktının troloksa eşdeğer bakır indirgeme kapasitesinin ($CUPRAC_{TEAK}$) troloksa eşdeğer demir indirgeme kapasitesi ($FRAP_{TEAK}$) ile değişimini gösteren grafik

.



Şekil 7.11. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının troloksa eşdeğer bakır indirgeme kapasiteleri ile ($CUPRAC_{TEAK}$) demir indirgeme kapasitesilerinin ($FRAP_{TEAK}$) karşılaştırılmasına ilişkin grafik

Şekil 7.9 ve 7.10 sırasıyla *Ginkgo biloba*'nın metanol ve aseton ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ile troloksa eşdeğer demir indirgeme gücü ve bakır indirgeme kapasiteleri arasında korelasyon olduğu göstermektedir. Şekil 7.11 ise *Ginkgo biloba* ekstraktlarının troloksa eşdeğer bakır indirgeme kapasitesinin ($CUPRAC_{TEAK}$) demir indirgeme kapasitesi ($FRAP_{TEAK}$) ile değişimini göstermektedir. Buna göre her iki yöntemle de metanol ekstraktının antioksidan kapasitesi asetonunkinden daha yüksektir.

Çizelge 7.3'te görüldüğü gibi *Ginkgo biloba* ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinde olduğu gibi indirgeme kapasitelerinin de toplam fenolik ve flavonoid madde miktarındaki artışa bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. İndirgeme gücü fenolik madde ihtiva eden birçok ekstraktın antioksidan aktvite göstermesinde önemli bir etken olabilir (Gulcin, 2008). Ancak herhangi bir saf madde, farklı mekanizmalar üzerinden antioksidan özellik gösterebilir. Antioksidan bileşikler antioksidatif özelliklerini geçiş metallerini bağlama, peroksitleri parçalama ve radikal giderme gibi değişik mekanizmalar ile ortaya koyabilirler (Diplock, 1997).

Çizelge 7.3. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının troloksa eşdeğer antioksidan kapasiteleri

Eksrakt	FRAP[1,*] (mg TEAK g^{-1})	CUPRAC[2,*] (mg TEAK g^{-1})	Fenolik madde[3,*] (mg g^{-1} GAE)	Flavonoid madde[4,*] (mg g^{-1} KE)
Aseton ekstraktı	0,79±0,11^{b}	0,21±0,40^{a}	59,4±1,6^{b}	28,30±1,13^{a}
Metanol ekstraktı	0,87±0,17^{a}	1,20±0,70^{b}	76,0±2,2^{c}	98,50±4,31^{b}

***** 3 analizin ortalaması, analize ait standart sapma ve istatiksel analizi (*a-b*)
[1]Troloksa eşdeğer demir indirgeme kapasitesi ($FRAP_{TEAK}$)
[2]Troloksa eşdeğer bakır indirgeme kapasitesi ($CUPRAC_{TEAK}$)
[3]Gallik aside eşdeğer (GAE) toplam fenolik madde
[4]Kuersetine eşdeğer (KE) toplam flavonoid madde

Ginkgo biloba ekstraktlarının 0,05-0,5 $mg mL^{-1}$ konsantrasyon aralığında hidrojen peroksit giderme aktiviteleri ile metal şelatlama aktiviteleri araştırılmıştır. Şekil 7.12'de görüldüğü gibi metanol ekstraktının hem H_2O_2 giderme aktivitesi hem de metal şelatlama aktivitesinin aseton ekstraktından yüksek olduğu bulunmuştur. Çizelge 7.4'te verilen sonuçlara göre metanolün hidrojen peroksit giderme aktivitesi %89,4±1,2 ve asetonun %25,3±0,6'dır. Bununla birlikte metanol ekstraktının metal şelatlama aktivitesi %89,1±1,1 iken aseton ekstraktının %48,1±0,8'dir. Çizelge 7.4'te her iki yöntemle elde eldilen antioksidan aktivite değerleri toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları ile karşılaştırıldığında her iki durumda da yüksek fenolik ve flavonoid madde miktarlarına bağlı olarak metanol ekstraktının yüksek aktivtelerinin gösterdiği gözlemlenmiştir. Metal şelatlama aktivitesi bitkilerin ihtiva ettikleri flavonoid miktarı ile doğrudan ilişkilidir. Çünkü metal şelatlama metodunda kulanılan demir daha çok flavonoidlerle kompleks oluşturmaktadır.

Bilindiği gibi fenolik ve flavonoid maddeler bitkilerin antioksidan özellikleriyle doğrudan ilişkilidir. Fenolik yapılarda bulunan -OH gruplarının polaritesi yüksek olduğundan polaritesi yüksek olan çözücülerde daha fazla çözünürler. Bu çalışmada kullanılan metanol, aseton ve hekzan polariteleri bakımından incelendiğinde metanolün asetondan, asetonun ise hekzandan daha yüksek polariteye sahip olduğu görülür. Fenolik yapılarında polaritelerinin yüksek olması metanolün daha fazla fenolik ve flavonoid maddeyi çözerek ekstrakte etmesini sağlamıştır. Aseton ise polardır ancak metanol kadar yüksek polariteye sahip değildir. Öte yandan aseton hekzandan daha yüksek polariteye sahiptir. Polaritelerine bağlı olarak bu çözücülerle ekstrakte edilen

Ginkgo biloba yapraklarının antioksidan aktivite ve indirgeme gücü sırasıyla metanol > aseton > hekzan'dır.

Çizelge 7.4. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının hidrojen peroksit giderme ve metal şelatlama aktiviteleri ile toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları

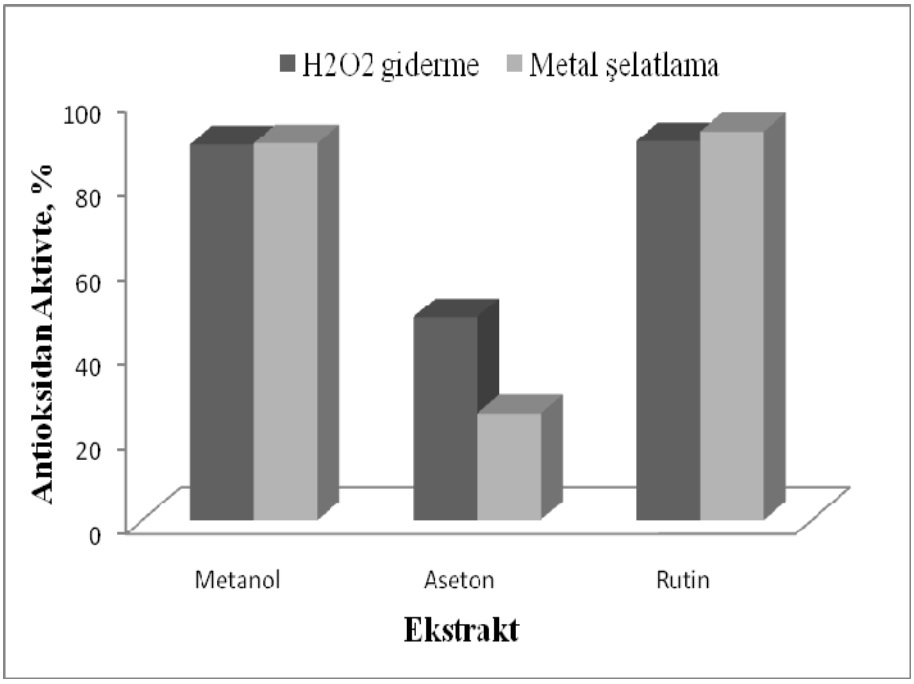
Eksrakt	H_2O_2[1,*] (%)	Metal şelatlama[1,*] (%)	Fenolik madde[2,*] (mg g^{-1} GAE)	Flavonoid madde[3,*] (mg g^{-1} KE)
Aseton ekstraktı	25,3 ±0,6 [a]	48,1 ±0,8 [b]	59,4±1,6 [c]	28,30±1,13[a]
Metanol ekstraktı	89,4 ±1,2[b]	89,1±1,1 [c]	76,0±2,2[b]	98,50±4,31[b]

***** 3 analizin ortalaması, analize ait standart sapma ile istatiksel analiz i(*a-c*)
[1]0,5 mg mL^{-1} ekstraktın hidrojen peroksit giderme ve metal şelatlama aktiviteleri
[2]Gallik aside eşdeğer (GAE) toplam fenolik madde
[3]Kuersetine eşdeğer (KE) toplam flavonoid madde

Sonuç olarak en yüksek aktiviteye sahip olan ekstraktın metanol ekstraktı olması onun ihtiva ettiği fenolik madde miktarına atfedilir. Bunu doğrulayan diğer bir yaklaşımsa *Ginkgo biloba* ekstraktlarının bazı fenolik bileşiklerin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile analizinde elde edilen sonuçlardır. Ancak literatürlerde 6500 den fazla fenolik ve flavonoid madde tanımlanmıştır. Bununla birlikte tüm bu antioksidanlardan yalnızca 15 tanesi *Ginkgo biloba* ekstraklarında analizlenebilmiştir. Bu nedenle yalnızca elde edilen sonuçlara göre yorum yapmak yanlıştır. Ayrıca bazı antioksidan maddelerin bir arada bulunduklarında birbirleri ile olan etkileşimleri sinerji etkisi olarak adlandırılan bir etkiyi oluşturarak antioksidan kapasitesine katkıda bulunur (Dapkevicius ve ark., 1999).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile gerçekleştirilen analizde her üç ekstraktta Çizelge 7.5'te verilen 15 maddeden yalnızca 8 tanesine rastlanmıştır. Bunlar kateşin hidrat, kaffeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, rutin, eriodiktiol, kuersetin ve naringenindir. Bu maddelerden hiç birisine her üç ekstraktta da rastlanmamıştır. Bununla birlikte *Ginkgo biloba*'nın hiçbir ekstraktı gallik asit, epikateşin, viteksin, naringin, hesperidin, rosmarinik asit ve karvakrol ihtiva etmemektedir. Çizelge 7.5'te görüldüğü gibi metanol ekstraktının temel bileşeni kateşin hidrat (935,4±1,97 $\mu g g^{-1}$), asetonunki rutin (903,75±21,70 $\mu g\ g^{-1}$) ve hekzanınki ise kuersetin (470,01±0,01 $\mu g g^{-1}$)'dir. Bunun yanındada metanol ekstraktında çok miktarda eriodiktiole (136,75±1,06 $\mu g g^{-1}$) rastlanmıştır. Tayin edilen fenolik yapıların toplamı düşünüldüğünde en fazla fenolik madde 1160,79 $\mu g g^{-1}$ değeri ile aseton ekstraktı iken 992,34 $\mu g g^{-1}$ değeri ile metanol ekstraktına çok yakındır. Hekzan ekstraktındaki toplam fenolik madde ise

498,25 μgg^{-1} 'dır. Sonuç olarak analizi yapılan bu fenolik yapılar ekstraktların antioksidan aktivitelerine katkıda bulunmaktadır.



Şekil 7.12. *Ginkgo biloba*'nın metanol ve aseton ekstraktlarının hidrojen peroksit giderme ve metal şelatlama aktivitelerinin karşılaştırılmasına ilişkin grafik

Çizelge 7.5. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının ihtiva ettiği fenolik maddeler ve miktarları (μgg^{-1})

Bileşen	**Metanol Ekstraktı**	**Aseton Ekstraktı**	**Hekzan Ekstraktı**	**Σ Toplam**
Kateşin hidrat	935,4±1,97	-	-	935,4±1,97
Kafeik asit	49,25±0,07	18,9±0,7	-	68,15±0,77
p-kumarik asit	-	9,85±0,21	-	9,85±0,21
Ferulik asit	6,75±1,34	-	-	6,75±1,34
Rutin	-	903,75±21,70	28,25±0,21	932±21,91
Eriodiktiol	136,75±1,06	49,80±0,84	-	186,55±1,92
Kuersetin	-	6,30±0,42	470,01±0,01	476,31±0,43
Naringenin	-	4,55±0,07	-	4,55±0,07
Σ Total	1160,79	992,34	498,25	2651,38

* 3 analizin ortalaması ve analize ait standart sapma

Ancak literatürlerde 6500'den fazla fenolik yapı olduğuna göre ekstraktlarda analizi yapılamayan daha pek çok fenolik madde bulunmaktadır (Grotewold, 2006). Bu nedenle şu ana kadar *Ginkgo biloba*'nın biyokimyasal yapılarının araştırılmalarına ilişkin çalışmalar Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba*'nın ihtiva etmesi muhtemel bazı fenolik yapıları hakkında bilgi vermektedir. Jiang ve arkadaşları 2008 yılında Çin orijinli *Ginkgo biloba*'nın metanolik ekstraktında rutin, apigenin ve luteolin bulmuşlardır. Bununla birlikte bu ekstrakta eriodiktiol olmadığını göstermişlerdir. Bir diğer çalışmada, Amerika, Çin ve Kolombiya orijinli Ginkgo yaprakları metanol:su (60:40, V/V) karışımı ile ekstrakte edilerek LC-MS ile kimyasal bileşimleri tayin edilmiştir (Lin ve ark., 2008). Analiz sonucu tüm farklı ülkelerden elde edilen ekstraktların hepsinin mirisetin, kuersetin, kaempferol, isorhammetin ve luteolin ihtiva ettiğini, ancak her bir fenolik yapının bitkinin orijinlerine bağlı olarak farklı miktarlarda olduğunu göstermişlerdir. Li ve arkadaşları 2004 yılında Tayvan orijinli *Ginkgo biloba* yapraklarının metanol ekstraktında H^1 NMR yöntemini kullanarak bazı flavonol aglikon yapıları tespit etmişlerdir. Başlıca flavonol aglikonlar olarak kaempferol, kuersetin ve isorhamnetini bulmuşlardır. Zeng ve Wang 2001'de Amerika orijinli *Ginkgo biloba'*nın fosfat tamponu ekstraktında (75 Mm, pH,7,5) kaffeik asit bulmuştur. *Ginkgo biloba*'nın metanolik ekstraktında ayrıca kolşisine de rastlanmıştır (Li ve ark., 2002). NMR analizi ile Amerika orijinli Ginkgo'nun aseton ekstraktında kuersetin ve apigenin bulunmuştur (Bedir, 2002). Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba*'nın metanolik ekstraktında ise rutin, eriodiktiol, kateşin hidrat ve kuersetinin yanında ferulik asit, kaffeik asit, p-kumarik asit ve naringenin bulunmasına bağlı olarak daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen analiz sonuçları göz önüne alındığında Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba*'nın ikincil metaboltileri ile Çin, Amerika, Kolombia ve Tayvan orijinlilerin ikincil metabolitlerinin bazı benzerlik ve farklılıklar gösterdiği sonucuna varılmıştır (Chen ve ark, 1997; Ellnain-Wojtaszek ve ark., 2001). Bunun başlıca nedeni orijine bağlı olarak bitkilerin yetiştiği iklim koşulları, ekim şartları ve çevresel faktörlerdir.

Analiz edilen fenolik yapılar bitkilerde sentezlenen fenolik ve flavonoid yapıların literatürlerde verilen biyokimyasal sentez mekanizmaları ile birlikte ele alındığında Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba*'nın muhtemel flavonoid sentez mekanizması ortaya çıkarılmıştır. Analiz edilen 8 fenolik yapı dışında literatürlerde tanımlanması nedeniyle *Ginkgo biloba*'da bulunması muhtemel diğer bazı flavonoid ve fenolik asitler ile flavonoid biyosentezinde görev alan muhetemel Ginkgo enzimlerinden yola çıkılarak Şekil 7.13a ve 7.13b'de *Ginkgo biloba*'nın ikincil

metabolitlerinin sentezine ilişkin muhtemel biyokimyasal sentez mekanizması verilmiştir.

Tüm bitkilerde flavonoid metabolizmasının çıkış noktası doğada bulunan temel 20 aminoasitten biri olan fenil alanindir. Fenil alanin, fenil alanin liyaz (PAL) enzimi tarafından sinnamik aside dönüştürülmektedir (Cheng, 2005; Berner, 2006). Sinnamik asit ise bitki metabolizmasında önce sinnamik asit-4-hidroksilaz (C4H) tarafından hidroksillenerek *p*-kumarik aside daha sonra da 4-kumarat-CoA ligaz (4CL) tarafından Co-A transferi ile p-kumaril-CoA ve malonil-CoA'ya dönüştürülür (Kumar, 2003; Berner, 2006). Tüm bitkilerde genel olarak flavonoid sentezinin temel mekanizmasını oluşturan bu sistem *Ginkgo biloba*'ya uyarlandığında, kumarik asidin varlığının ispatlanması ile *Ginkgo biloba*'nın flavonoid sentezinde görev alan genlerinin ve bunların RNA üzerinden ekspresyonlarına ilişkin daha önce yapılan çalışmalarda PAL, C4H ve 4CL enzimlerinin varlığının ispatlanması bu mekanizmanın varlığını kuvvetlendirmiştir (Xu ve ark., 2008). Aynı mekanizma, Cheng ve arkadaşlarının (2002; 2005) *Ginkgo biloba* üzerine yapmış oldukları araştırmada da aynı şekilde ifade edilmiştir. Bu nedenle *Ginkgo biloba*'nın muhtemel flavonoid mekanizması fenilalaninden *p*-kumaril-CoA sentezi ile başlamaktadır. Flavonoid sentezinin bir başka basamağı da sinnamik asidin hidroksillenerek kaffeik aside ve kaffeik asidin hidroksil ucunun metillenmesi sonucu ferulik asit sentezidir. Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba*'da tanımlanan bu iki bileşik yine sinnamik asit varlığının bir başka kanıtıdır. Bu sentezlerin bitkilerde meydana gelmesini destekleyen bir başka çalışmada *Ginkgo biloba*'da bu bileşiklerin sentezinde görev alan 4-kumarat 3-hidroksilaz (Coum3H) ve katekol-O-metiltransferaz (COMT) enzimlerinin eksprese edildiğini dolaylı yoldan tanımlamış olmaktadır (Grotewold, 2006; Berner, 2006). *Ginkgo biloba*'da malonil-Co-A, kalşon sentaz (CHS) enzimi tarafından kalşona, kalşondan da kalşon izomeraz (CHI) tarafından yine HPLC analizi sonucu elde edilen naringenine dönüştürülür (Xu ve ark., 2007). Kalşon ve naringenin reaksiyonu tersinirdir. Naringenin ayrıca Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba*'da en fazla miktarda bulunan rutin, kuersetin, kateşin ve eriodiktiolün prekürsörüdür. Bunların yanında naringenin tüm *Ginkgo biloba* genotiplerinde bol miktarda bulunduğu ispatlanan ve literatürlerde en çok rastlanan kaempferolün ve mirisetinin de prekürsörleridir. Naringeninden bu flavonoid yapılara dönüşümler yine çeşitli enzimlerin varlığında gerçekleşmektedir (Winkel-Shirley, 2001).

Naringenin, flavonoid 3'-hidroksilaz (F3'H) enzimi tarafından hidroksillenerek eriodiktiole dönüştürülür. Naringenin ve erodiktiol yapıları tekrar flavanon-3-hidroksilaz (F3H) enzimi tarafından yapılarında bulunan halkaların orto, para ve meta bölgelerinden hidrokisillenmelerine bağlı olarak dihidrokampferol, dihidrokuersetin ve dihidromirisetine dönüştürülür. Oluşan bu üç bileşiğin yine kendi içinde dönüşümleri flavonoid 3-hidroksilaz (F3H) ile flavanoid 3',5' hidroksilaz (F3'5'H) enzimleri tarafından meydana getirilmektedir (Tanaka ve ark., 2009). F3H enziminin *Ginkgo biloba*'da sentezi daha önce F3H geninin klonlanması ile tanımlanmıştır (Shen, 2005). Bu üç yapıdan da flavonol sentaz (FLS) enzimi ile halkadan birer hidrojen molekülünün çıkarak çift bağ oluşumu sonucu kaempferol, kuersetin ve mirisetin oluşmaktadır. Dihidroflavonol 4-redüktaz (DRF) enzimi ise dihidro yapısındaki bu flavonoidlerin önce lökosiyanidine daha sonra lökosiyanidin redüktaz (LCR) enzimi ile kateşine dönüştürür. DRF ve LCR enzimleri genel flavonoid biyosentezinde tanımlanmış olup *Ginkgo biloba*'nın bu enzimleri sentezlemesine yönelik şimdiye kadar herhangi bir çalışma yapılmamıştır (Tanaka ve ark., 2009). Ancak *Ginkgo biloba* için verilen muhtemel biyosentez mekanizmasında kateşinin HPLC analizi sonucu bol miktarda elde edilmesi nedeniyle muhtemel kateşin biyosentezinin bu yol üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir. Son olarak kuersetinin glikozillenmesi sonucu oluşan rutine Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba*'da bol miktarda rastlanmış olup bu sentezi gerçekleştiren UDP-3-o-glikoziltransferaz (UFGT) eziminin *Ginkgo biloba*'daki varlığı Cheng ve arkadaşları (2007) tarafından açıklanmıştır.

Fenolik yapıların insan sağlığına etkisi üzerine literatürlerde pek çok çalışma vardır. Özellikle Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba*'da da analizlenen kuersetin ve rutin pek çok bitkide bulunan önemli flavonoidlerdendir. Rutin klinik olarak antihipertensif, anti-inflammator, antihemorajik aktivite göstermekte, kılcal geçirgenliği artırmakta ve trombositlerin stabilitesini korumaktadır (Guo ve Wei, 2008). Rutinin bu farmasötik etkisi güçlü antioksidan ve radikal giderme aktivitesine bağlıdır (Yang, 2001). Bununla birlikte rutinin polifenolik yapısı hidrofobisite ve elektrostatik bileşiklerin bulunduğu çevresel değişimlere karşı oldukça hassastır. Bulunduğu ortama bağlı olarak antioksidan aktivitesi değişebilmektedir. Kateşinler ise bakterilerin DNA replikasyon mekanizmasındaki özel bir basamağı engelleyerek antibiotik özellik göstermektedirler (Gradisar ve ark., 2007). İnsan dietindeki başlıca flavonoid, kuersetindir. Dietle günlük alımının 50–500 mg olduğu tahmin edilmektedir (Deschner ve ark., 1991). Kuersetin hücrede serbest radikal proseslerini inhibe etmektedir (Afanas ve ark., 1989). Derideki

hücre populasyonunu, fibroblast/keratinositleri ve endotel hücrelerini glutatyona uzun süreli maruz kalması sonucu indüklenen sitotoksik oksidatif stresten korumaktadır (Katsarou ve ark., 2000; Coşkun, 2004). Özellikle çayda bol miktarda bulunan kateşin tüketimi eritrositlerde süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi canlı antioksidan mekanizmasının temel bileşenleri olan enzimlerin aktivitelerini artırırken, ratlarda lipid peroksidasyonunu düşürmektedir. Bu enzimlerin aktivitesine bağlı olarak kateşin emildikten sonra hedef dokulara ulaşarak antikanser aktivite göstermektedir. Kanser oluşumunun tüm safhalarında (proliferasyon, transformasyon, inflamasyon, apoptozis, metastaz ve işgal safhaları) tersine etki sağlayarak kanser hücresine karşı savaşmaktadır. Kuersetin kanser tümörünü küçültürken özellikle yeşil çaydaki kateşin diğer flavonoidlerle birlikte kolestrolü düşürmektedir. Tansiyonu ve kan şekerini ayarlar ve kalp damar hastalıkları risklerinin azaltılmasında faydalıdır. Özellikle greyfurtta bol miktarda bulunan naringenin insan sitokrom P450'nin CYP1A2 isoformu üzerinde inhibitör etkisi yapmaktadır. Böylece özellikle bazı ilaçların karsinojen etkilerini azaltır (Edwards ve Bernier, 1996). Yine hücre kültüründe akciğer hücrelerini infekte eden Hepatit C virüsünü de azaltmaktadır. Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) sentezini düşürmektedir (Nahmias ve ark., 2008). Ayrıca naringeninin antiviral etkisi de bilinmektedir. Naringeninin yüksek kolseterolle beslenen ratlarda HMG-CoA redüktaz enzim sentezini engelleyerek plazma ve hepatik kolesterol konsantrasyonlarını düşürdüğü bilinmektedir (http://en.wikipedia.org/wiki/Naringenin).

Son yıllarda bitkilerin ikincil metabolitlerinin yanında ilgi çeken yönlerinden biri de ihtiva ettikleri yağ asitleridir. Çoklu doymuş (PUFA) ve tekli doymuş yağ asitlerinin (MUFA) sağlık açısından yararlı olması konusunda yapılan çalışmalar nedeniyle bitkilerden elde edilen yağ asitlerine ilgi oldukça artmıştır. Özellikle doymamış yağ asitlerinin hidrojenizasyonla doymuş yağ asitlerine dönüştürülmesi pratik olarak gelişmiş ülkelerde artan nüfusun yağ ve türevlerine olan ihtiyacını karşılamak açısından yarar sağlamaktadır. Bununla birlikte kardiyovasküler hastalıklar ile metabolik rahatsızlıkların artışı doymamış yağ asitlerine olan ilgiyi artırmıştır (Lichtenstein ve ark., 1993). Doymamış yağ asitlerinin insan sağlığına etkisine ilişkin çalışmalar son yıllarda bu yağların sağlık açısından çok faydalı olduğunu kanıtlamıştır (Ouellet ve ark., 2008; Micallef ve ark., 2009). Doymamış yağ asitlerinin teröpatik etki bakımından spesifik mekanizmaları çok çeşitlidir. Özellikle yağ asitlerinin lipidleri oluşturması nedeniyle hücre membranında yer alan lipoproteinleri oluşturmaları canlı hücrelerinin yapısal fonksiyonunda rol oynamalarını sağlamıştır (Şekil 7.14). Özellikle hücre içi

ekstraktın C8–C20 yağ asidi türevleri gaz kromatografisi ile analizlenmiş ve sonuçlar Çizelge 7.6'da verilmiştir. Sonuçlar değerlendirilirken doymamış (SFA), çoklu doymamış (MUFA) ve doymuş yağ asitleri (PUFA) miktarları da hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar *Ginkgo biloba*'nın tüm ekstraktlarında analizlenen yağ asitlerinin toplamı baz alındığında en fazla biyosentezi gerçekleşen yağ asitlerinin doymuş yağ asidi olarak C:16 palmitik asit ile tekli doymamış yağ asitlerinden C:18 oleik asit olduğu görülmüştür. *Ginkgo biloba* çoklu doymamış yağ asitleri bakımından oldukça fakirdir. Esasında çift bağların çokluğu ekstraktların serbest radikalleri süpürmeleri ya da inaktif hale getirmeleri bakımından da oldukça faydalıdır (Yurawecz ve ark., 1995). Özellikle konjuge yapıdaki linoleik asitler flavonoidlerin fenolik yapılarında göstermiş oldukları rezonansla aynı mekanizmaya sahiptir. Bu rezonans sayesinde elektronları delokalize edebildikleri için radikali üzerine alarak linoleik asit radikallerini oluşturabilirler. Böylece yağ molekülleri serbest radikalle direk reaksiyona girerek ya da serbest radikalleri inhibe ederek lipid radikallerini oluşturmaktadırlar. Sonuç olarak konjuge yağ asitleri yüksek antioksidan aktivite gösterirler (Fagali ve Catalá, 2008). Bu etki özellikle DPPH radikalinin indirgenmesinde ve demir indirgeme gücünde kendisini göstermektedir. Ancak *Ginkgo biloba*'nın konjuge çift bağlı yağ asitleri bakımından fakir olması, *Ginkgo biloba*'nın antioksidan aktivite gücünün daha çok ihtiva ettiği fenolik yapılardan kaynaklandığını göstermektedir. Bununla birlikte her ne kadar omega-3 (linolenik asit) ve omega-6 (linoleik asit) bakımından zengin değilse de Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba*'da omega-9 (oleik asit) oldukça fazladır. Omega 9'ca zengin yiyeceklerin tüketilmesi, tıpkı omega 3 ve 6 gibi bazı hastalıların tedavisinde ya da önlenmesinde, bazı vücut fonksiyonlarının gerçekleştirilmesinde oldukça faydalıdır. Bir omega 9 yağ asidi olan oleik asit tüketiminin arterosklerosis ve kolestrol seviyesini düşürerek kardiovasküler hastalıkların riskini azalttığı bilinmektedir. Ayrıca oleik asit insülin direncini düşürerek kandaki glikoz seviyesini düzenler ve bağışıklık sistemini düzenleyerek güçlendirir. Bununla birlikte pek çok kanser türünde koruyucu etki yaptığı da bilinmektedir.

Bitkilerin tohumlarındaki yağ asidi bileşimine yönelik pek çok çalışma olmakla birlikte bunların endüstride biyoetanol üretiminde ya da gıda sanayinde direk yağ olarak ya da katkı maddesi olarak kullanımı oldukça fazla iken, bitki yapraklarının yağ asidi bileşimlerinin analizine ilişkin çalışma sayısı oldukça azdır. Bitkilerde yağ asidi sentezi de tıpkı protein ve enzim sentezi gibi bitkilerin tohum, kök, yaprak ve çiçek gibi organellerine bağlıdır. Yağ asitlerinin biyosentezinin nükleik asitler tarafından kontrol

edilmesi nedeniyle dokularda kantitatif olarak yağ asidi sentezinde farklılıklar meydana gelmektedir. Bununla birlikte literatürler göz önüne alındığında bitkilerde genellikle tek bir yağ asidi yağ asidi bileşiminin önemli bir yüzdesini oluşturmaktadır (Tekeli, 2009). Yağ asidi biyosentez mekanizmasını etkileyen faktörler tam olarak açıklanamamakla birlikte tüm canlılarda genel lipid sentez mekanizması bilinmektedir. Yağ asitlerinin perkürsörü de flavonoid sentezinde olduğu gibi malonil-CoA'dır. Ancak malonil-Co-A oluşumu asetil-Co-A'ya Asetil-CoA karboksilaz enzimi tarafından bir karbondioksit aktarımı ile başlar. Asetil-Co-A hücre membranında sitozol ve matriks arasında gerçekleşen Sitrik Asit Döngüsünde (Krebs çevriminde) meydana gelmektedir. Sitratın sitrat liyaz enzimi tarafından sitozolde okzaloasetik aside dönüşümü esnasında yan ürün olarak elde edilen asetil-Co-A buradan malonil-CoA'yı oluşturarak başlattığı yağ asidi sentezini yine her defasında Krebs çevriminden meydana gelen asetil-Co-A'yı alarak devam ettirir. Uzama olarak adlandırılan bu basamak sitozolde başlatılarak bu döngü içerisinde sürekli tekrar edilir.

Çizelge 7.6. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının yağ asidi kompozisyonu (%)

Yağ Asitleri	Metanol Ekstraktı	Aseton Ekstraktı	Hekzan Ekstraktı
C 14:0	1,46±0,11	1,79±0,06	1,965±0,36
C 16:0	37,70± 0,40	28,04±1,25	29,27±2,216
C 18:0	2,97±0,23	4,53±0,19	4,39±0,59
Σ SFA**	**42,06**	**34,36**	**35,62**
C 16:1	0,74±0,05	0,49±0,07	0,73±0,04
C 18:1	26,03± 0,12	7,64±1,52	43,46±3,74
Σ MUFA**	**27,875**	**40,145**	**44,195**
C 18:2	9,9±0,07	8,86±0,32	9,65±0,71
C 18:3	14,51±0,17	7,37±0,24	5,27±0,28
Σ PUFA***	**24,405**	**16,235**	**14,925**

***** 3 analizin ortalaması ve stradart sapma

SFA; Doymuş yağ asitleri, **MUFA;** Tekli doymamış yağ asitleri, **PUFA;** çoklu doymamış yağ

Asetoasetil ACP 3. karbonunda küçük bir 3-ketoaçil grubu ihtiva etmektedir. Kondenzasyon enzimi ACP sentazdır. Bu okside 3-keto grubu elektron transferi ile 3. karbonundan açil formuna indirgenerek 3-keto açil ACP redüktaz enzimi tarafından hidroksi açil ACP oluşturur. 3-hidroksi açil ACP dehidrataz ise bir su açığa çıkararak bu bileşiği *trans*-enol-Δ^2-ACP'ye oradan da enol ACP redüktaz enzimi tarafından indirgenerek açil ACP'ye dönüştürülür (Şekil 7.15 ve 7.16)

Yağ asidi sentez yolu yağ asitlerini ancak 16 ya da 18 karbon uzunluğunda sentezlemektedir. Palmitat asetil CoA ve malonil CoA'dan sentez mekanizması 7.17'de verilmiştir. Buna göre daha uzun yağ asitleri palmitoil CoA ya da stearoil CoA'nın elongazlar tarafından enzim katalizli zincir uzama reaksiyonları ile sentezlenmektedir. Bu uzama için malonil CoA kullanılmaktadır. Böylece her bir uzama reaksiyonunda 2 karbon alan yağ asidi ancak 2 karbon kadar uzayabilmektedir. C 20 ve C 22 gibi uzun zincirli yağ asitlerinin canlılarda sentezi oldukça yaygın iken C 24 ve C 26 sentezi çok nadir görülür.

Doymamış yağ asitleri hem bakterilerde hem de ökaryotlarda farklı mekanizmalarla sentezlenir. Yağ asidi sentezinde karbon sayısı 10'a ulaştığı zaman bir moleküle çift bağ eklenir. 3-hidroksidekanoil–ACP dehidrataz enzimi bu reaksiyonu katalizleyerek 1 çift bağı yağ asidi zincirine 2. posizyonundan normal dehidrataz reaksiyonu ile ekler (Şekil 7.16). Spesifik C10 dehidrataz *trans* değil de *cis* konformasyonu sentezleyerek *cis*-2-dekanol ACP meydana getirir. Bu *cis* yapısı ile enoil ACP redüktazın substratı olarak bir dizi uzama reaksiyonu verir ve 10 karbondan daha uzun zincire sahip doymamış yağ asitlerini meydana getirir. Bu uzama reaksiyonları normal yağ asidi sentezi yolu üzerinden devam eder. Bu metabolik yolda tek fark kondenzasyon reaksiyonundaki doymamış yağ asidini spesifik bir 3-ketoaçil–ACP sentaz enziminin tanıması bir başka deyişle substrat olarak kullanmasıdır. Reaksiyonda son ürün C 16:1 ve C 18:1 doymamış yağ asitleridir. Bu ürünler daha sonra çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFA) oluşturmak üzere elongaz enzimleri tarafından zincir uzama rekasiyonları verir. Ayrıca desaturaz enzimleri tarafından ilave çift bağlar eklenmektedir. Örneğin bakterilerde sentezlenen membran yağlarının %25'ten fazlası çoklu doymamış yağ asitlerinden (C 20:5 ve C 22:6) oluşmaktadır. Bu yağ asitleri membranın akışkanlığını atırır.

Ökaryotlarda Tip I yağ asidi sentaz enzimi nedeniyle yağ asidi sentezi boyunca bakterilerde olduğu gibi 10 karbondan fazla yağ asidi zincirine bir çift bağın girişi

mümkün olmamaktadır. Bu enzim tek bir 3-ketoaçil–ACP sentaz (KAS) aktivitesi gösteren çok fonksiyonlu büyük bir proteinin bir parçasıdır. Ökaryotik KAS'ın aktif bölgesi doymamış yağ asitlerini bir substrat olarak tanımaz. Bu nedenle bakterilerde olduğu gibi zinciri uzatamaz. Ökaryotlarda ise doymamış yağ asidi sentezi tamamen desaturazlar kullanılarak gerçekleştirilir. Desaturazlar, palmitoil CoA ve stearoil CoA'yı etkiler. Pek çok ökaryotik hücre çok farklı desaturaz enzimleri ihtiva etmektedir. Bu desaturaz formları bir yağ asidinin ucundaki karbonilden 15 karbon uzaklıktan itibaren çift bağ oluşumunu katalizler. Örneğin palmitoleil CoA'yı (C 16:0) C 16:1 analoğu olan palmitoleata oksitler. Çoklu diğer doymamış yağ asitleri de palmitoleattan sonra sırayla yüksek oranda spesifik olan desaturazlar vasıtasıyla sentezlenmektedir (Şekil 7.17). Bitkilerde ise pek çok durumda çift bağlar 3. karbondaki dönüşümler vasıtasıyla sentezlenir. Memeli hücrelerinde ise desaturazlar sentezlenememektedir. Bu nedenle memelilerde linoleat sentezi söz konusu değildir. Ancak 12 pozisyonunda çift bağ içeren çoklu doymamış yağ asitleri yaşamın sürdürülebilmesi için elzemdir. Çünkü linoleat prostaglandin gibi eikosanoidlerin prekürsörüdür. Bu nedenle bu yağ asidinin mutlaka dışarıdan dietle alınması gerekmektedir. Bitkiler PUFA'larca zengindirler. Üstelik bitkilerin sentezlediği vitaminlerden bazıları da linoleik asit ihtiva etmektedirler. Memeli hücreleri dietle bitkilerden alınan lineolatı (aktif linoleoil CoA) araşidonoil CoA (C 20:4)'ya bir seri uzama ve desaturasyon reaksiyonu ile dönüştürür (Şekil 7.18). Fosfolipidlerden türeyen araşidonat eikosanoidlerin prekürsörüdür. Bu metabolik yol kompleks PUFA sentezinde elongaz ve desaturaz enzim aktivitelerine ve işlevlerine en iyi örnektir. Sonuç olarak *Ginkgo biloba*'da sentezlenen tüm yağ asitleri bu metabolik yolu takip ederek sentezlenmektedir. Ancak *Ginkgo biloba*'nın PUFA bakımından zengin olmaması esasında toplam yağ asit analizinin yalnızca metanol, aseton ve hekzan ekstratlarında yapılmasından kaynaklanmaktadır. Yağ asidi analizleri daha çok bitki tohumları ile kloroform ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilmektedir. *Ginkgo biloba* tohumlarında daha fazla miktarda PUFA olması muhtemeldir.

Sonuç olarak bu çalışmada Türkiye'de yetişen ve farklı çözücülerle ekstrakte edilen *Ginkgo biloba*'nın yapraklardan elde edilen ekstraktların ihtiva ettiği toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı ile β-karoten lineolik asit emülsiyon yöntemi ile antioksidan aktiviteleri, CUPRAC ve FRAP yöntemleri ile antioksidan kapasiteleri, DPPH radikali ve hidrojen peroksit giderme aktiviteleri ile metal şelatlama aktiviteleri belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba* bitkisinin yapraklarının tıp, farmasötik ve gıda sanayinde bir potansiyel antioksidan

Çalışmada Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba*'nın moleküler olarak karakterizasyonu RAPD-PCR yöntemi kullanılarak yapılmış ve Almanya'da yetişen *Ginkgo biloba*'nın moleküler özellikleriyle karşılaştırılmıştır. RAPD markırlarının en çok kullanıldığı alanların başında enzim, flavonoid ve yağ asitlerinin sentezi gibi bitki metabolizmasının tüm biyokimyasal özellikleri ve faaliyetlerini belirleyen DNA'nın yapısındaki farklılıklara bağlı olarak bitkilerde meydana gelen genotipik ya da fenotipik farklılıkların belirlenmesi, bir başka deyişle tür içi ve tür dışı tayinleri gelmektedir. Tür ve populasyonlar arasındaki genetik ilişkilerin ve türe özgün DNA bantlarının belirlenmesinde RAPD markırları ekonomik olarak oldukça kısa bir sürede elde edilmektedir. Bu amaçla RAPD-PCR tekniği ile taksonomik olarak birbirine çok yakın olduğu belirtilen ve farklı habitatlarda yetişerek farklı çevresel koşullara maruz kalan türlerin farklılık dereceleri belirlenmekte ve tür içi varyasyonları tanımlanabilmektedir. Özellikle farklı habitat ve populasyonlarda varyasyon gösteren mevcut örneklerin moleküler filogenisi belirlenerek taksonomik değerleri kesin olarak ortaya konulabilmektedir. Kısa primerler genetik işaretleyiciler olarak kabul edilen parçaların rasgele çoğaltılması için kullanılmaktadır. Bu teknik tüm genom üzerindeki farklılıkların tespit edilmesi için oldukça önemlidir. RAPD-PCR tekniğindeki temel güçlük, oluşan bant profillerinin reaksiyon şartlarına (DNA kalitesine ve PCR ısı profiline) çok duyarlı olmasıdır. Bu nedenle araştırmalarda uygun ve eşit koşullarda her bir genotip için kaliteli DNA izolasyon koşulları, optimum PCR sıcaklık koşulları ile özellikle de primerin DNA'ya bağlanma koşulları optimize edilmektedir.

Bitkilerin moleküler özelliklerinin tanımlanmasına ilişkin moleküler markırların kullanımı bitkilerden DNA izolasyonu ile başlar. Diğer yandan, moleküler markır tekniklerinin uygulanabilmesi için, uygun miktar ve kalitede DNA izolasyonunun yapılmış olması oldukça önemlidir. Yüksek oranda polisakkarit ihtiva eden ve polifenol, tanen ve reçine gibi biyokimyasal yapılara sahip bitki türlerinde DNA izolasyonu için bu temel gereksinimin sağlanması oldukça güçtür (Do ve Adams, 1991). İkincil bileşikler DNA'nın çözülmesini engelleyerek büyük miktarda DNA kayıplarına ve genellikle analizlerde kullanılan enzimlerin (restriksiyon enzimleri, modifikasyon enzimleri ve Taq polimeraz enzimi gibi) inaktivasyonuna neden olmaktadır (Scarafani ve ark., 2001). *Ginkgo biloba*'nın ikincil bileşikler bakımından zengin olmasına bağlı olarak sahip olduğu yüksek antioksidan aktivite ona çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılması gibi önemli bir özellik kazandırıken bu ikincil yapılar *Ginkgo biloba*'dan

saf bir DNA izolasyonunu zorlaştırmaktadır. Bitki organlarının farklılığı, farklı yaprak dokusu, yaprak yaşı ve doku türüne bağlı olarak değişen polisakkarit ve biyokimyasal yapıların miktarı izole edilen nükleik asitlerin saflığını etkilediği için her zaman iyi bir nükleik ait izolasyonu mümkün olamamaktadır (Doyle ve Doyle, 1987). Özellikle *Ginkgo biloba* gibi ağaç formunda bulunan bitkilerden saf DNA izole edilmesi oldukça zordur. Çünkü bitki yapraklarında bulunan polisakkaritler, DNA izolasyonu sırasında DNA sarmalına yapışarak, DNA ile birlikte çökmekte ve DNA'nın çözünmesini tamamen engellemektedir (Kaufman ve ark., 1999). Ayrıca DNA izolasyonu aşamasında karbonhidratların nükleik asitlerle birlikte çökmesinin DNA'yı yapışkan bir hale getirdiği ve bununsa DNA'nın tekrar temizlenmesini zorlaştırdığı ifade edilmektedir (Kaufman ve ark., 1999). DNA çözünse dahi, polisakkaritlerin enzim aktivitesini durdurmaları nedeniyle, sonraki aşamalarda DNA'ların enzimlerce işlenmesi engellenmektedir. DNA'nın polisakkaritlerle birlikte çökmesinin engellenmesinde kullanılan en yaygın metot, DNA hazırlığı aşamasında CTAB kullanılmasıdır. CTAB, özellikle nükleik asitlerin seçici çökelmesini sağlamaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada Doyle ve Doyle (1990)'un geliştirdiği CTAB metotu çeşitli modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. *Ginkgo biloba* bitkisinin yaprak eksplantlarında temiz, saf ve kaliteli bir DNA elde edilmesini engelleyen ve DNA'yı parçalayan polisakkarit ve flavonoid türü bileşenler bol miktarda bulunmaktadır. Özellikle sıvı azot (-196ºC) yardımıyla yaprakların parçalanması aşamasında, izolasyon tamponu yüksek oranda polisakkarit içeriği nedeniyle koyu ve jelatinimsi bir çözelti oluşturmakta, bu çözelti içerisinden DNA'nın temizlenmesi ise güçleşmektedir. Bu nedenle izolasyon protokolünün ilk basamağında β-mercaptoethanol ilavesi yapılmıştır. Yöntemde yapılan değişiklikler düşük CTAB oranlı (%1) ekstraksiyon tamponu, fenolik yapıların uzaklaştırılması için PVP ve ikinci bir izolasyon aşaması kullanılmasıdır. Tüm bu modifikasyonlar, izolasyon esnasında DNA miktarının korunmasının yanında yüksek saflıkta DNA elde edilmesi amacıyla yapılmıştır. Ancak yüksek oranda CTAB ve PVP kullanımı sonucunda DNA miktarında azalmalar meydana gelmiştir. Nitekim daha saf ve kaliteli DNA elde edilmesi amacıyla iki aşamada gerçekleştirilen manuel DNA izolasyon metotunda saf ancak otomatik izolasyonla karşılaştırıldığında düşük miktarda DNA izole edilmiştir. Her iki yöntemle de elde edilen DNA'lar ile PCR'da çoğaltım gerçekleştirilebilmiştir.

Ginkgo biloba'dan magnetik beadsler ihtiva eden kitlerle otomatik izolasyona dayalı metotla manuel DNA izolasyon metotu karşılaştırıldığında otomatik sistemle

daha yüksek saflık ve miktarda daha hızlı bir şekilde bitkiden DNA izole edilmiştir. Son yıllarda protein, enzim ve nükleik asitler gibi biyolojik numunelerin dokulardan saflaştırılmasında magnetik partiküllerin ya da beadslerin kullanımı oldukça artmıştır. Özellikle demir ya da silika ihtiva eden partiküllere tutunan biyolojik numuneler dokuda bulunan diğer moleküllerden kolay ve hızlı bir şekilde uzaklaştırılabilmektedir. Bu çalışmada kullanılan doku kitinde de benzer basamaklar kullanılmaktadır. Öncelikle kitlerde bulunan tampon ve reaktiflerle yıkanan magnetik partiküller DNA molekülünü tutmak üzere uygun bir tamponla dengeye getirilmiş daha sonra doku numunesi ile karıştırılıp çalkalanarak DNA molekülünün partikül yüzeyine tutunması sağlanmıştır. Yüzeye tutunan DNA molekülleri dokuda bulunan polisakkarit, protein, enzim ve ikincil metabolitlerden ayrılarak yüzeye tutunmuştur. DNA üzerine yapışan protein ve muhtemel diğer safsızlıklar ise partiküllerin etanolle yıkanması ile uzaklaştırılmıştır. Elde edilen DNA partiküllerine DNA'yı geri almak amacıyla TE tamponu ilave edilmiştir. Demir ihtiva eden DNA partikülleri DNA moleküllerini bırakarak EDTA ile kompleks oluşturmuştur. Böylece yüksek saflık ve miktarda DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak magnetik partiküllere dayalı DNA izolasyonunda yaş yapraktan en fazla 1150 μgmL^{-1} DNA izole edilirken aynı yapraktan CTAB metotu ile manuel olarak 780 μgmL^{-1} DNA elde edilmiştir. DNA'ların saflık dereceleri 230, 260, 280 ve 320 nm'lerde vermiş oldukları absorbans değerlerinin birbirine oranlanmasıyla karşılaştırılmıştır. Otomatik izolasyon yöntemiyle 260/280 oranıyla (1,95) en yüksek konsantrasyonda, ayrıca 260/230 oranıyla (2,20) protein ve 320 nm'deki absorbansıyla (0,00) karbonhidrat bakımından daha saf DNA elde edilmiştir.

Başarılı bir DNA izolasyonundan sonra Türkiye'de ve Almanya'da yetişen *Ginkgo biloba*'nın hem CTAB hem de otomatik izolasyonla elde edilen DNA'ları RAPD primerleri ile çoğaltılmıştır. Bu da izole edilen DNA'ların kalite ve saflığının yanında sonraki aşamalarda kullanılabilirliğini göstermiş ve her iki metotla da DNA izolasyonu için yöntemlerin doğruluğunu ve güvenilirliğini kanıtlamıştır. Ancak daha güvenilir sonuçlar elde etmek amacıyla konsantrasyon ve saflığın en yüksek olduğu EZ1 otomatik izolasyon metotu ile elde edilen DNA'lar PCR amacıyla kullanılmıştır.

Çalışmada moleküler markır olarak kullanılan rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) tekniği, reaksiyon koşulları optimize edildiği sürece güvenilir ve tekrarlanabilir bir moleküler yöntemdir (Atienzar ve Jha, 2006). Tüm moleküler markırlarda olduğu gibi bu teknikte saf ve uygun miktarda DNA'ya ihtiyaç duymaktadır. *Gingo biloba*'dan elde edilen DNA'nın çoğaltılması için

daha önce literatürlerde *Ginkgo biloba* ve farklı bitkilerin tür içi ve tür dışı polimorfizminin belirlenmesi amacıyla kullanılmış 10 nükleotidlik primerler seçilmiştir. Bu primerlerle çoğaltım sıcaklık gradientine dayalı polimeraz zincir reaksiyonu ile gerçekleştirilmiş olup DNA'nın başarılı bir şekilde çoğaltılması için DNA, primer, enzim, dört farklı deoksiribonükleotid, PCR tamponu ve magnezyum klorür konsantrasyonları ile DNA çift zincirinin açılması, her bir primerin bağlanması ve deoksinükleotidlerin DNA zincirine komplementer olarak bağlanmasına ilişkin sıcaklık ve süreler başarılı bir biçimde optimize edilmiştir. Çoğaltılan DNA fragmentleri agaroz jele yüklenerek tüm DNA parçacıkları jelde bantlar şeklinde görüntülenmiştir.

Genotipler arasında genetik benzerlik ve farklılıkları belirlemek amacıyla her bir primer için ayrı ayrı elde edilen jel fotoğrafları incelenerek 47 adet polimorfik bant ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Bu kapsamda yapılan inceleme sonucunda bantların varlığına 1 yokluğuna ise 0 değeri verilerek bir veri matrisi oluşturulmuştur. Bu matristen yola çıkılarak primerlerin verdikleri polimorfik bantların frekansları ve polimorfizm oranları hesaplanmıştır. Genetik benzerlik ve uzaklıklar Nei (1972)'ye göre POPGENE 1.31 (Yeh ve ark., 1997) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Genetik benzerlik ve genetik uzaklıkların hesabında izlenen formülasyonlar esas almıştır.

Genetik benzerlik veya monomorfizm oranı (M):

$M = 2N_{ij} / N_i + N_j$

Burada, N_{ij}: *i* ve *j* bireyleri arasındaki ortak bant sayısını; N_i: *i*. bireye ait toplam bant sayısını N_j: *j*. bireye ait toplam bant sayısını ifade etmektedir.

Genetik farklılık veya polimorfizm oranı (P):

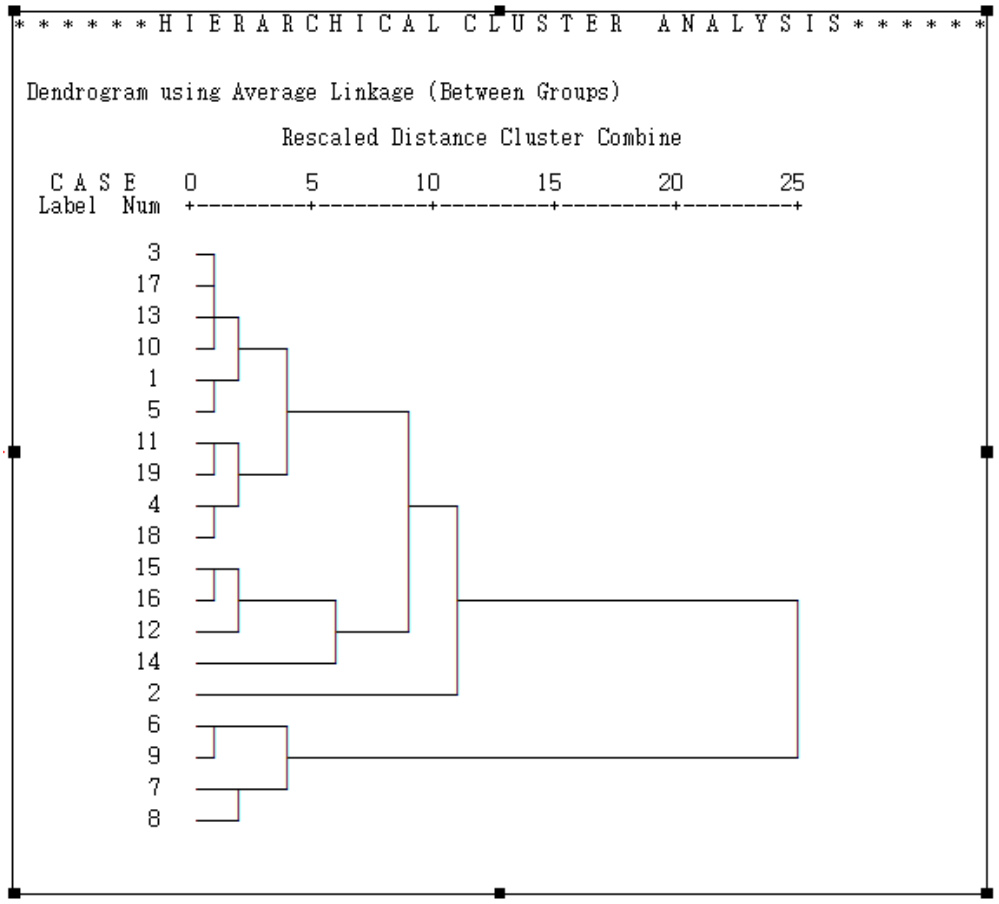
$P = 1 - M$

Elde edilen benzerlik indeksine bağlı olarak iki farklı *Gingko biloba* genotipinin primerlere dayalı dendongramı çıkarılmıştır.

Fotoğraflarda net olarak ayırt edilebilen bantlar değerlendirmeye alınmıştır. Çalışmada 20 primerden OPA-20, PCR amplifikasyonu sağlanamaz iken, 19 primerin 9 tanesi Türkiye ve Almaya orijinli olan *Ginkgo biloba* genotiplerinde çoğaltım yapıldığında tekrarlanabilir polimorfik bantlar meydana getirmişlerdir. Bu 9 primerle polimorfik ve monomorfik olmak üzere toplam 53 RAPD bandı gözlenmiştir (Çizelge 7.7). Polimorfik bantlar bireylerin birbirlerinden farklılıklarını, monomorfik bantlar ise

bireyler arasındaki benzerlikleri göstermektedir. Primerler 2-10 adet arasında bant vermiştir. Değerlendirilen bantlar 150 bp-4500 bp arasında gözlenmiştir. Bunlardan 14 adedi monomorfik (%26,4) ve 39 adedi polimorfiktir (%73,5). Çizelge 7.7'ye göre genotiplerin orijin farklılığından kaynaklanan varyasyonları tespit edilerek farklılıkların tanımlanabilmesi için öncelikli olarak polimorfizm oranları dikkate alınmıştır. Buna göre, genotip başına toplam bant sayısı 5,8 iken bu oran monomorfik bantlarda 1,5, polimorfik bantlarda 4,3 olarak belirlenmiştir. Primerlerden OPA-6, 7, 8, 9, 10, 13 ve 17 ile OPA-12, 14 ve 15 primerleri her iki genotipte de aynı bant desenini (monomorfizm) vermiştir, yani %0.0 polimorfizm vermiştir. En yüksek polimorfizm oranı ise OPA-5 ve OPA-1 primerlerinde görülmüş olup, tamamen polimorfik bantlar üretmişlerdir. Bu primerler en yüksek polimorfizm oranını %100 olarak göstermiştir. Bunu 94,4 ile OPA-4 ile OPA-16 primerleri izlemiştir. En düşük polimorfizm oranını ise %11,3 ile OPA-18 primeri vermiştir. Çalışmada test edilen 19 primerden tamamının Almanya ve Türkiye orijinli *Ginkgo biloba* genotipleri için ortalama polimorfizm oranı yüksek seviyede olup yaklaşık %80 olarak hesaplanmıştır. Bu primerlerin *Ginkgo biloba* genotiplerindeki çoğaltımları karşılaştırıldığında maksimum bant sayısı 10 iken en az bant sayısı 2 adet olan OPA-12, 14 ve 15 primerleri ile dendogram sonuçlarına göre kümeleme analizi yapıldığında OPA-6, 7, 8, 9, 10, 13 ve 17 en yüksek benzerlik gösterirken en düşük benzerlik OPA-1, 2, 3, 4, 11, 16, 18 ve 19 primerlerinde görülmüştür. Sonuç olarak her iki genotipin orijinine göre sınıflandırılması gerektiğinde öncelikli olarak lokus-spesifik olan ve benzerlik indeksleri düşük olan primerler ile polimorfizm yüzdesi en yüksek olan OPA-1 ve OPA-5 primerlerini *Ginkgo biloba* için biyolojik markır (moleküler markır) olarak kullanmak zaman ve ekonomik anlamda invitro koşullarda son derece önemlidir.

Sonuç olarak seçilen primerlerden elde edilen polimorfizm ile kullanılan genotiplerin dendrogramı (soy ağacı) çıkartılmıştır (Şekil 7.19). Bu çalışmanın amacı, Almanya ve Türkiye orijinli *Ginkgo biloba* genotiplerinin seçilen özgün RAPD primerleri kullanılarak DNA parmak izlerinin belirlenmesi, genotipler arasında farklılığının olup olmadığının tespit edilmesi ve yüzde olarak hesaplanan polimorfizm oranları kullanılarak genotipler arasındaki yakınlık derecelerinin yorumlanmasıdır. Hesaplanan polimorfizm oranlarıyla genotipler arasındaki genetik yakınlık dereceleri gösterilmiştir.



Şekil 7.19. *Ginkgo biloba* türleri arasındaki ilişkiyi gösteren dendogram

Çizelge 7.7. RAPD sonucu oluşan bantları ve polimorfizm oranları

Primer Adı	Amplifikasyon ürünü Baz aralığı (bp)	Polimorfik Bantlar	Monomorfik bantlar	Toplam Bant sayısı	Polimorfizm Oranı %
OPA-1	490-1220	6	0	6	100.0
OPA-2	350-1110	4	1	5	92.3
OPA-3	520-1250	3	2	5	56.0
OPA-4	550-1045	2	1	3	94.4
OPA-5	400-1100	5	0	5	100.0
OPA-11	200-800	4	2	6	75.0
OPA-16	900-2900	5	2	7	94.0
OPA-18	170-700	6	4	10	11.3
OPA-19	700-2700	4	2	6	75.0
Toplam	200-2900	39	14	53	73.6

Çalışma sonunda çeşitler arasındaki genetik benzerlik derecesine göre çıkartılan dendogramın avantajları; genotiplerin yakınlığını tespit edebilmek, yapılabilecek melezleme ve ıslah çalışmalarında seçilecek olan yeni genotiplerin birbirine olan yakınlığını belirlemek, gen kaynaklarının korunması konularında gelecekteki çalışmalara ışık tutmak ve araştırmacılar teorik olarak genetik bilgi veri tabanı oluşturmaktır.

7.2. Öneriler

DNA izolasyonu ile başlayan tüm moleküler markırlar, gen kaynaklarının tüm genetik kökenleri hakkında oldukça yararlı bilgiler sağlamaktadırlar. Bu bilgiler ıslahçılar için, özellikle nadir bulunan genleri içeren gen kaynaklarının kullanılabilirliğine karar vermede önemlidir. Özellikle *Ginkgo biloba* gibi yüzyıllardır canlı kalmayı başaran ve Alzheimer gibi henüz tedavisi olmayan bir hastalıkta kullanımı tavsiye edilen ve 1945'te Hiroşima'ya atom bombası atılmasından sonra o bölgede canlılığını sürdürebilen tek canlı olan bu eşsiz bitkinin moleküler özelliklerinin tanımlanarak genlerinin araştırılması onun bu eşsiz özelliklerinin başka canlılar için model olarak kullanılması açısından oldukça önemlidir. Bunun başarılabilmesi için tüm moleküler markırlar, analitik teknikler ve enzimolojik çalışmalar oldukça işlevseldir. Özellikle RAPD markırları, adaptasyon ve seleksiyon programlarında genlerin gözlenmesinde kullanılabilmektedir. Böylece, markırlar bitkilerin hastalıklara dayanımı gibi ticari öneme sahip genetik özelliklerini tanımlayabilmekte ve bu genetik özelliklerin doğal gen kaynaklarında, adapte olmuş yerli hat veya çeşitlerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. RAPD-PCR tekniğinin türler arasındaki genetik varyasyonu belirlemedeki yeteneği, popülasyondaki istenmeyen çekinik allellerin frekansının yükselmesini engellemek amacıyla ve ticari bitki türlerindeki melezleme derecesini belirlemede kullanılabilmektedir. Belirli bir lokustaki allel çesitliliğini ölçmek için bireylerin genotiplerini belirlemek gerekmektedir. RAPD yönteminin, dominant belirteçler ortaya çıkarmakla birlikte diğer bazı başka yöntemlere göre kısmen daha ucuz olması, çabuk sonuç vermesi ve radyoaktif madde kullanılmaması gibi avantajlarının olması bir kez daha gözlenmiştir. Bu çalışma da RAPD-PCR yönteminin dezavantajı olan tekrarlabilirlik sorunu durumun aksine değişik zamanlarda yapılan RAPD-PCR analizlerinde herhangi bir problem oluşturmamış ve tekrar edilebilir sonuçlar alınmıştır. Belirli bir çalışma için gerekli primer sayısı da önemlidir.

Çalışmaya daha fazla primer katıldığı zaman tutarlılık artacaktır. Bununla birlikte, RAPD markırları ile ortaya çıkarılan sonuçlar, filogenetik yaklaşımlara ve/veya seçilen mesafe katsayılarına bağlıdır. Bu seçimler dikkatle düşünülmelidir çünkü karşılaştırılan organizmaların akrabalıkları etkileyici bir faktördür (Landry ve Lapointe 1996).

Jel üzerindeki farklı boyutlardaki bantların genellikle bağımsız lokusu temsil ettiği düşünülür ve bağımsız özellikler olarak değerlendirilir. Ancak her örnekte böyle bir durum yoktur. Martin ve arkadaşları (1991) farklı bantların homolog diziler içeren tek bir primerle çoğaltılabileceğini göstermişlerdir. Bu da farklı bantların bağımsız özellikleri gerektirmedigini gösterir. Bu tür bantlar, aynı lokustaki homolog allelleri veya gen dublikasyonlarını gösterebilmektedir. Bununla birlikte RAPD-PCR tekniği, ciddi zayıflıklar gösterebilmektedir; kurulan filogeniler, farklı özellikteki memeliler arasında her zaman ayırt edici olmayabilir. RAPD markırlarının karşılaştırmaları, aynı primerle çoğaltılmış aynı moleküler ağırlıktaki bantların homolog DNA sekanslarını temsil ettiği varsayımına dayanır. Fakat birbirinden daha uzak iki örneğin, bu varsayımı karşılaması daha az muhtemeldir. Yine de, RAPD markırları sayısız çalışmada da gösterildiği gibi yakın akraba organizmalardaki genetik polimorfizmi belirlemede çok güçlü bir araçtır. Bu gözlemler familya seviyesine kadar karşılaştırmaların muhtemelen daha düzenli filogeni vereceğini göstermiştir (Landry ve Lapointe, 1996).

Canlıların kimyasal yapılarındaki farklılığın ekolojik farklılıklardan kaynaklandığı bilinmektedir. Fakat bazı türlerde kimyasal farklılığın sebebi ekolojik farklılıklardan daha çok genetik farklılığa dayanır (Fracaro ve ark., 2005). Bu türlerde örneğin yağ asidi miktarındaki kantitatif farklılığın sebebi bireyler arasında genetik olarak kodlanmış ürünün farklılığı ile açıklanmıştır (Skoula ve ark., 1999). Bazı durumlarda elde edilen bulgularda biyokimyasal ve genetik verilerin populasyonlar arasındaki varyasyonu açıklamada uygunluk göstermediği gözlenebilmektedir. Bu nedenle bitkinin yapılarındaki kimyasal farklılığın sebebini açıklayabilmek için gen ve çevre şartları arasındaki ilişki de göz önünde bulundurulmalıdır. Değişikliğin sebebi, mikroiklim veya lokal çevreye iyi adapte olmuş spesifik seleksiyonun zorlaması da olabilir. Bu nedenle bu tezde *Ginkgo biloba*'nın kimyasal ve moleküler yapılarına ilişkin çalışmalar *Ginkgo biloba* gibi, dünyada gerek antioksidan aktivite bakımından çok fazla talep gören gerekse yüzyıllardır kullanılan ve Alzehimer'da faydalı olduğuna inanılan bir bitkinin Türkiye'nin ekolojik şartlarına uyum sağlayıp sağlamadığı araştırılmış ve elde edilen bilgiler ışığında Türkiye'nin karasal iklimine bağlı olarak genom düzeyinde göstermiş olduğu yüksek polimorfizmle beraber yapısındaki yüksek

fenolik madde miktarına bağlı olarak sahip olduğu güçlü antioksidan aktivite sayesinde Türkiye'de de yetiştirilebileceği gösterilmiştir. Ancak kimyasal ve genetik farklılık arasında tam bir korelasyon sağlamak ve populasyon içerisinde varyasyonu açıklayabilmek için populasyon boyutunu büyütmek ve daha spesifik DNA markırları kullanarak genotipik tanımlama yapmak gerekmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda gelecekte genetik farklılığı belirlemek ve korumak için farklı bireyler, farklı populasyonlar ve farklı teknikleri karşılaştırmak gerekir. Ayrıca moleküler ve morfolojik markırlar arasındaki uyumluluk spesifik primer ve teknik (kodaminant moleküler markır) seçildiği ve habitatların ekolojik özellikleri incelendiği zaman mümkün olacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışmada hem Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba*'yı tanımlamak hem de varolan literatürler üzerinden bitkinin yetiştiği ülke ve iklim koşullarının ortaya çıkardığı varyasyonları genom ve kimyasal düzeyde tayin edilmesi hedeflendiği gibi yapılmıştır. Buna göre enlem, boylam, iklim, toprak yapısı ve suya ulaşabilirlik gibi etmenlerin polimorfizmlerin ortaya çıkmasını tetikleyen önemli faktörler olduğu ve yetiştiği bölgedeki çevresel koşullara adapte olabilmek için ya da bunlardan bağımsız olarak geliştirmiş oldugu farklı özelliklerden dolayı, diğerlerinden farklı bir çeşitlilik göstermiş olabilecegi düşünülmektedir. Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba*'nın Almanya'da yetişenle karşılaştırıldığında vermiş olduğu polimorfik bantlar işte bu adaptasyonu göstermektedir. Ancak monomorfik bantlarla da temel özelliklerini yitirmediği anlaşılmaktadır. Bununla birlikte Türkiye'de yetişen *Ginkgo biloba*'nın daha önce literatürlerde tanımlanan Japonya, Amerika, Çin ve Almanya orijinli *Ginkgo biloba*'nın bazı morfolojik ve moleküler karakterileri ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

Ginkgo biloba üzerine yapılan bu çalışma, mevcut bitki populasyonlarına uygulanarak geniş ekim alanlarına ulaşması ve daha fazla gelir elde edilecek ıslah çalışmalarının yapılmasına öncülük edeceğinden oldukça önemlidir. Ayrıca bu çalışma ile elde edilen sonuçlar gelecekte aynı ve benzer bitki genotiplerinde yapılacak benzer çalışmalar üzerine araştırmalar ve karşılaştırmalar için referans niteliği taşıyacaktır. Uygulanan koruma programının genetik çeşitliligi korumadaki etkinliği de böylece ortaya konulabilecektir. Bunun yanında ülkemizdeki diğer bitki populasyonlarında yapılacak çalışmaların sonuçlarının karşılaştırılması için de referans oluşturacaktır. Ülkemizin sahip olduğu en önemli gen kaynaklarımızdan biri olan bitkilerin korunup gelecek kuşaklara ulaştırılması için oluşturulan koruma programlarının etkin bir şekilde yürütülmesi için moleküler genetik tanımlamalarla elde edilen bilgiler yönlendirici rol

üstlenebilir. Bu kapsamda diğer analiz yöntemlerinin de çalışmada kullanılan yöntemlerle birlikte kullanılması daha ayrıntılı bilgilerin ortaya konulmasına yardımcı olabilecektir. Özellikle dominant kalıtım tarzına sahip RAPD markırlarına dayalı olarak bitki populasyonlarının tanımlanmasının, tür içi ve genotipler arası benzerlik ve farklılıkların daha ayrıntılı olarak ortaya konulması noktasında faydalı olacaktır.

Moleküler markırlar, gen kaynaklarının tüm genetik kökenleri hakkında oldukça yararlı bilgiler sağlamaktadırlar. Bu bilgiler ıslahçılar için, özellikle nadir bulunan genleri içeren gen kaynaklarının kullanılabilirliğine karar vermede önemlidir. RAPD markırları, adaptasyon ve seleksiyon programlarında bu lokusların gözlenmesinde kullanılmaktadır. Son yıllarda gerek gen tedavisindeki eğilim, gerekse genetik modifiye organzimaların geliştirilmesi nedeniyle istenilen özelliklere sahip genleri istenilen hücrelere en etkin biçimde taşıyabilecek vektörlerin dizayn edilmesi yolundadır. Bu nedenle *Ginkgo biloba* gibi özel bir bitkinin moleküler ve kimyasal olarak tanımlanması ileride daha özel genlerin çalışılması noktasında alt yapı oluşturması bu tezin yapılmasındaki en büyük hedeftir. Bununla birlikte *Ginkgo biloba*'nın Türkiye'de yaygınlaştırılması konusunda ülkemizde sağlık ve ekonomi açısından bir bilimsel boşluğu dolduracaktır. Ayrıca multidisipliner bir çalışma olması yönü ile de bundan sonraki çalışmalara örnek teşkil edecektir. Ekonomik önemi olan türlerde yetiştirme tekniği, ıslah ve diğer anabilim dallarında araştırmalar yapılması ülkemiz orijinli endemik tıbbi bitkilerin araştırılarak sistematiklerinin yapılıp gen sekanslarının moleküler biyolojik tekniklerle tanımlanması, genetik haritalarının çıkarılarak hastalıklar üzerinde etkili olan markırların tayin edilmesi ile genetik olarak tescil edilmesi tezin diğer amaçlarındandır.

KAYNAKLAR

Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., and Polymeropoulos, M.H., 1991, Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project, *Science*, 252, 1651–1656.

Afanas, I.B., Dorozhko, A.I., Brodskii, A.V., Kostyuk, V.A., and Potapovitch, A.I., 1989, Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation, *Biochem Pharm.,* 38, 1763–1769.

Ahmad, I., Aqil, F. and Owais, M., 2006, Modern phytomedicine Wiley-Vch verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Ak, 2006, Curcumin'in antioksidan ve antiradikal özelliklerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum.

Akashi, Y., Fukuda, N., Wako, T., Masuda, M. and Kato, K., 2002, Genetic variation and phylogenetic relationships in East and South Asian melons, *Cucumis melo* L., based on the analysis of five isozymes, *Euphytica*, 125:385-396.

Akkuş, İ., 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı, Konya: Mimoza Yayınları, 1-110.

Akyüz, E., 2007, *Polygonum bistorta* ssp. *carneum* bitki ekstraktlarının kromatografik yöntemlerle kimyasal bileşiminin belirlenmesi ve antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon.

Allan, G. J. and Max, T. L., 2010, Molecular genetic techniques and markers for ecological research, *Nature Education Knowledge*,1(11), 2.

Allegrucci, G., Caccone, A., Cataudella, S., Powell, J.R. and Sbordoni, V., 1995, Acclimation of the European sea bass to freshwater: monitoring genetic changes by RAPD polymerase chain reaction to detect DNA polymorphisms, *Marine Biology*., 121, 591-559.

Altun, Z.G., 2006, DNA markers and using at forest trees breeding in Turkey, *Ege Ormancılık Araştırma Müdürlüğü Dergisi*, Orman Bakanlığı yayın no: 285, 49(2), 20-36.

Ames, B.M., Shigena, M.K. and Hagen, T.M., 1993, Oxidants, antiaxidants and the degenerative diseases of ageing, *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 90, 7915-7922.

Andersen, Ø.M. and Markham, K.R., 2006, Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications, CRC Press: London New York.

Andersen, W.R. and Fairbanks, D.J. 1990, Molecular markers: important tools for plant genetic resource characterization, *National Plant Genetic Resources Board,* 6, 51-53.

Angeles, J.G.C., Laurena, A.C. and Tecson-Mendoza, E.M., 2005, Extraction of genomic DNA from the lipid-, polysaccharide- and polyphenol-rich coconut (*Cocos nucifera* L.), *Plant Molecular Biology Reporter,* 23, 297a–297i.

Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E. and Ercag, E., 2006, The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas, *Int. J.* Food *Sci. Nutr*., 57(5/6), 292-304.

Ardağ, A., 2008, Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin analitik açıdan karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Aydın.

Arnold, M.L., Buckner, C.M. and Robinson, J.J., 1991, Pollen mediated introgression and hybrid speciation in *Louisiana irises, Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 88, 1398-1402.

Asif, M.J. and Cannon, C.H., 2005, DNA extraction from processed wood: a case study for the identification of an endangered timber species (*Gonystylus bancanus*), *Plant Molecular Biology Reporter,* 23, 185–192.

Atak, M., 2004, Farklı triticale hatlarının morfolojik ve DNA markörleriyle genetik karakterizasyonu, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

Atienzar, F.A. ve Jha, A.N., 2006, The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review, *Mutation Research*, 613, 76-102.

Bachmayer, O., 2004, Antioxidant properties of aqueous extracts from selected culinary herbs, Master thesis, *University of Helsinki Division of Pharmacognosy*, Helsinki, Finland.

Bay, S., 2009, Türk çeltik çeşitlerinin (*Oryza sativa* l.) tohum depo proteinleri ve random amplified polymorphic DNA (RAPD) belirleyicileri ile genetik analizi, Yüksek Lisans Tezi*, Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Kahramanmaraş.

Baykal, Y. ve Kocabalkan, F., 2000, Serbest radikalleri ve hücre hasarı. *Sendrom*. 9, 31-36.

Bedir, E., Tatlı, I.I., Khan, R.A., Zhao, J., Takamatsu, S. and Walker, L.A. Goldman, P., Khan, I. A., 2002, Biologically active secondary metabolites from *Ginkgo biloba*, *J. Agric. Food Chem.* 50*,* 3150-3155.

Benkeblia, N., 2005, Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa* l.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts, *Brazilian Archives of Biology and Technology,* 48, 753-759.

Berlett, B.S. and Stadtman, E.R., 1997, Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stres, *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 20313-20316.

Berner, M., Krug, D., Bihlmaier, C., Vente, A., Müller, R. and Bechthold, A., **2006**, Genes and Enzymes Involved in Caffeic Acid Biosynthesis in the Actinomycete *Saccharothrix espanaensis, Journal of Bacteriology*, 188 (7), 2666-2673.

Blumenthal, M., 2001, Herb sales down 15 percent in mainstream market, *Herbalgram,* 51, 69.

Boonkaew, T. and Camper, N.D., 2005, Biological activities of Ginkgo extracts, *Phytomed.,* 12, 318–323.

Bovenhuis, H. and Meuwissen, T., 1996, Detection and mapping of quantitative trait loci, Animal Genetics and Breeding Unit, AGBU-University of New England, Armidale, 189.

Boveris, A.D., Galleano, M. and Puntarulo, S., 2007, In vivo supplementation with *Ginkgo biloba* protects membranes against lipid peroxidation, *Phytother. Res.*, 21, 735–740.

Branen, A.L., 1975, Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *J. Am. Oil. Chem. Soc*., 52, 59-63.

Brookes, A., 1999, The Essence of SNPs, *Gene*, 234, 177–186.

Burr, B., 1994, DNA-based markers in plants, Phillips, R.L., Vasil, I.K., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1, 400.

Burtis, C.A. and Ashwood, E.R., 1999, Tietz textbook of clinical chemistry, *W.B. Saunders Company*, Philadelphia, USA.

Cahoon, E.B., Carlson, T.J., Ripp, K.G., Schweiger, B.J., Cook, G.A., Hal, S.E. and Kinney, A.J., 1999, Biosynthetic origin of conjugated double bonds: production of fatty acid components of high-value drying oils in transgenic soybean embryos, *Proceedings of National Academy of Sciences*, 96 (22), 12935-12940.

Ceballos, P.I., Trivier, J.M. and Nicole A., 1992, Age- correlated modifications pf copper—zinc superoxide dismutase and glutationic related enzyme activities in human erytrocytes, *Clinical Chemistry*, 38, 66-70.

Chan, P-C., Xia, Q., Fu, P.P., 2007, *Ginkgo Biloba* leave extract: biological, medicinal, and toxicological effects, *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 25, 211–244.

Chaparro, J.X., Werner, D.J., O Malley, D. and Sederoff, R.R., 1994, Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme and RAPD markers in peach, *Theor. Appl. Genet*., 83, 194-200.

Chappell, A.S., Scaboo, A., Wu, X., Nguyen, H.T., Pantolon, V.R. and Bilyeu, K.D., 2006, Characterization of the ***MIPS*** gene family in ***glycine max,*** *Plant Breed*., 125, 493-500.

Chen, X.S., Zhang, W.C. and Deng, X.X., 1997, Seasonal changes of the contents of flavonoids and ginkgolides in the leaves of *Ginkgo biloba* and their changes of different stages of development for the tree, *J. Fruit Sci.*, 14(4), 226-229.

Cheng, S.Y., Wang, Y., Li, J., Gu, M. and Shu, H., 2002, Study on the synthesis and metabolism of the flavonoids in *Ginkgo biloba* leaf, *Sci. Silvae Sinica*, 38(5), 60-63.

Cheng, S.Y., Wang, Y., Liu, W.H., Du, H.W. and Chen, K.S., 2005, Effects of plant growth regulators on phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activities in leaves of *Ginkgo biloba*, *J Plant Resources Environ.*, 14 (1), 20-22.

Cheng, S-Y., Xu, F., Wang, Y., 2009, Advances in the study of flavonoids in *Ginkgo biloba* leaves, *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1248-1252.

Chetverina, H.V., Falaleeva, M.V., Chetverin, A.B., 2004, Simultaneous assay of DNA and RNA targets in the whole blood using novel isolation procedure and molecular colony amplication, *Analytical Biochemistry*, 334, 376–381.

Chu, Y.-H., Chang, C.-L. and Hsu, H.-F., 2000, Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity, *J. Sci. Food Agric*., 80, 561-566.

Cingilli, H., Altınkut, A. and Akçin, A., 2003, Screening of Turkish Chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes for Ascochyta blight resistance using molecular markers, *Biotechnology& Biotechnological Equipment*, 65-73.

Cingilli, H., Altınkut, A. and Akçin, A., 2005, The Use of Microsatellite Markers in the Annual and Perennial *Cicer* Species Growing in Turkey, *Biologia,* 60/1, 93-98.

Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B. and Pang, E.C.K., 2005, An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts, *Euphytica*, 142,169–196.

Cooper, G.M., Hausman, R.E., 2006, Hücre: Moleküler yaklaşım, Çeviri editörleri: Sakızlı, M., Atabey, N., İzmir Tıp Kitabevi, Bornova, İzmir.

Coşkun, Ö., Kanter, M., Armutçu, F., Çetin, K., Kaybolmaz, B. and Yazgan, Ö., 2004, Protective effects of quercetin, a flavonoid antioxidant, in absolute ethanol-induced acut gastric ulcer, *Eur. J. Gen. Med.*, 1, 37-42.

Cross, E., Halliwel, B., Borich, E., Pryor, W., Ames, B., Saul, B., McCord, J. and Harman, D., 1987, Oxygen radicals and human disease, *Annals of Internal Medicines*, 107, 526-545.

Cury, J.A. and Koo, H., 2007, Extraction and purification of total RNA from sreptococcus mutans biofilms, *Analytical Biochemistry*, 365, 208–214.

Çakatay, U. ve Kayalı, R., 2006, Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 37, 162-167.

Çalışkan, M., 2005, RAPD analizi ile güllerde *(Rosa sp.)* genetik tanımlama, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. and Colombo, R., 2003, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stres, *Clinica Chemica Acta*, 329, 23-38.

Dapkevicius, A., Venskutonis, R.A., Beek, T. and Linssen, J.P.H., 1999, Antioxidant activity of exracts obtained by diffrent isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania, *Journal of the Science of Food and Agricultere*, 77, 140-146.

Dawn, B.M., Allan, D.M. and Colleen, M.S., 1996, Basic Medical Biochemistry: a Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland.

Defeudis, F.V. and Drieu K., 2000, *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications. *Curr. Drug Target*, 1 (1), 25–58.

Deng, Z., Wang, Y., Jiang K., Liu X., Wu W., Gao S., Lin J., Sun X. and Tang, K., 2006, Molecular cloning and characterization of a novel dehydrin gene from *Ginkgo biloba*, *Biosci. Rep.,* 26, 203–215.

Dennis, W.H., Oliveieri, V.P. and Kruse, C.V., 1979, The reaction of nucleotides with oqueous hypoclrous acid, *Water Res.*, 13, 357, 362.

Deschner, E.E., Ruperto, J., Wong, G. and Newmark, H.L., 1991, Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymehanol-induced coloni neoplasia, *Carcinogenesis,* 12, 1193–6.

Deshmukh, V.P., Thakare, P.V., Chaudhari, U.S., Gawande, P.A., 2007, A simple method for isolation of genomic DNA from fresh and dry leaves of *Terminalia arjuna* (Roxb.) wight and argot, *Electronic Journal of Biotechnology*, 10: 468-472.

Devos, K.M. and Gale, M.D., 1992, The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat, *Theor. Appl. Genet*., 84, 567 – 572.

Diplock, A.T., 1997**,** Will the 'Good Fairies' please prove **to** us **that vitamin E** lessens human degenerative disease, *Free Rad. Res*., 26, 565-583.

Dirlewanger, E., Pronier, V., Parvery, G., Rothan, G., Guye, A. and Monet, R., 1998, Genetic, linkage map of peach (*Prunus persica* (L) Batsch) using morphological and molecular markers, *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 888-895.

Do, N. and Adams, R.P., 1991, A simple technique for removing plant polysaccharides contaminants from DNA, *BioTechniques,* 10, 162–166.

Dodds, J.H. and Watanabe, K., 1990, Biotechnological tools for plant genetic resources management. Diversity, 6, 317-328.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues, *Phytochem Bull*, 19, 11-15.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990, Isolation of DNA from fresh plant tissue, *Focus*, 12, 13-15.

Durica, D.S., Braver, G., Thompson, J.N., Hellack., J.J., 2007, Primer of Genetic Analysis, *Cambridge University Press*, Cambridge, UK.

Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F. and Hafezi, S., 2008, Antioxidant activities of Iranian Corn Silk, *Turk J. Biol*, 32, 43-49.

Echenard, V., Lefort, F., Calmin, G., Perroulaz, R. and Belhahri, L., 2008, A new and improved automated technology for early sex determination of *Ginkgo biloba, Arboriculture & Urban Forestry*, 34(5), 300–307.

Edwards, D.J. and Bernier, S.M., 1996, Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal, naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man, *Life Sciences*, 59 (13), 1025–1030.

Edwards, R.L., Lyon, T., Litwin, S.E., Rabovsky, A., Symons, J.D., Jalili, T. 2007, Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J. Nutr.,* 137 (11), 2405–11

Egert, S., Bosy-Westphal, A., Seiberl, J., Kürbitz, C., Settler, U., Plachta-Danielzik, S., Wagner, A.E., Frank, J., Schrezenmeir, J., Rimbach, G., Wolffram, S., Müller, M.J., 2009, Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study, *Br J Nutr.,* 102 (7), 1065–1074.

Ellnain-Wojtaszek, M., Kruczynski, Z. and Kasprzak, J., 2001, Analysis of the contentof flavonoids, phenolic acids as well as free radicals from *Ginkgo biloba* L. leaves during the vegetative cycle, *Acta Poloniac Pharmaceutica-Drug Research*, 58(3), 205-209.

Engin M.S., 2007, Taflan (*Laurocerasus officinalis* Roem*.)* bitkisinin meyve çekirdek ve Yapraklarının mevsim değişikliğine göre göre antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve fenolik bileşik tayini, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpasa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Ercan, S., 2008, Bazı kışlık ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* l.) çeşitlerinde sarı pas (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) hastalığına karşı dayanıklılığın moleküler markörler ile araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Fagali, N. And Catalá, A., 2008, Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomers, linoleic acid and its methyl ester determined by photoemission and DPPH• techniques, *Biophysical Chem*., 137, 56–62.

Fan, X.-X., Shen, L., Zhang, X., Chen, X.-Y. and Fu, C.-X., 2004, Assessing genetic diversity of *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) populations from China by RAPD markers, *Biochemical Genetics,* 2(7-8):269-78.

Fracaro, F., Zacaria, J. and Echeverrigaray, S., 2005, RAPD based genetic relationships between populations of three chemotypes of *Cunila galioides* Benth., *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 409-417.

Fridovich, I., 1975, Superoxide dismutases, *Annual Review of Biochemistry*, 44, 147-159.

Fridovich, I., 1976, In free radicals in biology; Pryor, W. A., Ed.;. Academic: New York, I, 239-271.

Fridovich, I., 1986, Biological effects of the superoxide radical. Arch Biochem Biophys, 247(1), 1–11.

Fritz, K.L., Seppanen, C.M., Kurzer, M.S. and Csallany, A.S., 2003, The in vivo antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects, *Nutr. Res*., 23, 479–487.

Fu, X., Deng, S., Su, G., Zeng, Q., and Shi, S., 2004, Isolating high-quality RNA from mangroves without liquid nitrogen, *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 197a–197e.

Goh, L.M. and Barlow, P.J., 2004, Flavonoid recovery and stability from *Ginkgo biloba* subjected to a simulated digestion process, *Food Chem.,* 86, 195–202.

Gomberg, M., 1900, An incidence of trivalent carbon trimethylphenyl, *Journal of American Chemical Society,* 22, 757-771.

Gong, W., Chen, C., Dobeš, C., Fu, C.-X. and Koch, M.A, 2008, Phylogeography of a living fossil: pleistocene glaciations forced *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) into two refuge areas in China with limited subsequent postglacial expansion, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48, 1094–1105.

Goodier, J.L. and Davidson, W.S., 1993, Gene mapping in fish. Hochachka, P.V. and Mommsen, T.P. (eds) Biochemistry and molecular biology of fishes, *Elsevier Science Publishers B.V.*, 2, 93-112.

Gould, J.P. and Hay, T.R., 1982, The nature of reactions between chlorine and purine and pyrimidine bases: products and kinetics, *Wat. Res. Tec*., 14, 629-640.

Gradisar, H., Pristovsek, P., Plaper, A. and R. Jerala, R., 2007, Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site, *J. Med. Chem*., 50 (2), 264-271.

Granger, D.N., 1988, Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemiareperfusion injury, *Am J Physiol.*, 255, H1269-H1275.

Granger, D.N., Rutili, G. and McCord, J.M., 1981, Superoxide radicals in feline intestinal ischemia, *Gastroenterology*, 81, 22-29.

Gregor, D., Hartmann, W. and Stosser, R., 1994, Cultivar identification in *Prunus domestica* using random amplified polymorphic DNA markers, *Acta Horticulturae*, 359, 33–40.

Grotewold, E., 2006, The science of flavonoids, *Springer Science Business Media*, Inc., New York, USA.

Gulcin, I., Tel, A.Z. and Kirecci, E., 2008, Antioxidant, antimicrobial, antifungal and antiradical activities of *Cyclotrichium niveum* (Boiss.) Manden and Scheng, *International Journal of Food Properties*., 11(2), 450-471.

Gulcin, I., 2005, The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds, *J. Food Sci. Nutr.*, *56*, 491–499.

Gulcin, I., Oktay, M., Kirecci, E. and Kuhrevioglu, O.I., 2003, Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts, *Food Chem*., *83*, 371–382.

Gulçin, I., 2008, Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent, *J. Enzym. Inhib. Med. Chem*., 23(6), 871–876.

Guo, R. and Wei, P., 2008, Studies on the antioxidant effect of rutin in the microenvironment of cationic micelles, *Microchim. Acta*, 161, 233–239.

Gutteridge, J.M., 1995, Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, *Clin Chem,* 41, 1819-28.

Gülçin, İ., 2006, Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitin, *Life Sciences*, 78(8), 803-811.

Gülçin, İ., 2007a, Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa, *Amino Acids*, 32, 431–438.

Gülçin, I., Elmastaş, M. and Aboul-Enein, H.Y., 2007b, Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum*) assayed by different methodologies, *Phytother. Res*., 21(4), 354–361.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1984, Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochemical Journal*, 219, 1–4.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1989a, Free radicals in biology and medicine, *Clarendon press*, Oxford, UK, 238-240.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1989b, Free radicals in biology and medicine, Clarendon Press Oxford. Antioxidants: a personal view, *Nutr. Rev*., 52, 253-265.

Halliwell, B., 1994, Free radicals and antioxidants: a personal view, *Nutr. Rev*., 52, 253-

265.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. and Cross, C.E., 1992, Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now, *J. Lab. Clin. Med.,* 119(6), 598-619.

Hanania, U., Velcheva, M., Sahar, N. and Perl, A., 2004, An improved method for isolating high-quality DNA from *Vitis vinifera* nuclei, *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 173–177.

Hârța, M., Pamfila, D., Ardelean, M., Pedersen, C., Pop, R., Cordea, M., 2010, Use of genomic fingerprinting techniques for revealing DNA polymorphism in *Ginkgo biloba* L., a medicinal woody species, *Romanian Biotechnological Letters,* 15 (2), 56-61.

Hedrick, P., 1992, Shooting the RAPDs, *Nature*, 355, 679-680.

Herna´ndez, M.M,. Heraso, C., Villarreal, M.L., Vargas-Arispuro, I., 2000, Biological activities of crude plant extracts from Vitex trifolia L. (Verbenaceae), Journal of Ethnopharmacology, 67 (1), 37-44.

Hill-Ambroz, K.L., Brown-Guedira G.L. and Fellers, J.P., 2002, Modified rapid DNA extraction protocol for high throughput microsatellite analysis in wheat, *Crop Sci.*, 42, 2088–2091.

http://en.wikipedia.org/wiki/Naringenin

http://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin

http://kwanten.home.xs4all.nl/hiroshima.htm

http://www.clcbio.com/index.php?id=785

http://www.genetiklab.com/altsayfa.php?giris_ID=1&tablo=tbl_yontemler

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/est.html

Hudson, B.J.F., 1990, Food Antioxidants. Elsevier Applied Science Publishers, New York, 253–307.

Huys, G., Coopman, R., Janssen, P. and Kersters, K., 1996, High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(2), 572-580.

Imaida, K., Fukushima, S., Shivai, T., Ohtani, M., Nakanishi, K. and Ito, N., 1983, Promoting activities of buthylated hydroxyanisole and buthylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and ihibition of γ- glutamyl trans peptidase-positive foci development in the liver of rats*, Carcinogenesis*, 4, 969–978.

Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M. and Ogiso, T., 1983, Carcinogenicity of buthylated hydroxianisole in F344 rats*, J. Natl. Cancer Inst.,* 70, 343-347.

Jaccard, P., 1908, Nouvelles recherches sur la distribution florale, *Bulletin de la Societe*

Vaudoise des Sciences Naturelles, 44, 223-270.

Jarvis, P., Lister, C., Szabo, V. and Dean, C., 1994, Integration of CAPs markers into the RFLP map generated using recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.* 24, 685–667.

Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, J.M., 2003, Vivanco, antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions, *Food Chemistry*, 83, 547–550.

Jenkins, R.R. and Tengi, J., 1981, Catalase activity in scletal muscle of varying fiber types, *Experimentia*, 37, 67-68.

Jiang, L., Fang, G., Zhang, Y., Cao, G. and Wang, S., 2008, Analysis of flavonoids in propolis and *Ginkgo biloba* by micellar electrokinetic capillary, *J. Agric. Food Chem*., 56, 11571–11577.

Jiang, L., You, H.-L., Li, M.-X. and Shi, C., 2003, Identification of a sex-associated RAPD marker in *Ginkgo biloba*, *Acta Botanica Sinica*, 45 (6), 742－747.

Jitu, B. and Kr, K.B., 2008, An efficient and reliable method of DNA extraction from *Meyna spinosa*- a traditional medicinal plant from North-East India, *J. Plant Biochem*. *Biotech.,* 17 (1), 103-106.

Joshi, K., Chavan, P., Wraude, D. and Patwardhan, B., 2004, Molecular markers in herbal drug 10 technology, *Curr. Sci.,* 87, 159-165.

Karasawa, A. and Kubo, K., 1990, Protection by benidipine hydrochloride (KW-3049), a calcium an togonist of ischemic kidney in rats via inhibitions of Ca-overlood, ATP-decline and lipid peroxidation, *Japan J Pharmacol*., 52, 553-562.

Karataş, H., 2005, Diyarbakır ili asma gen potansiyelinin RAPD (random amplified polymorphic DNA) tekniği ile moleküler analizi, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

Karp, A., Issar, P.G. and Ingram, D.S., 1998, Molecular tools for screening biodiversity, Chapman & Hall, London, UK.

Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M. and Sökmen, A., 2007, Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure, *Food Chem*., 100, 584–589.

Katalinic, V., Milos, M., Modun, D., Musc, I., Boban, M., 2004, Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin, *Food Chem.* 86, 593–600.

Katsarou, A., Davoy, E., Xenos, K., Armenaka, M. and Theoharides, T.C., 2000, Effect of an antioxidant (quercetin) on sodiumlauryl-sulfate-induced skin irritation, *Contact Dermatitis,* 42, 85–89.

Kaufman, B., Richards, S. and Diering, D.A., 1999, DNA isolation method for high polysaccharide *Lesquerella* species, *Industrial Crops and Products*. 9, 111-114.

Khlestkina, E.K. and Salina, E.A., 2006, SNP markers: methods of analysis, ways of development, and comparison on an example of common wheat, *Russian Journal of Genetics*, 42 (6), 585–594.

Kılınç, K. ve Kılınç, A., 2002, Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak Oksijen radikalleri, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(2), 110-118.

Kim, D.O., Jeong, S.W. and Lee, C.Y., 2003, Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums, *Food Chem*., 81, 321–326.

Klug, S.W. and Cummings, M.R., 2000, Genetik. Çeviri Editörü: Cihan Öner, 2003, Palme Yayıncılık, Ankara

Konieczyn, A. and Ausubel F.M., 1993, A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers, *Plant J*., 4, 403-410.

Köksal, E., 2007, Karnabahar (*Brassica oleracea* l.) peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi, Dokotra tezi, *Ataturk Universitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum,

Kruger, M.C. and Horrobin, D.F., 1997, Calcium metabolism, osteoporosis and essential fatty acids: a review, *Prog. Lipid Res*. *36*, 131–151.

Kumar, A. and Ellis, B.E., 2003, 4-Coumarate:CoA ligase gene family in *Rubus idaeus*: cDNA structures, evolution, and expression, *Plant Mol. Biol*., 31, 327-340.

Landry, P. and Lapointe, F., 1996, RAPD problems in phylogenetics, *Zool. Scripta*, 25(4),

Leninger, A.L., Nelson, D.L and Cox, M.M**.,** Lehninger Principles of Biochemistry 4th Edition, W.H.Freeman and Co., New York, 2005.

Li, C-H., Lin, C-H., Wu, C-C., Lee, K-H. and Wu, T-S., 2004, Efficient ^{1}H nuclear magnetic resonance method for improved quality control analyses of Ginkgo constituent, *J. Agric. Food Chem., 52,* 3721-3725.

Li, H., Ruan, X.Z., Powis, S.H, Fernando, R., Mon, W.Y., Wheeler, D.C., Moorhead, J.F. and Varghese, Z., 2005, EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: evidence for a PPAR-gamma-dependent mechanism, *Kidney Int.,* 67,867–874.

Li, W., Sun, Y., Fitzloff, J.F. and Van Breemen, R.B., 2002, Evaluation of commercial Ginkgo and Echinacea dietary supplements for colchicine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Chem. Res. Toxicol*., 15(9), 1174-1178.

Liao, L., Liu, J., Dai, Y., Li, Q., Xie, M., Chen, Q., Yin, H., Qiu, G. and Liu, X., 2009,

Development and application of SCAR markers for sex identification in the dioecious species Ginkgo biloba L., *Euphytica,* 169, 49–55.

Lichtenstein, A.H., Ausman, L.M., Carrasco, W., Jenner, J.L., Ordovas, J.M. and Schaefer, E.J., 1993, Hydrogenation impairs the hypolipidemic effect of corn oil in humans. Hydrogenation, trans fatty acids, and plasma lipids, *Arterioscler Thromb*, 13,154-161.

Lie-Zhao, L., Jin-Ling, M., Na, L., Li, C., Zhang-Lin, T., Xue-Kun, Z. and Jia-Na, L., 2006, QTL mapping of seed coat color for yellow seeded brassica napus, *Actu Genetica Sinica,* 33, 181-187.

Lin, L-Z., Chen, P., Ozcan, M. and Harnly, J.M., 2008, Chromatographic profiles and identification of new phenolic components of *Ginkgo biloba* leaves and selected products, *J. Agric. Food Chem.*, 56*,* 6671–6679.

Ling, J., Rui-Lin, Y., Mao-Xue, L., Chen, S., 2003, Identification of a Sex-Associated RAPD Marker in Ginkgo biloba, *Acta Sinica Botanica*, 45(6), 742-747.

Liu, B.H., 1998, Statistical Genomics, Linkage, Mapping and QTL Analysis. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 62- 75.

Liu, F., Sun, G.-L., Salomon, B. and Bothmer, R.V., 2002, Characterization of genetic diversity in core collection accessions of Wild Barley, *Hordeum vulgare* ssp. spontaneum, *Hereditas*, 136, 67-73.

Maclennan, K.M., Darlington, C.L. and Smith, P.F., 2002, The CNS effects of *Ginkgo biloba* extracts and ginkgolide B, *Prog. Neurobiol*. 67, 235–257.

Madhavi, N. and Das, U.N., 1994, Effect of n-6 and n-3 fatty acids on the survival of vincristine sensitive and resistant human cervical carcinoma cells in vitro, *Cancer Lett.,* 8, 31–41.

Maister, A., 1988, Glutathione metabolism and its selective modifications, *J. Biol. Chem*., 263, 205-217.

Maltas, E., Dageri, N., Vural, H.C. and Yildiz, S, 2011, Biochemical and molecular analysis of soybean seed from Turkey, *Journal of Food Biochemistry***,** 5(9), 1575–1581.

Maltaş, E., Uysal, A., Yıldız, S. and Durak, Y., 2010 Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of Vitex agnus castus L, *Fresenius Environmental Bulletin*, 19, 12b, 2010No

Manen, J.-F., Sinitsyna, O., Aeschbach, L., Markov, A.V. and Sinitsyn, A., 2005, A fully automatable enzymatic method for DNA extraction from plant tissues, *BMC Plant Biology*, 5,23.

Mantel, N., 1967, The detection of disease clustering and a generalized regression approach, *Cancer Research,* 27 (29), 209-220.

Martin, G.B., Williams, J.G.K. and Tanksley, S.D., 1991, Rapid identification of markers linked to a Pseudomonas resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines, *Proc. Natl. Acad. Sci*., 88, 2336-2340.

Mates, J.M. and Sanchez-Jimenez, F., 1999, Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes, *Front Bioscience*, 4, 339–345.

Mavi, A., 2005, İnsan eritrosit ve lokositlerinden süperoksit dismutaz enzim üzerine etkilerinin incelenmesi, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 52-53.

Mbogori, M.N., Kimani, M., Kuria, A., Lagat, M. and Danson, J.W., 2006, Optimization of FTA technology for large scale plant DNA isolation for use in marker assisted selection, *African Journal Of Biotechnology*, 5 (9), 693-696.

McCord, J.M., 2000, The evolution of free radicals and oxidative stres, *Am J Med.*, 108, 652–659.

McKay, D.L. and Blumberg, J.B., 2002, The role of tea in human health: an update, J*ournal of the American College of Nutrition*, 21, 1–13.

McPherso, M.J. and Møller, S.G., 2006, PCR, Taylor & Francis Group, "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Meglic, V. and Staub, J.E., 1996, Inheritance and linkage relationships of isozyme and morphological loci in cucumber (*Cucumis sativus* L.), *Theor. Appl. Genet*., 92, 865- 872.

Mehetre, S.S., Gomes, M. and Eapen, S., 2004, RAPD analysis of hybrid nature of the offspring of *Gossypium hirsutum* x *G. raimondii*, *Current Science*, 87 (1), 25-28.

Micallef, M.A. and Garg, M.L., 2009, Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals, *Atherosclerosis*, 204, 476-482.

Michaelis, R.C., Flanders, R.G. and Wulff, P.H., 2008, A litigator's guide to DNA from the laboratory to the courtroom, *Elsevier Inc*., Burlington, USA.

Michiels, A., Ende, W.V.D., Tucker, M., Riet, L.V. and Laerea, A.V., 2003, Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants, *Anal. Biochem.,* 315, 85–89

Morgan, U.M., Constantine, C.C., Greene, W.K. and Thompson, R.C., 1993, Rapd analysis of Giardia DNA and correlation with isoenzyme data, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87, 702-705.

Mori, M., Hosaka, K., Uemura, Y. and Kaneda, C., 1993, Rapid identification of potato cultivars by RAPDs, *Japan J. Genet*., 68, 167-174.

Murray MT., 1996. Encyclopedia of Nutritional Supplements. California, Prima Publishing, 1, 320-331

Nahmias, Y., Goldwasser, J., Casali, M., van Poll, D., Wakita, T., Chung, R.T. and Yarmush, M.L., 2008, Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin, *Hepatology*, 45 (5), 1437–1445.

Nakanishi, K., 2005, Terpene trilactones from *Gingko biloba*: from ancient times to the 21st century, *Bioorg. & Med. Chem*., 13, 4987–5000.

Nei, M., 1972, Genetic distance between populations, *American Naturalist*, 106, 283-292.

Nei, N. and Li, W., 1979, Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, *Proceding Natl Academic Science*, 76, 5269-5273.

Nelson, J.A., and Falk, R.E., 1993, The efficacy of phloridzin and phloretin on tumor cell growth, *Anticancer Res.,* 13, 2287-2292.

Neuhouser, M.L., 2004, Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies, *Nutr Cancer,* 50(1), 1–7.

Nordberg, J. and Arner, E.S., 2001, Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radic. Biol. Med*., 31, 1287– 1312.

Olgun, A., 1999, DNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

Oliveira, D.R., Sanada, P.F., Saragossa, F.A.C., Innocenti, L.R., Oler, G., Cerutti, J.M. and Cerutti, S.M., 2009, Neuromodulatory property of standardized extract *Ginkgo biloba* L. (EGb 761) on memory: behavioral and molecular evidence, *Brain Res.,* 1269, 68–89.

Orhan E. 2009. Oltu ve Olur ilçelerinde yetiştirilen dutların (*morus* spp.) seleksiyon yoluyla seçim ve seçilen tiplerde genetik akrabalıgın rapd yöntemiyle belirlenmesi, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversites, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum.

Ouellet, V., Weisnagel, S.J., Marois, J., Bergeron, J., Julien, P., Gougeon, R., Tchernof, A, Holub, B.J. and Jacques, H., 2008, Dietary cod protein reduces plasma C-reactive protein in insulin-resistant men and women, *J Nutr*., 138, 2386-2391.

Oyaizu, M., 1986, Studies on product of browing reaction prepared from glucose amine, *Japan of Nutrition*, 44, 307-315.

Papas, A.M., 1996, Determinants of antioxidant status in humans, *Lipits*, 31, 77-82.

Paran, I. and Michelmore, R.W., 1993, Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance gene in lettuce, *Theoretical and Applied Genetics*, 85, 985–993.

Parker, P.G., Snow, A.A., Schug, M.D., Booton, G.C. and Fuerst, P.A., 1998, What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker, *Molecular Techniques in Ecology*, 79 (2), 361-382.

Parmaksız, İ., 2004, Papaver cinsi *Oxytona* seksiyonunun Türkiye'de yetişen türlerinde genetik çeşitliliğin RAPD markörleri ile belirlenmesi, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

Paterson, A.H., 1996, Making genetic maps. In: A.H. Paterson (Ed.), Genome Mapping in Plants, pp. 23–39. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press, Austin, Texas.

Perry, N.B., Anderson, R.E., Brennan, N.J., Douglas, M.H., Heaney, A.J., Mcgimpsey, J.A. and Smallfield, B.M., 1999, Essential oils from dalmation sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts, seasons and sites, *J.Agric. Food Chem.,* 47, 2048–2054.

Pietta, P., Simonetti, P., Gardana, C. And Mauri, P., 2000, Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of *Ginkgo biloba* flavonol and *Camellia sinensis* catechin metabolites, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 23, 223–226.

Pinto, M.D.S., Kwon, Y.I., Apostolidis, E., Lajolo, F.M., Genovese, M.I. and Shetty, K., 2009, Potential of *Ginkgo biloba* L. leaves in the management of hyperglycemia and hypertension using in vitro models, *Biotechnology Resource*, 100, 6599-6609.

Pirttilä, A.M., Hirsikorpi, M., Kämäräınen, T., Jaakola, L. and Hohtola, A., 2001, DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants, *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 273a–F.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J. and Shahabimajd, N., 2006, Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, *Afr. J. Biotech*, 5, 1142-1145.

Procunier, J.D., Gray, M. and Liakat, A.M., 2003, Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in hexaploid wheat and high throughput SNP detection by invader operation system, *Proc. Plant and Animal Genomes 11th Conf.,* San–Diego, 251.

Puchooa, D., Khoyratty S.-U.S.S., 2004, Genomic DNA extraction from *Victoria amazonica*, *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 195a–195j.

Qi, B., Fraser, T., Mugford, S., Dobson, G., Sayanova, O., Butler, J., Napier, J.A., Stobart, A.K. and Lazarus, C.M., 2004, Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants, *Nat. Biotechnol*., *22*, 739–745.

Quarrie, S.A., Lazic-Jancic, V., Kovacevic, D., Steed. A. and Pekic, S., 1999, Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize, *J. Exp. Bot.*, 50 (337): 1299-1306.

Que, F., Mao, L., Zhu, C. and Xie, G., 2006, Antioxidant properties of Chinese yellow wine, its concentrate and volatiles, *LWT* , 39, 111–117.

Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1993, Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines, *Trends Genet*., 9, 275-279.

Ramarathman, N., Osawa, T., Namiki, M. and Kawakishi, S., 1988, Chemical studies on novel rice hull antioxidants, isolation, fractionation, and partial characterization, *J. agric. Food Chem*., 36, 732-737.

Reddy, A.M., Reddy, V.S., Scheffler, B.E., Wienand, U. and Reddy, A.R., 2007, Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids leading to an increased antioxidant potential, *Metabol Eng*. 9, 95–111.

Reddy, P.V. and Soliman, K.M., 1997, Identification of wild and cultuvated hordeum species using two primer RAPD fragments, *Biologia Plantarum*, 39(4), 543-552.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.

Rohlf, F.J., 1998, NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.02. Exeter Publications, New York, USA.

Rothuizen, J. and Van Wolferen, M., 1994, Randomly amplified DNA polymorphisms in dogs are reproducible and display Mendelian transmission, *Animal Genetics*, 25, 13-18.

Rudin, M.D. and Felix, C., 1996, Omega-3 oils; A practical Guide. US: Avery.

Ruegger, M. and Chapple, C., 2001, Mutations that reduce sinapoylmalate accumulation in *Arabidopsis thaliana* define loci with diverse roles in phenylpropanoid metabolism, *Genetics,* 159, 1741-1749.

Russell, P.J. (ed), 2001, Genetics, Benjamin Cummings, San Fransisco, USA.

Saiyed, Z.M., Parasramka, M., Telang, S.D. and Ramchand, C.N., 2007, Extraction of DNA from agarose gel using magnetic nanoparticles (Magnetite Or Fe3O4), *Analytical Biochemistry,* 363, 288–290.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, Molecular Systematic. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, New York

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F., 1998, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 76, 270-276.

Sarı, S., 2008., Farelerde ehrlich asit solid tümör modelinde thymus spyleus ve taurinin, böbrek mda, glutatyon, aopp düzeylerine ve sod aktivitesine etkileri, Yüksek Lisans Tezi,

Sassa, H., 2007, A technique to isolate DNA from woody and herbaceous plants by using a silica-based plasmid extraction column, *Analytical Biochemistry*, 363, 166–167.

Saw, J.T., Bahari, M.B., Ang, H.H. and Lim, Y.H., 2006, Potential drug–herb interaction with antiplatelet/anticoagulant drugs*, Complementary Therapies in Clinical Practice,* 12, 236–241.

Scarafani, A. and Duranti, M., 2001, An approach to critical assesment of the experimental conditions in practical molecular biology: isolation of plant DNA, *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 29,21-23.

Schittko, U., Burghardt, F., Fiedler, K., Wray, V. and Proksch, P., 1999, Sequestration and distribution of favonoids in the common blue butterfly Polyommatus icarus reared on Trifolium repens, *Phytochemistry*, 51, 609-614.

Schrier, R.W., Arnold, P.E., Putten, V.J.V. and Burke, T.J., 1987, Cellular calcium in ischemic acute renal failure: role of calcium entry blockers, *Kidney Int.*, 32,313-321.

Scott, M.P., Heymes, K.M. and Williams, S.M., 1992, Parentage analysis using RAPD-PCR, *Nucleic Acids Research*, 20, 54-93.

Selçuk, S.E., 2008, Türkiye'nin kuzeyinde yayılış gösteren yediuyur, *Glis glis* (Linnaeus, 1766) (Mammalia: Rodentia) populasyonlarının rapd-pcr ile analizi, Yüksek Lisans Tezi, , *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

Sezgin, N., 2006, Adaçayı (*Salvia* spp.) bitkisinde antioksidan maddelerin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul.

Shahidi, F., 2000, Antioxidants in food and food antioxidants, *Nahrung*, 44,158-163.

Shen, G., Pang, Y., Wu, W., Deng, Z., Liu, X., Lin, J., Zhao, L., Sun, X. and Tang, K.N., 2005, Molecular cloning, characterization and expression of a novel Asr gene from *Ginkgo biloba*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 836–843.

Shengwu, H., Ovesná, J.K., Kučera, V., Vyvadilová, M., 2003, Evaluation of genetic diversity of Brassica napus germplasm from China and Europe assessed by RAPD markers, *Plant Soil Envir*., 49 (3), 106-113

Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M. and Ross, A.C., 1999, Modern nutrition in health and disease, 9th Ed. Baltimore, 9th Ed., pp. 90–92, 1377–1378, Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Sies, H., 1991, Oxidative stress from basic research to clinical application, *American Journal of Medicine*, 9, 31-37.

Simopoulos, A.P., 1999, Essential fatty acids in health and chronic disease, *Am. J. Clin. Nutr., 70*(3), 560–569.

Singh, S.K., Gopichandi, Ahuja, P.S., Rajkumar, S., 2010, Estimation of Genetic Diversity in *Ginkgo biloba* Trees from Northwestern India Using AFLP and Microsatellite Markers, *J. Plant Genet. Transgenics* 1 (1), *16-20*

Singleton, V.L. and Rossi, J.A., 1965, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144–158.

Skoula, M., El Hilali, I. and Makris, A.M., 1999, Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. Clones using RAPD markers and comparision with the essential oil profiles, *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, 559-568.

Skujiene, G. and Soroka, M., 2003, A comparison of different DNA extraction methods for slugs (Mollusca: Pulmonata), *Ekologija*, 1, 12-16.

Solmaz, İ., 2010, Bazı karpuz genotiplerinin SSR ve SRAP markörleri ile karakterizasyonu ve fusarıum solgunluğu (*Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*)'na dayanımlarının klasik ve moleküler yöntemlerle araştırılması, Doktora Tezi.

Somers, D.J., Kirkpatrick, R., Moniwa, M. and Walsh, A., 2003, Mining single–nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs, *Genome*, 49, 431–437.

Soong, Y.Y. and Barlow, P.J., 2004, Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds, *Food Chem.*, 88, 411–417.

Stadtman, E.R., 2002, Importance of individuality in oxidative stress and aging, *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 597–604.

Stampfer, M.J., Hu, F.B., Manson, J.E., Rimm, E.B. and Willett, W.C., 2000, Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and lifestyle, *N. Engl. J. Med.,* 343(1), 16–22.

Staub, J.E., Kuhns, L.J., May, B. and Grun, P., 1982, Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes, *J. Amer. Hort. Sci*., 107, 428-432.

Steinman, H.M., 1982, Superoxide dismutases: protein chemistry relationship, in LW oberley, ed, superoxide dismutasse, CRC Press, Boca Raton FL, USA, 1, 11-68.

Storz, G. and Imlayt, J.A., 1999, Oxidative stress**,** *Curr. Opin. Microbiol*.**,** 2, 188-194.

Surgun, Y., 2008, Bazı pamuk çeşitlerinde genetik farklılığın RAPD tekniği ile belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Muğla.

Talbert, L.E., Blake, N.K., Chee, P.W., Blake, T.K. and Magyar, G.M., 1994, Evolution of "sequence tagged site": PCR products as molecular markers in wheat, *Theoretical and Applied Genetics*, 87, 789–794.

Tanaka, Y., Brugliera, F. and Chandler, S., 2009, Recent progress of flower colour modification by biotechnology, *Int. J. Mol. Sci., 10*, 5350-5369.

Tanksley, S.D., 1983, Molecular markers in plant breeding, *Plant Mol. Biol. Rep*., 1(1), 3-8.

Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H. and Bonierbale, M.W., 1989, RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science, *Biotechnology*, 47, 257-264

Tekeli, Y, 2009, Konya bölgesindeki bazı Centaurea türlerinin bazı kimyasal ve biyolojik özelliklerinin belirlenmesi, *Selçuk Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü*, Konya.

Temizkan, G ve Arda, N., 1999, Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

Temizkan, G. ve Arda, N., 2004, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Matbaacılık, İstanbul, 345.

Thippeswamy, N.B. and Naidu, K.A., 2005, Antioxidant potency of cumin varieties-cumin, black cumin and bitter cumin-on antioxidant systeems, *Eur. Food Res Technol*., 220,473-476.

Tietz, N.W., 1995, Clinical guide to laboratory tests, W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania, USA.

Tredici, P.D., 2000, *Ginkgo biloba,* Hardwood Publishers imprint, part of the Gordon & Breach Publishing Group, 274.

Tsai, W.S., Nagawa, H., Kaizaki, S., Tsuruo, T. and Muto, T., 1998, Inhibitory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on sigmoid colon cancer transformants, *J. Gastroenterol*., *33*, 206–212.

Tsujikawa, T., Satoh, J., Uda, K., Ihara, T., Okamoto, T. and Araki, Y., 2000, Clinical importance of n-3 fatty acid-rich diet and nutritional education for the maintenance of remission in Crohn's disease, *J. Gastroenterol*., *35*(2), 99–104.

Tsumura, Y., Motoike, H. And Ohba, K., 1992, Allozyme variation of old *Ginkgo biloba* memorial trees in western Japan, *Can. J. For. Res.,* 22, 939–944.

Tunalıer, Z., Öztürk, N., Koşar, M., Başer, K.H.C., Duman, H. and Kırımer, N., 2002, Bazı sideritis türlerinin antioksidan etki ve fenolik bileşikler yönünden incelenmesi, *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Bildiriler, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir, Eds. K.H.C.Başer ve N.Kırımeri, ISBN 975-94077-2-8

Tüzün, C., 2002, Biyokimya, Palme Yayıncılık, Ankara.

Uğuzlar, H., 2009, Antalya'da yetişen *Araceae arum*'un antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde tayini, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Konya.

Uysal, M., 1998, Serbest radikaller, lipit peroksidleri organizmada prooksidanantioksadan dengeyi etkileyen koşullar, *Klinik Gelişim*, 11, 336–341.

Uzun, A., 2004, Biyoçeşitlilik ve Türkiye biyoçeşitliliğine genel bir bakış, *Sakarya Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi.* 7, 257- 270.

Vaya, J., Aviram, M., 2001, Nutritional antioxidants: mechanisms of action, analyses of activities and medical applications, *Current Medicinal Chemistry–Immunology Endocrinology& Metabolic Agents,* 1, 99-117.

Vazquez, J.L.H., Gomez-Mercado, F., Guerrero, J-L.G., Rodriguez-Garcia, I. and Garcia-Maroto, F., 1999, Genetic relationships and population structure within taxa of endemic *Sideritis pusilla (Lamiaceae)* assessed using RAPDs, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 129, 345-358.

Villordon, A.Q. and LaBonte, D.R., 1995, Variation in randomly amplified DNA markers and storage root yield in 'Jewel' sweet potato clones, *J. Amer. Soc. Hort. Sci*., 120, 734-740.

Von Sonntag, C., 1987, The Chemical Basis of Radiation Biology, Taylor& Francis, London.

Vorster, B.J., Kunert, K.J. and Cullis, C.A., 2002, Use of representational difference analysis for the characterization of sequence differences between date palm varieties, *Plant Cell Rep*., 21, 271–275.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., De Lee T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelemen, J., Kuiper, M and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407-4414.

Vural, H.C., 2009, Genomic DNA isolation from aromatic and medicinal plants growing in Turkey, *Journal of Medicinal Plant Research*, 4 (2), 059–064.

Vural, H.C. and Dageri, A., 2009, Optimization of DNA isolation for RAPD-PCR analysis of selected (*Echinaceae purpurea* L. Moench) medicinal plants of conservation concern from Turkey *Journal of Medicinal Plant Research,* 3(1), 16-19.

Wada, L., and Ou, B., 2002, Antioxidant activity and phenolic content of oregon caneberries, *Journal Agricultural Food Chemistry*, 50, 3495-3500.

Walton, M., 1993, Molecular markers: which ones to use?, *Seed World*, 23–29Wang, X.-O., Song, W.-Q., Liu, S.G. and Chen, R.-Y., 2001, RAPD markers related to sex locus in *Ginkgo biloba* L, *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis,* 34(3), 116–117.

Wang, G.-X., Cao, F.-L. and Fang, Y.-M., 2010, Genetic diversity of ancient male ginkgo trees by ISSR analysis, *International Journal of automation and computing*, 32(2), 39-45.

Wang, L., Xing, S.-Y., Yang, K.-Q., Wang, Z.-H., Guo, Y.-Y. and Shu, H.-R., 2006, Genetic relationships of ornamental cultivars of *Ginkgo biloba* analyzed by AFLP techniques, *Acta Genetica Sinica*, 33, 11, 1020–1026.

Weeden, N.F., 1989, Applications of isozymes in plant breeding, *Plant Breeding Reviews*, 6,11 -54.

Weeden, N.F., Timmerman, G.M., Hemmat, M., Kneen, B.E. and Lodhi, M.A., 1992, Inheritance and reliability of RAPD markers, applification of RAPD technology to plant breeding, *Joint Plant Breeding Symposia Series*, Minneapolis, Minnesota.

Weissing, K., 1995, DNA Fingerprinting Plants and Fungi, CRC Press, USA.

Welsh, J. and Clelland, Mc.M., 1990, Fingerprinting menomes using PCR with arbitrary primers, *Nucleic Acids Res*., 18; 7213-7218.

Welsh, J., Hoercutt, R.J., McClelland, M. and Sobral, B.W.S., 1991a, Parentage determination to maize hybrids using the arbitrary primed polymerase chain reaction (AP-PCR), *Theor. Appl. Genet.*, 82, 473–476.

White, B.A., 1997, PCR cloning protocols from molecular cloning to genetic engineering, *Humana Press Inc*., New Jersey, USA.

White, R. and Lalouel, J.M., 1988, Chromosome mapping with DNA markers, *Scientific American*, 258, 20-28.

White, R., Leppert, M., Bishop, D.T., Barker, D., Berkowitz, J., Brown, C., Callahan, P., Holm, T. and Jerominski, L., 1985, Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes*, Nature*, 313, 101-105.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990, DNA polimorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucl. Acids Res*., 18, 6531-6535.

Winkel-Shirley, B., 2001, Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology, *Plant Physiol,* 126, 485-493.

Winter, P. and Kahl, G., 1995, Molecular marker technologies for plant improvement, *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 11, 438–448.

Wolff, K. and Rijin, P.V., 1993, Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum *(Dendranthema grandiflwa* Tzvelev.) using random primers, *Heredity,* 71, 335-341.

Wulff, E.G., Torres, S. and Vigil, E.G., 2002, Protocol for DNA extraction from potato tubers, *Plant Molecular Biology Reporter,* 20, 187a–187e.

Xiaomei, W., Wenqin, S., Song, L., Ruiyang C., 2001, RAPD markers related to sex locus in *Ginkgo biloba* L. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 34(3), 116-117.

Xu, F., Cai, R., Cheng, S., Du, H., Wang, Y. and Cheng, S., 2008, Molecular cloning, characterization and expression of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Ginkgo biloba, Afr J. Biothenol*., 7, 721-729.

Xu, F., Cheng, S.Y., Cheng, S.H., Wang, Y., Du, H.W., 2007, Time course of expression of chalcone synthase gene in *Ginkgo biloba*, 33(4), 309-317.

Xu, X., Kawasaki, S., Fujimura, T. and Wang, C., 2005, A protocol for high-throughput extraction of DNA from rice leaves, *Plant Mol. Biol. Rep*., 23, 291–295.

Yalçın, M.S., 2007, Hepatitli hastalarda antioksidan enzimlerinin süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) aktivite düzeylerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Adana.

Yalım, D., 2005, Türkiye'de yetişen arpa çeşitlerinde genetik çeşitliliğin ISSR (basit dizilim tekrarları) moleküler markör tekniği ile saptanması , Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Adana.

Yan X.-L., Chen Y.-Y., Guan, B.-C. and Fu C.-X., 2009, Eleven novel microsatellite markers developed from the living fossil *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae), *Conserv. Genet*., 10, 1277–1279.

Yan, X.F., Lian, C.L. and Hogetsu, T., 2006, Development of microsatellite markers in ginkgo (*Ginkgo biloba* L.)**,** *Molecular Ecology Notes,* 6 , 301–302.

Yang, C.S, Landau, J.M., Huang, M.T., and Newmark, H.L., 2001, Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, *Annu. Rev. Nutr.,* 21, 381.

Yanishlieva, N.V., Pokomy, J. and Gordon, M., 2001, Inhibiting oxidation in antioxidants in food: practical applications., CRC press LLC and Woodhead Publishing Ltd, New York, USA, 288.

Yeh, C.F., Yang, R., Boyle, T., 1997, POPGENE Version 1.31, Windows-based Software for Population Genetics Analysis.

Yeşbek, A., 2007, *T. dicoccoides ve T. dicoccon* türleri arasındaki genetik çesitliligin RAPD-PCR teknigi ile belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Anakara.

Yıldırım, A. ve Kandemir, N., 2001, Genetik markörler ve analiz metodları, *Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*, Editörler; Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, Türkiye, 334-363.

Young, N.D., Shoemaker, R.C., 2006, Genome studies and molecular genetics, Part 1: Model legumes 100 recent duplication in soybean genome. vol. 15, exploring the structure, function and evolution of legume genomes,*Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 95–98.

Youssef, S.S., Moghaieb, R.E.A., El-Mergawy, R.G. and El-Sharkawy, A.M., 2007, Genetic markers associated with salt tolerance in canola *(Brassica napus* L.), *Arab J. Biotech.,* 10 (1), 143-154.

Yurawecz, M.P., Hood, J.K., Mossoba, M.M., Roach, J.A. and Ku, Y., 1995, Fatty acids determined as oxidation products of conjugated octadecadienoic acid, *Lipids*, *30*, 595–598.

Yuryev, A., 2007, PCR Primer Design, Humana Press

Zhang, H.Y., Yang, Y.M. and Liu, X. Z., 2011, Bamboo species relations revealed by random amplified polymorphism chloroplast DNA, African Journal of Agricultural Research, 6(5), 1241-1245.

Zheng, W., and Wang, S. Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.,* 49, 5165-5170.

Zietkiewicz, E., Antoni, R. and Labuda, D., 1994, Genome fingerprintig by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase Chain reaction amplification, *Genomics*, 20 (2), 176-183.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Esra Maltaş
Uyruğu : T. C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Akşehir, 1982
Telefon : 0332 223 3896
Faks : -
e-mail : emaltas@selcuk.edu.tr

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	Selçuklu Süper Lisesi, Akşehir	1999
Üniversite	:	S.Ü., Fen-Edebiyat Fak., Kimya Bölümü, Konya	2003
Yüksek Lisans	:	S.Ü., Fen Bilimleri Ens., Kimya ABD, Konya	2005
Doktora	:	S.Ü., Fen Bilimleri Ens., Kimya ABD, Konya	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2004-devam ediyor	S.Ü. Fen Fak., Kimya Bölümü	Araş. Gör.

YABANCI DİLLER

İngilizce