



**STRESE MARUZ BIRAKILAN ANASONDA (*Pimpinella
anisum*) ANTIOKSİDAN MEKANİZMA VE BIYOAKTİF
BİLEŞİKLERDEKİ DEĞİŞİMİN BELİRLENMESİ**

Hayari GÜNEŞ

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nevzat ESİM

2007

Her hakkı saklıdır

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STRESE MARUZ BIRAKILAN ANASONDA (*Pimpinella anisum*)
ANTİOKSİDAN MEKANİZMA VE BİYOAKTİF
BİLEŞİKLERDEKİ DEĞİŞİMİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
HAYRİ GÜNEŞ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Nevzat ESİM

BİNGÖL-2017

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

STRESE MARUZ BIRAKILAN ANASONDA (*Pimpinella
anisum*) ANTIOKSİDAN MEKANİZMA VE BİYOAKTİF
BİLEŞİKLERDEKİ DEĞİŞİMİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hayri GÜNEŞ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 06.09.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Nevzat ESİM

Jüri Başkanı


Yrd. Doç. Dr.
Sedat BOZARI
Üye


Yrd. Doç. Dr. İbrahim
Halil GEÇİBESLER
Üye

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim Yasin ERDOĞAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans süresince benden bilgi, deneyim ve yardımlarını esirgemeyen, benim için hocadan öte bir dost ve arkadaş olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Nevzat ESİM'e,

Hem laboratuvar çalışmalarında hem de tez yazım aşamasında benden desteğini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. İbrahim Halil GEÇİBESLER'e, yine laboratuvar çalışmaları esnasında desteklerinden dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Aydın Şükrü BENGÜ'ye,

Ders döneminde benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Lütfi BEHÇET'e, Sayın Doç. Dr. Ömer KILIÇ'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Bülent KAYA'ya ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Alpaslan KOÇAK'a,

Bu çalışma için zaman ayırmamda bana kolaylık sağlayan kurumum Bingöl Milli Eğitim Müdürlüğü yöneticilerine,

Hayatımın her alanında olduğu gibi bu yüksek lisans çalışmamda da maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili eşim ve biricik kızıma,

Teşekkür ederim.

Hayri GÜNEŞ

Bingöl 2017

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
GİRİŞ.....	1
1.1. Bitkilerde Stres.....	2
1.1.1. Tuz Stresi	3
1.1.1.1. Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkileri.....	3
1.1.2. Kuraklık Stresi	4
1.1.2.1. Kuraklığın Bitki Üzerine Etkileri.....	5
1.1.3. Oksidatif Stres.....	6
1.2. Reaktif Oksijen Türleri	7
1.2.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri	8
1.2.1.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Proteinler Üzerine Etkileri.....	8
1.2.1.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Karbonhidratlar Üzerine Etkileri	9
1.2.1.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Nükleik Asitler Üzerine Etkileri.....	9
1.2.1.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Lipidler Üzerine Etkileri.....	10
1.3. Antioksidanlar	10
1.3.1. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	11
1.3.1.1. Doğal Antioksidanlar	12
1.3.1.1.1. Tokoferoller (E Vitamini).....	13
1.3.1.1.2. Askorbik Asit (C vitamini).....	13
1.3.1.1.3. Fenolik Maddeler.....	13
1.3.1.1.4. Karotenoidler	15

1.3.1.1.5. Antioksidan Enzimler	16
1.3.1.2. Sentetik Antioksidanlar	16
1.3.1.2.1. Gallatlar	16
1.3.1.2.2. Bütillenmiş Hidroksi Anisol (BHA).....	16
1.3.1.2.3. Bütillenmiş Hidroksi Toluen (BHT)	16
1.3.1.2.4. Tersiyer Bütil Hidrokinon (TBHQ).....	17
1.4. Anason (<i>Pimpinella anisum</i> L.)	17
2. KAYNAK ÖZETLERİ	21
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	29
3.1. Kullanılan Materyal	29
3.1.1. Ekstraktların Hazırlanması	30
3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	32
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Hazırlanması	33
3.1.3.1. DPPH Giderme Aktivitesi Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler....	33
3.1.3.2. Metal Şelatlama Kapasitesi Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler..	33
3.1.3.3. Toplam İndirgeme Kuvveti Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler..	33
3.1.3.4. Total Fenol İçeriği Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler.....	34
3.1.3.5. Ttotal Flavanoid İçeriği Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler.....	34
3.1.3.6. ABTS Radikali Giderme Aktivitesi Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler	34
3.1.3.7. Toplam Antosiyanin Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler.....	34
3.1.3.8. Standart Çözeltiler.....	35
3.1.3.9. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarının Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler	35
3.1.3.10. Süperoksit Anyon Miktarının Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler	35
3.1.3.11. Lipid Peroksidasyon Aktivitesinin Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler	36
3.1.3.12. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler	36
3.1.3.13. Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler	36
3.1.3.14. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler	37

3.2. Yöntemler.....	37
3.2.1. Total Fenolik Madde İçeriği Tayini.....	37
3.2.2. Total Flavonoid Madde İçeriği Tayini.....	38
3.2.3. Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (DPPH Testi).....	38
3.2.4. Metal Şelatlama Aktivitesinin Belirlenmesi.....	39
3.2.5. İndirgeme Gücü Aktivitesi.....	39
3.2.6. ABTS Radikali Giderme Aktivitesi.....	40
3.2.7. Toplam Antosiyanin Tayini.....	40
3.2.8. Reaktif Oksijen Türleri Miktarının Belirlenmesi.....	41
3.2.8.1. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarının Belirlenmesi.....	41
3.2.8.2 Süperoksit Anyon Miktarının Belirlenmesi.....	42
3.2.9. Lipid Peroksidasyon Miktarının Belirlenmesi.....	43
3.2.10. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	44
3.2.10.1. Hüresel Proteinlerin Ekstraksiyonunun Belirlenmesi.....	44
3.2.10.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	44
3.2.10.3. Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	44
3.2.10.4. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	45
3.2.11. Uçucu Yağ Bileşenlerinin Belirlenmesi.....	46
3.2.11.1. Uçucu Yağ Bileşenlerinin Belirlenmesinde Kullanılan GC-MS Koşulları.....	47
3.2.12. İstatiksel Analiz.....	47
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	48
4.1. Bulgular.....	48
4.1.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Seviyesi.....	48
4.1.1.1. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı.....	48
4.1.1.2 Süperoksit Anyonu (O ₂ ⁻) Miktarı.....	49
4.1.2 Lipid Peroksidasyon Miktarı.....	50
4.1.3. Protein Miktarı.....	51
4.1.4. Antioksidan Enzimler.....	52
4.1.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi.....	52
4.1.4.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi.....	54
4.1.4.3. Peroksidaz (POD) Enzim Aktivitesi.....	55
4.1.5. Antioksidan Aktivite Testleri.....	56

4.1.5.1 Metal Şelatlama Aktivitesi	56
4.1.5.2. Toplam İndirgeme Kuvveti	57
4.1.5.3. DPPH Giderme Aktivitesi	58
4.1.5.4. ABTS Katyon Radikali Giderme Aktiviteleri	60
4.1.6. Toplam Fenol İçerikleri	62
4.1.7. Toplam Flavonoid Miktarı	63
4.1.8. Antosiyanin İçeriği	64
4.1.9. Uçucu Yağ Bileşenleri	65
4.2. Tartışma	68
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	76
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	92

İMGELELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	: Celcius derece
A_{Kontrol}	: Kontrolün absorbansı
ALS	: Amyotrofik lateral skleroz
A_{Numune}	: Numunenin absorbansı
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksi tolüen
CAT	: Katalaz
DMSO	: Dimetilsulfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DPPH	: 2,2-Difenil 1-pikril hidrazil
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
E-VİT	: E-Vitamini
FCR	: Folin-Ciocalteu reaktifi
g	: Gram
GA	: Gallik asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
KOG	: Kontrol grubu
KUG	: Kuraklık grubu
LPO	: Lipit Peroksidasyon
m	: Metre
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
O ₂ ⁻	: Süperoksit anyon radikali

POD	: Peroksidaz
ROT	: Reaktif oksijen türü
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBHQ	: Tersiyer bütül hidrokinon
TCA	: Triklorasetik asit
TUG	: Tuzluluk stresi grubu
Troloks	: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
UV	: Ultraviyole
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
μm	: Mikrometre

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Reaktif Oksijen Türlerinin proteinlerin üzerine oluşturdukları karbonilasyon ürünleri.....	8
Şekil 1.2.	Hidroksil radikalının pürin ve pirimidin bazları üzerine etkisiyle oluşan ürünler.....	9
Şekil 1.3.	Lipid peroksidasyonu tepkimeleri.....	10
Şekil 1.4.	Antioksidanların sınıflandırılması.....	12
Şekil 3.1.	Anason ekiminin yapıldığı saksılar.....	29
Şekil 3.2.	Kontrol grubu, tuz stresi ve kuraklık stresine sokulan anason bitkisi....	30
Şekil 3.3.	Bitki ekstralarının soxklet ekstraktöründe hazırlanması.....	31
Şekil 3.4.	Çözücü ihtiva eden bitki ekstralarının rotary evaporator ile çektilmesi	31
Şekil 3.5.	Anason örneklerinin kuru ekstraktların.....	32
Şekil 3.6.	Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik.....	42
Şekil 3.7.	O_2^- miktarını belirlemede kullanılan standart grafik.....	43
Şekil 3.8.	Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik.....	46
Şekil 3.9.	Uçucu yağ bileşenleri miktarının tespitinde kullanılan GS-MS cihazı...	47
Şekil 4.1.	Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarları.....	49
Şekil 4.2.	Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki süperoksit anyon miktarları.....	50
Şekil 4.3.	Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki lipit peroksidasyon miktarları.....	51
Şekil 4.4.	Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki protein miktarları.....	52
Şekil 4.5.	Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki SOD aktivitesi.....	53

Şekil 4.6.	Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki SOD aktivitesi.....	54
Şekil 4.7.	Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki POD aktivitesi.....	55
Şekil 4.8.	Strese maruz kalan anasonda % metal şelatlama kapasiteleri.....	57
Şekil 4.9.	Strese maruz kalan anasonda Fe ⁺³ 'ü Fe ⁺² 'ye indirgeme kapasitesi.....	58
Şekil 4.10.	Strese maruz kalan anasonda % DPPH giderme aktivitesi.....	60
Şekil 4.11.	Anason örnekleri ve antioksidan bileşiklerin ABTS katyon radikali giderme aktiviteleri.....	61
Şekil 4.12.	Gallik asit için kalibrasyon grafiği.....	63
Şekil 4.13.	Kersetin için kalibrasyon grafiği.....	64
Şekil 4.14.	Kontrol grubu anasonun uçucu bileşenlerinin GC-MS kromatografik görüntüsü.....	66
Şekil 4.15.	Kuraklık stresine maruz bırakılan anasonun uçucu bileşenlerinin GC-MS kromatografik görüntüsü.....	67
Şekil 4.16.	Tuzluluk stresine maruz bırakılan anasonun uçucu bileşenlerinin GC-MS kromatografik görüntüsü.....	67

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4.1. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarları.....	48
Tablo 4.2. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki süperoksit anyon miktarları.....	50
Tablo 4.3. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki lipit peroksidasyon miktarları.....	51
Tablo 4.4. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki protein miktarları.....	52
Tablo 4.5. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki SOD aktivitesi.....	53
Tablo 4.6. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki CAT aktivitesi.....	54
Tablo 4.7. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki POD aktivitesi.....	55
Tablo 4.8. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki metal şelatlama kapasiteleri.....	56
Tablo 4.9. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki toplam indirgeme kuvveti.....	58
Tablo 4.10. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki % DPPH giderme aktivitesi.....	59
Tablo 4.11. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki ABTS katyon radikali giderme aktiviteleri.....	61
Tablo 4.12. Anason örnekleri ve antioksidan bileşiklerin etkili konsantrasyon (EK ₅₀) değerleri.....	62
Tablo 4.13. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki toplam fenol içerikleri.....	63

Tablo 4.14. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki toplam flavonoid içerikleri.....	64
Tablo 4.15. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki toplam antosiyanin içerikleri.....	65
Tablo 4.16. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki uçucu bileşenlerinin değişimi.....	66



STRESE MARUZ BIRAKILAN ANASONDA (*Pimpinella anisum*) ANTIOKSİDAN MEKANİZMA VE BİYOAKTİF BİLEŞİKLERDEKİ DEĞİŞİMİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Bu çalışmada; tuz ve kuraklık stresine maruz bırakılan anason bitkisinde oluşan oksidatif hasarın seviyesini belirlemek için reaktif oksijen türlerinden (ROT) hidrojen peroksit (H_2O_2) ile süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) miktarı, lipid peroksidasyon (malondialdehit, MDA) oranı ve hücrel antioksidan enzimlerin (katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz) aktivitelerindeki değişim incelenmiştir. Ayrıca stres esnasında biyoaktif bileşenlerin değişimini belirlemek için de; tüm bitki uçucu yağ bileşenleri, total fenolik, total flavanoid ve antosiyanin içerikleri ve antioksidan aktivitesindeki değişimler de araştırılmıştır. Bu amaçla, bitki çiçeklendikten sonra (72. günde) tuz stresi için 150 mM NaCl ve kuraklık stresi içinde sulama yapmayarak 5 gün boyunca strese maruz bırakılmıştır. Kontrol grubuna göre hem tuz hem de kuraklık stresleri ROT ve MDA oranları önemli oranda arttırmıştır. Kuraklık stresi uygulanmış bitkilerde kontrole göre H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ ve MDA miktarları sırasıyla %231,5, %166,6 ve %191 gibi çok önemli oranlarda arttırırken tuz stresi ise %45, %51,8 ve %34 gibi oranlarda arttırmıştır. SOD ve POD enzim aktiviteleri her iki stres uygulamasında azalmışken CAT aktivitesi ise artmıştır. Uçucu yağ bileşenlerinin miktar ve içerikleri her iki stres uygulamasında değişmiş olup anasonun en önemli bileşiği olan anetol miktarı kontrole göre tuz ve kuraklık uygulanmış bitkilerde sırasıyla %14,2 ve %8,4 oranlarında artmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında her iki stres uygulaması metal şelatlama kapasitesini, DPPH radikali giderme aktivitesini ve ABTS radikali giderme aktivitelerini arttırmış, toplam fenolik miktarını ve indirgeme gücünü azaltmış, toplam flavonoid miktarını ise değiştirmemiştir. Antosiyanin miktarı kuraklık stresi ile önemli oranda artarken tuz stresi ile azalmıştır.

Anahtar Kelimeler: Tuzluluk, kuraklık, antioksidan, oksidatif stres, anason.

DETERMINATION of CHANGE in ANTIOXIDANT MECHANISM and BIOACTIVE COMPOUNDS in ANISE (*Pimpinella anisum*) EXPOSED TO STRESS

ABSTRACT

In this study, effects of salinity and drought on the activities of antioxidant enzymes (catalase, peroxidase and superoxide dismutase), reactive oxygen species (ROS) contents, lipid peroxidation level (MDA), total protein, in anise (*Pimpinella anisum*) were investigated. Also, DPPH free radical scavenging activity, total phenol contents by Folin-Ciocalteu reagent (FCR), total antioxidant activity, metal chelating capacity, total reducing power, total flavonoid contents and volatile compounds were detected. In this aim, after plant flowering (72 day) 150 mM NaCl and without water were treatment for salinity and for drought, respectively. ROS and MDA content were significantly increased by both salinity and drought as compared with control. H₂O₂, O₂⁻ and MDA contents were significantly increased by 231.5%, 166.6%, 191% and by 45%, 51.8%, 34% as compared with control in plants under drought and salinity, respectively. While SOD and POD enzyme activities decreased in both stress applications, CAT activity increased. The amounts and contents of volatile oil components were changed in both stresses, and the amount of aneitol, which is the most important compound of the anise, salinity and drought compared to the control increased by 14.2% and 8.4%, respectively. With both stress, metal chelating activity, DPPH radical scavenging activity and ABTS radical scavenging capacity increased, total phenolic and reducing power contents decreased and the total flavonoid contents not changed. The amount of anthocyanin significantly increased with drought stress and decreased with salt stress.

Keywords: Salinity, drought, antioxidant, oxidative stress, anise.

1. GİRİŞ

Dünya nüfusu hızla artarak günümüzde 7,44 milyara ulaşmıştır. Nüfusun bu hızla artacağı düşünüldüğünde tahmini olarak 2050 yılında 9 milyarı bulacaktır (Mahajan and Tuteja 2005; Esim 2011). FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu)'nun verdiği bilgilere göre yeryüzündeki işlenebilir toplam tarımsal araziler azalmaktadır. Bunun aksine nüfus artışı ile birlikte, kişi başına düşen tarım arazisi alanı da her geçen gün azalmaktadır. Dünyada da ülkemizde de çeşitli stres faktörlerinin etkisiyle tarım alanlarının işlenemez hale gelmesi ile birlikte nüfus artışı, uzun dönemde risk nedeni olarak değerlendirilmektedir (Jones et al. 1989; Bray et al. 2000; Doğru 2006; Esim 2011).

Yeryüzünde yaşayan canlıların büyük bir kısmını oluşturan bitkiler, canlı yaşamının devamlılığı için ekosistemin önemli elamanlarından. Besin piramidinin en altında bulduklarından dolayı, ekosistemin birincil üreticileri konumundadırlar. Yaşadıkları ortamdan azot, fosfor, potasyum, kalsiyum gibi besin elementleri ve karbondioksit olarak kendileri ve diğer canlılar için gerekli olan besinleri üretirler. Bitkilerin önemi, sadece birincil üretici olmaları ile sınırlı olmayıp, ekosistemin oksijen ve karbondioksit dengesinin sağlanması ve buna bağlı olarak yeryüzündeki sıcaklık kontrolünde de görevlidirler. Aynı zamanda bitkiler, toprağa organik madde kazandırır. Bu organik madde canlılara barınma ve beslenme ortamı sağlar. Topraktaki kökleri sayesinde erozyonu önlemede de görev alırlar. Bitkiler; tarım, mobilyacılık, tekstil, ilaç ve kimya sanayinde de insanların faydalandığı canlılardır. Bütün bu görevleri, bitkilerin doğada ne kadar önemli ve vazgeçilmez olduğunun göstergesidir. Ancak canlılığın devamlılığı için bu kadar önemli olan bitkinin gelişimi ve verimliliği, çeşitli çevresel nedenlerden de olumsuz etkilenmektedir (Levit 1980; Özcan vd. 2004; Kaya 2008)

1.1. Bitkilerde Stres

Bitkiler, yaşadıkları çevrede büyüme ve gelişme dönemlerinde yaşamlarını kısıtlayıcı pek çok çevresel faktöre maruz kalarak strese girebilirler. Stres; bitkilerde olumsuzluğa neden olup zarar meydana getiren çevresel etken olarak kabul edilir. Bu zarar bitkinin yapısının bozulması sonucu ortaya çıkar ve sonuçta; bir bitkinin büyüme, gelişme ve verimliliğinde azalmaya neden olur. Bitkiler de bu durumda, birçok mekanizmanın yanında, biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmalarını devreye sokarak bu mevcut olumsuzluklara karşı koymaya çalışır. Ancak bu tepkiler sınırlıdır (Hale and Orcutt 1987; Kocaçalışkan 2004; Esim 2011).

Bitkilerin nadir olarak stressiz bir ortamda yaşamlarını sürdürdükleri görülür. Bu durumdaki olaya sıfır stres denir. Sıfır stres, bitkilerin yaşamında herhangi bir hasara, verimde de bir kayba sebep olmaz. Bitkilerin en iyi büyüme ve gelişmeleri sıfır stres şartlarında olur (Esim 2011).

Stres genellikle bitkinin yaşayabilirlik, verimlilik, büyüme ve özümleme işlemlerine bakılarak ölçülmektedir (Taiz and Zeiger 2006). Bitkiler üzerinde stresin dereceleri bitki türüne göre değişkenlik gösterir. Sıfır stresten, ılımlı ve şiddetli strese kadar geniş sınırlar içerisinde dağılım gösterir. Bir bitki türünde düşük derecede strese sebep olan bir neden, başka bir bitki türünde şiddetli strese sebep olabilir. Strese dayanıklılık, bitkinin büyüme ve gelişme dönemlerinde değişkenlik gösterebilir. Bazı durumlarda bir bitkinin bazı kısımları strese maruz kalırken, diğer bazı kısımları ise strese dayanıklı olabilmektedir (Hale and Orcutt 1987; Salisbury and Ross 1992; Taiz and Zeiger 2006). Birçok bitki, stresin düşük dozlarına maruz kaldıktan sonra strese daha dayanıklı hale gelebilir. Bu olay, kuvvetlenme veya aklimasyon (uyum) olarak adlandırılır. Yani aklimasyon, yeni bir çevresel etmene maruz kalan bitkilerde meydana gelen ve kalıtsal olmayan değişikliklere denir (Kocaçalışkan 2004). Adaptasyon da stresle alakalı bir kavramdır. Adaptasyon pek çok nesil boyunca seçim sonucu kazanılan, genetiksel değişikliklere denir (Taiz and Zeiger 2006). Strese dayanıklılığın belli başlı iki çeşidi vardır. Bunlar sakınma ve toleranstır. Sakınma, bitkinin dış çevrede strese sebep olacak koşullara karşı hücrelerini stres altına sokmayan iç ortam oluşturmasıdır. Tolerans ise bitkinin uygun olmayan koşullara karşı başa çıkma potansiyelidir. Her ne kadar stres toleransı daha fazla tercih

edilse de literatürde bu terimin yerine strese direnç terimine de rastlanılmaktadır (Jones and Jones 1989; Mahajan and Tuteja 2005; Kocaçalışkan 2008; Esim 2011).

1.1.1. Tuz Stresi

Bitkileri etkileyen stres faktörleri genel olarak ikiye ayrılır. Bunlar biyotik (bitkiler, mikroorganizmalar, hayvanlar ve antropogenik etkiler) ve abiyotik stres faktörleri (radyasyon, sıcaklık, su, gazlar, mineraller vb.)'dir (Larcher 1995). Abiyotik streslerden kuraklık stresinden (%26) sonra minarel stresi %20'lik oranıyla kullanılabilir alanları en fazla etkileyen stres faktörüdür (Blum 1986). Tuzluluk stresi mineral stresler arasında en fazla görülen stres çeşididir. Yeryüzünde de tuzluluk stresine maruz kalmış tarım alanı 9 milyon hektardan fazladır (Tuteja 2007). Dünyada kullanılabilen tarım alanlarının %17'si sulanmaktadır. Sulanan bu alanın %20'si de tuzdan etkilendiği bilinmektedir (Tuteja 2007). Türkiye'de de çorak alanlar yüzey alanının %2'sini oluşturmaktadır. Bu çorak alanların da %4'ünü (yaklaşık 12 bin ha) tuzluluk stresine maruz kalmış topraklar oluşturmaktadır (Çulha ve Çakırlar 2011).

Yeryüzünde hızla artan nüfusa karşın tuzluluk, verimli tarımı tehlikeye atarak besin üretimini önemli düzeyde kısıtlayan çevresel etmenlerdendir (Botella et al. 2005). Primer ve sekonder tuzluluk olmak üzere oluşma sebeplerine göre iki grupta incelenir. Primer tuzluluğa; ana kayaların ayrışması, tuz deposu okyanuslar ve iklimsel etmenler neden olmaktadır (Munns and Tester 2008). Sekonder tuzluluğa ise; aşırı otlatma, tarımsal alanlarda yoğun sulama, çeşitli tuzlar bakımından zengin yer altı suyu seviyesinin toprak yüzeyine kadar yükselmesi, bir bölgenin doğal vejetasyonunu yok ederek tarım arazilerinin açılması ve toprakların tuzluluğa sebep olan kimyasallarla karıştırılması sebep olmaktadır (Pessarakli and Szabolcs 1999). Dünyadaki tuzlu toprakların çoğuna Na_2SO_4 ve NaCl sebep olmaktadır (Pessarakli and Szabolcs 1999; Çulha ve Çakırlar 2011).

1.1.1.1. Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkileri

Tuz stresi, osmotik ve iyon stresine neden olup bitkilerin büyümesini ve gelişmesini engeller (Parida and Das 2005). Kökü saran toprak katmanında tuz miktarının artmasıyla osmotik stres oluşmaktadır. Oluşan bu osmotik stres, kullanılabilir su miktarının azalmasına da sebep olur. Bu olaya "fizyolojik kuraklık" da denir (Tuteja 2007).

Kullanılabilir su miktarının azalması, hücrenin gelişmesini azaltmakta ve sürgün gelişimini yavaşlatmaktadır. Osmotik stresin devamında, ortamda artan Na ve Cl iyonlarının K^+ , Ca^{+2} ve NO^{-3} gibi besin elementleri ile reaksiyona girmesiyle bitkilerde besin dengesizliği oluşur (Hu and Schmidhalter 2005). Tuzluluk, osmotik ve iyon stresi ile bitkiler üzerindeki etkisini doğrudan gösterirken, dolaylı etkisini bu stres faktörleri sonucu bitkide meydana gelen yapısal bozulmalar ile gösterir. Tuz stresinin bitkiler üzerindeki etkileri; uygulanan tuz çeşidi ile miktarına, bitkinin çeşidine ve maruz kalma süresine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Tuzlu ortamlarda bitkiler genetik farklılıklara bağlı olarak çok farklı davranış gösterirler (Dajic 2006). Tuzluluğa karşı verilen bu farklı davranışlar sadece farklı türler için değil aynı türün farklı çeşitleri için de geçerlidir (Munns 2002; Çulha ve Çakırlar 2011).

1.1.2. Kuraklık Stresi

Dünya’da kişi başına tüketilen su miktarı nüfusun artışıyla birlikte artmıştır. Dünya nüfusu 1700’lü yıllarda yaklaşık 700 milyon dolayındaydı. Su tüketimi ise o yıllarda yaklaşık $110 m^3$ olup, bunun da %90’ı tarımda kullanılmaktaydı. 1990’lı yıllarda ise kullanılan su miktarının 40 kat arttığı bilinmektedir (Kılıç 2008). Buna karşın yeryüzündeki su kaynaklarında herhangi bir artış olmamaktadır. Bitki yetiştiriciliğinde de sulamanın kısıtlı şartlarda yapılması zorunlu hale gelmiştir. Dünyada kullanılan tarım alanlarının stres faktörlerinden etkilenme oranlarına bakıldığında; kuraklığın %26 oranla en yüksek paya sahip olduğu görülmektedir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005; Örs ve Ekinci 2015).

Bitkiler kuraklık, sıcaklık, tuzluluk ve aşırı yağış gibi abiyotik stres koşullarına karşı yapısındaki değişikliklerle tepki vererek büyüme ve gelişmelerini en az zararla geçirirler (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005). Bu abiyotik stres koşullarında meydana gelen değişikliklerin üzerinde uzun yıllardır çalışılmaktadır. Ancak istenen sonuçlar tam anlamıyla alınmamıştır. Bitkilerin kuraklık stresine tepkisini anlamak ve stres toleransını artırmak için yeni çalışmalar daha da artarak devam etmelidir (Örs ve Ekinci 2015).

Kuraklık, dört ana başlık altında incelenebilir. Bunlar; meteorolojik, tarımsal, hidrolojik ve sosyo-ekonomik kuraklıktır. Meteorolojik kuraklık, uzun bir süre yağışın normal değerlerinin altına düşmesi ile oluşur. Tarımsal kuraklık ise bitkinin topraktan yeterince

su bulamaması ile tanımlanır (Mengü vd. 2011). Hidrolojik kuraklık, nehir, göl ve yeraltı su kaynaklarındaki suyun azalması, sosyo-ekonomik kuraklık ise diğer kuraklık çeşitlerine bağlı olarak ekonomik dengelerin bozulması ile ortaya çıkar (Mishra and Singh 2010; Örs ve Ekinci 2015).

1.1.2.1. Kuraklığın Bitki Üzerine Etkileri

Bitkiler kuraklık stresine maruz kalma derecelerine göre tür ve çeşitleri hatta organları arasında farklılık gösterirler. Bitkilerde genotipe bağlı olarak ortaya çıkan kuraklık stresinden etkilenme dereceleri, o genotipte meydana gelen fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere bağlıdır (Kayabaşı 2011; Örs ve Ekinci 2015).

Bitkilerdeki kuraklık stresini genel olarak su noksanlığı ve kuruma olarak ikiye ayırabiliriz (Smirnoff 1993). Su noksanlığı, stomaların kapanmasına ve gaz değişiminde azalmaya neden olan su kaybıdır. Su noksanlığına maruz kalan bitkilerde stomalar kapanır ve buna bağlı olarak karbondioksit alımında azalma görülür. Kuruma ise metabolizma ve hücre yapısının tamamen bozulmasına ve aşırı su kaybı ile enzimle katalizlenen reaksiyonların durmasının nedeni olarak tanımlanabilir (Smirnoff 1993; Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005). Solmuş bitkilerde, bitki sahip olduğu turgoru kaybeder ve hücrelerin çökmesine neden olur. İhtiyaç duyulan su geri verildiğinde ise solgunluk azalarak bitki eski haline dönebilir. Kuruma olayının ileri derecede gerçekleşmesi durumunda ise bitkinin eski haline dönmesi artık mümkün olmaz (Kaçar 2015; Örs ve Ekinci 2015).

Bitki, ihtiyacı olan suyu kökünden alamadığı zaman strese girmeye başlar. Bu durumda bitkiler su kayıplarını azaltıp su alımını da artırarak stresten kurtulmaya çalışır (Bray 1997) ve bitkide oluşacak olan ilk tepki bitkinin sahip olduğu turgoru kaybetmesidir (Barlow et al. 1980). Bitkiler, yapraklarından terleme yoluyla kaybettikleri suyu kökleri ile karşılayamadığı zaman yaprak hücreleri plazmoliz durumuna geçerek pörsümektedir (Günay 2005).

Su eksikliğinin etkilerinden birisi fotosentez oranındaki düşüştür. Bunun sonucunda da vejetatif organlardaki gelişmeler azalır. Gövde ve yaprak büyümesi su eksikliğinde kök büyümesinden daha çok etkilenir (Sağlam 2004). Kuraklığın meydana geldiği ilk dönemlerde, bitki daha çok suya ulaşabilmek için gövde gelişimini yavaşlatıp kök

uzamasını gerçekleştirir. Kuraklığın uzun sürmesi durumunda hem gövdenin hem de kökün gelişimi durur, yaprak alanında küçülmeler, yaprak sayısında azalmalar olup bazılarında da sarararak dökülmeler meydana gelir (Öztürk 2015). Kuraklık stresine maruz kalmış bitkiler gelişimini tamamlamış olsalar da strese maruz kalmadan gelişimini tamamlamış bitkilere oranla daha düşük bir hacme sahip olurlar (Liu and Stützel 2004). Bitki büyümesindeki azalma, sürgün ve köklerdeki hücre bölünmesinin ve hücrelerin genişlemesinin durmasına bağlıdır. Hücre bölünmesinin veya genişlemesinin durması ise su noksanlığı nedeniyle fotosentez oranının düşmesi ile doğrudan ilişkilidir (Anjum et al. 2011). Kuraklık stresi altında bitki yapraklardaki su oranının düşmesi ile stomalar kapanır, bunun sonucunda yaprak sıcaklığının artmasına bağlı olarak membran sistemi zarar görür ve hücre ölümleri gerçekleşir (Dolferus 2014). Plazma membranının yapısı hücredeki sulu ortama bağlı olup, hücrenin su kaybetmesiyle beraber, membran yapısında değişiklik olur. Su kaybına bağlı olarak hücrede hacimce azalma meydana gelir ve buna bağlı olarak plazma membranında gerçekleşen çökme yırtılmalarına sebep olur. Bu zarar, normal hücresel metabolizmayı kalıcı olarak hasarlı hale getirir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005; Örs ve Ekinci 2015).

1.1.3. Oksidatif Stres

Canlılar yaşamını devam edebilmek için moleküler oksijene gereksinim duyarlar. Ancak enerji üretim süreçleri için mutlak ihtiyaç duyulan molekül, yararlı işlevlerinin yanında, hücre için zararlı bazı dönüşümlerin de uyarıcısıdır. Oksijen bazen önemli biyomoleküllerin yapısını bozarak reaktif oksijen türü (ROT) olarak adlandırılan atom ve moleküllerin oluşmasına sebep olur (Packer 1984). ROT'ların oluşumuna sadece oksijen molekülü sebep olmaz. Başka etmenler (radyasyon, ultrason, yüksek sıcaklık, osmotik ve iyonik stres, yaralanma, enfeksiyon, mutasyon) ve hücre içine giren başka maddeler de ROT'ların oluşmasına sebep olabilirler (Mathews et al. 2000). ROT'lar başta proteinler, lipitler ve DNA olmak üzere tüm biyomoleküllerin zarar görmesine sebep olup hücresel işlevlerin aksamasına yol açar. Böylelikle iş göremez hale gelen enzimler, lipitlerin oksidasyonu sonucunda membranların bozulmasına, DNA'da kırıklar oluşmasına ve diğer birçok metabolitin oksitlenerek işlevini yitirmesi sonucu canlının metabolizmasında çok önemli bozukluklara ve sonu ölümle biten yıkım olaylarına sebep olur (Lee et al. 1999). Canlılar, zararlı etkileri olan oksidanlara karşı çeşitli antioksidan savunma sistemleri geliştirirler. Antioksidan etkiye sahip enzimlerinin yanında sentezledikleri

maddelerle kendilerini korumaya alırlar. Bazen de dışardan aldıkları maddelerle aynı işlevi görürler. İnsanda yaşlanmaya bağlı olarak oksidatif stres süreci başlar. Ayrıca yetersiz antioksidan savunma sistemi ve oksidan stres koşulları kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve dolaşım sistemi bozuklukları gibi ciddi patolojik olaylarla ilişkilidir (Gate et al. 1999). Cu, Mn, Zn, Se gibi elementler ile riboflavin gibi vitaminlerin yokluğu, antioksidan enzimlerin aktivitelerini kaybetmesine ve oksidatif strese sebep olur (Sipowicz et al. 1997). Oksidatif hasar insanda birçok hastalığın gelişmesine sebep olur (Mathews et al. 2000). Oksijen metabolizmasındaki bazı kusurlu genler Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) ve Alzheimer gibi hastalıkları da tetiklediği bilinmektedir. (Mathews et al. 2000; Pekmez 2004).

Canlıların yaşam kalitesini bozan oksidatif stres, biyoteknolojik üretim süreçlerinde de soruna sebep olur. Özellikle sistemdeki oksijen dengesini bozar ve mikroorganizma üremesini inhibe eden dozları, büyük maddi kayıplara sebep olur (Penninckx 2000; Pekmez 2004).

1.2. Reaktif Oksijen Türleri

Bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron çiftine sahip ve bağımsız olarak varlığını sürdürebilen kimyasallara serbest radikal denir. Oksijen atomu içeren çeşitli serbest radikaller ile oksijen metabolizması sırasında oluşan ve radikal olmayan hücresel ara ürünlere genel olarak reaktif oksijen türleri (ROT) adı verilir (Erol Dayı 2010).

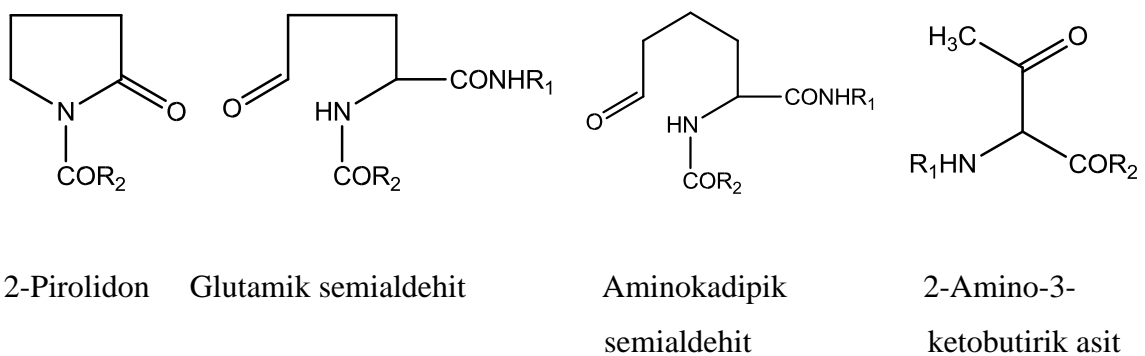
Süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri, aerobik metabolizmanın normal birer yan ürünü olarak veya radyasyon, ksenobiyotikler ve ağır metaller gibi dış faktörlerin etkisiyle oluşurlar. ROT, biyolojik sistemlerde hücre içi sinyalleşmede önemli bir rol oynar. Mitozu aktive edici protein kinazları da içeren hücre sinyalleşme kaskadlarını aktive eder. Apoptoz ve nekrozu uyarır, birçok genin anlatımını baskılar veya hücre morfolojisinde ve canlılığında değişimlere sebep olur (Wei and Lee 1997). Sağlıklı bir hücrede, fazla ROT koruyucu antioksidan mekanizmalar (katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimler) tarafından etkisiz hale getirilir (Halliwell and Gutteridge 2003; Erol Dayı 2010).

1.2.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri

Reaktif Oksijen Türleri hem vücudun içinde meydana gelen olaylar hem de dış kaynaklı etkenler tarafından meydana gelir. Vücut içindeki oksijenli solunum, metabolizma ve enfeksiyon; dış kaynaklı sigara, alkol, x-ışınları, güneş ışını ve kirlilik gibi etkenler serbest radikallerin oluşumuna neden olur. Oluşan bu serbest radikaller, hücresel bütün yapıları; DNA, protein, lipid, karbonhidrat ve enzim sistemleri gibi tüm önemli bileşikler kolayca etkileyerek yıkıma sebep olur. Önemli birer reaktif olan hidroksil radikali ve süperoksit radikali sitoplazma, nükleus, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi hücre birimlerinde hasara sebep olabilirler (Gürbüz 2008; Belyurt 2014).

1.2.1.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinler, büyük molekül ağırlığına sahip polipeptidlerdir. Hücre fonsiyonlarında ve hücre yapısında çok önemli görevler üstlenmektedirler. Ancak oksidatif reaksiyonlar sonucunda önemli modifikasyonlara uğrayabilmektedirler. Proteinlerin yapıtaşını oluşturan amino asitler; serbest radikallerin en önemli hedeflerindedir. Bu amino asitlerin hasarlanması, proteinde kalıcı etkilere sebep olur. Sistein, sistin, histidin, metiyonin, tirozin ve triptofan aminoasitleri proteinler içerisinde serbest radikallere karşı en hassas moleküllerdir. Bu moleküller serbest radikaller ile tepkimeleri sonucunda Şekil 1.1'de belirtilen yan ürünlere dönüşebilmektedirler (Belyurt 2014)



Şekil 1.1. Reaktif oksijen türlerinin proteinlerin üzerine oluşturdukları karbonilasyon ürünleri (Belyurt 2014)

Proteinlerin reaktif oksijen türleri ile tepkimeleri sonucu oluşan hasara karşı, amino asit bileşimine, protein aktivasyonundan veya yapısal düzenlenmesinden sorumlu amino

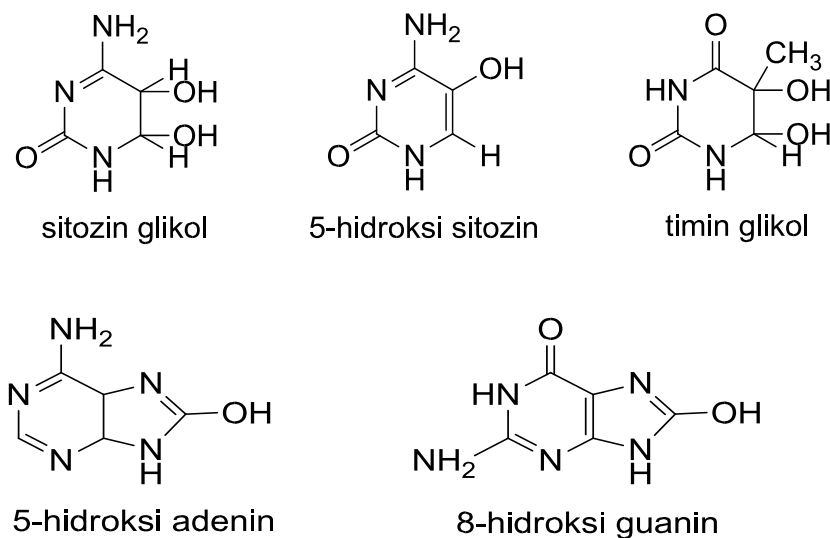
asitlerin dizilimine ve hasarlı proteinleri onararak kendini korumaya çalışmaktadır (Karabiga 2006; Belyurt 2014).

1.2.1.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Reaktif oksijen türlerinin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayan glikoz, mannoz ve deoksi şekerler, süperoksit ve hidrojen peroksitin oluşumuna neden olmaktadır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu, protein çapraz bağlanmalarına yol açarak bazal membranda kalınlaşmaya sebep olup katarakt ve benzeri hastalıklara neden olabilmektedir (Tekkes 2006; Belyurt 2014).

1.2.1.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

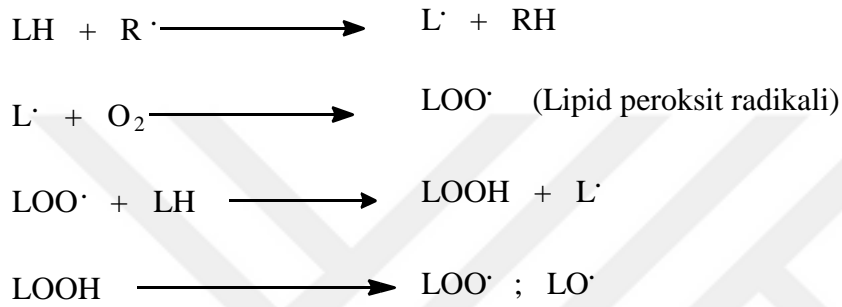
Nükleik asitler ROT ile reaksiyona girerek iyonize edici radyasyona bağlı hücre ölümüne neden olmaktadır. ROT nükleik asit baz değişimlerine veya DNA çift sarmalının hasar görmesine ve dolayısı ile kromozomal mutasyonlara ve sitotoksositeye sebep olabilmektedir. Ayrıca sitotoksik aktivite gösteren nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit, hücre zarından kolayca geçerek çekirdekte nükleik asit hasarlarına neden olabilmektedir. En tehlikeli serbest radikal çeşitlerinden biri olan hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek bu moleküllerin yapılarını değiştirebilmektedir. Ayrıca baz değişikliklerine ve mutasyonlara neden olabilmektedir (Şekil 1.2) (Belyurt 2014).



Şekil 1.2. Hidroksil radikalının pürin ve pirimidin bazları üzerine etkisiyle oluşan ürünler (Belyurt 2014)

1.2.1.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Lipidler Üzerine Etkileri

Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları reaktif oksijen türlerinden etkilenirler. Ancak bunların içerisinde en hassas olanları lipidlerdir (Tekkes 2006). Lipidler hücrede en çok hücre zarlarında bulunmaktadır. Bu nedenle hücre zarları reaktif oksijen türleri kaynaklı oksidasyonlara çok duyarlıdır (Tekkes 2006). Reaktif oksijen türleri lipidler üzerinde lipid peroksidasyonu tepkimelerini (Şekil 1.3) başlatarak peroksi lipidleri oluşturmaktadır (Belyurt 2014).



Şekil 1.3. Lipid peroksidasyonu tepkimeleri (Belyurt 2014)

1.3. Antioksidanlar

Genel olarak antioksidan, bitkiyi oksidasyona karşı koruyan ve oksijen ya da peroksitlerle ilerleyen reaksiyonlara engel olan ürünlerdir. Bu antioksidanlar çeşitli ürünlerde koruyucu olarak kullanılmaktadır. Biyolojik tanım olarak antioksidan madde, oksijen ile bozulan ürünlere eklenerek bu bozulmayı engelleyen veya geciktiren doğal maddedir. Antioksidanlar gıda endüstrisinde de geniş bir alanda kullanılmaktadır. Oksijen ve nitrojen gibi reaktif türler insanlarda normal fizyolojik fonksiyonlar üzerinde ters etkileri vardır. Bu etkileri önemli bir şekilde azaltan diyetel antioksidanlardan, yağların bozulmasını engelleyen antioksidanlara kadar geniş bir alanda kullanılmaktadır (Huang at al. 2005; Bakır 2010).

Canlılarda serbest radikalleri, antioksidanlar nötralize eder ve hücrelerin bu serbest radikallerden etkilenmesini önler. Bu arada antioksidanlar kendini de yeniler. Antioksidanlar, serbest radikallerle tepkimeye girerek hücre zararını ve tümör gelişimini önler, sağlıklı ve kaliteli bir yaşam sağlarlar (Başer 2000). Kimyasal yapıları,

çözünürlükleri, aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan elde edilebilmeleri, antioksidanları insan sağlığında önemli hale getirir (Erdoğan 2012).

Sağlıklı bireylerde aktif radikallerin nötralize olması için doğal antioksidan savunma sistemi yeterlidir. Ama yaş ilerledikçe antioksidanların konsantrasyonu düşer ve oksidasyon ürünlerinin miktarında artma görülür. Bu oksidasyon ürünleri yaşlanma, kanser, inflamasyon ve ateroskleroz gibi çeşitli hastalıklarda sebep olur (Akowuah et al. 2004).

Antioksidanlar hidrojen atomu verme kabiliyetine sahiptir. Kimyasal bileşenler olan antioksidanlar, serbest radikalleri, radikal olmayan kimyasal türlere çevirir. Antioksidanların, aynı zamanda radikalleri düşük reaktiviteli hale getirir ve lipitler ile reaksiyona girmesini engeller (Madhavi 1996; Erdoğan 2012).

Antioksidanlar, oksidanları dört yolla etkisiz hale getirir.

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları zayıf birer moleküle dönüştürüp etkisiz hale getirir. Antioksidan enzimler ve moleküller bu şekilde etki eder.
2. Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanlara bir hidrojen vererek inaktive etmesidir. Vitaminler ve flavonoidler bu yolla etkisini gösterir.
3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır metaller oksidanları kendilerine bağlayarak inaktive eder.
4. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onararak etkisini gösterir (Gökpınar vd. 2006; Erdoğan 2012).

1.3.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar, Şekil 1.4'deki gibi doğal antioksidanlar ve sentetik antioksidanlar olmak üzere iki grup halinde incelenmiştir.

Antioksidanlar	Doğal Antioksidanlar	Tokoferoller (E Vitamini)
		Askorbik Asit (C vitamini)
		Fenolik Maddeler
		Karotenoidler
		Antioksidan Enzimler
	Sentetik Antioksidanlar	Gallatlar
		Bütillenmiş Hidroksi Anisol (BHA)
		Bütillenmiş Hidroksi Toluen (BHT)
		Tersiyer Bütil Hidrokinon (TBHQ)

Şekil 1.4. Antioksidanların sınıflandırılması

1.3.1.1. Doğal Antioksidanlar

Son yıllarda, bitkisel kaynaklı olan birçok madde antioksidan olarak kullanılabilirlik yönünden analiz edilmektedir. Yapılan çalışmalarda böyle doğal maddelerin antioksidan etkisinin sentetik maddelere göre daha fazla olduğu görülmektedir. Bitkisel ürünler; yağlı tohumlar, tahıllar, sebzeler, meyveler, baharatlar ve çay, hayvansal ürünler; peptitler, amino asitler ve karotenoidler, enzimler; glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz ile bazı mikroorganizmalar en önemli doğal antioksidan kaynakları olarak tespit edilmiştir. Bunların antioksidan aktiviteleri yapısındaki C ve E vitamini, fenolik bileşikler ve karotenoidler gibi bileşiklerden dolayıdır. (Turhan ve Üstün 2006; Erdoğan 2012).

Son yıllarda insanlar doğal kaynaklı antioksidan kullanmaya yönelmiştir. Bunun sebebi; gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan sentetik antioksidanların çeşitli zararlı yan etkilerinin ortaya çıkmasından kaynaklanmaktadır. (Kıralan vd. 2004). Örneğin BHT (Bütillenmiş hidroksitoluen) non-toksik olmasına rağmen, yüksek dozda farelere verilmiş ve farelerin karaciğerinde hasara sebep olduğu görülmüştür. Yine yapılan bazı çalışmalarda BHT gibi sentetik antioksidanların fazla miktarda alındığında vücuttan atılmadığı ve bazı dokularda depolandığı görülmüştür. (Halliwell and Gutteridge 1990; Erdoğan 2012).

1.3.1.1.1. Tokoferoller (E Vitamini)

Hücre zarını, serbest radikallerden kaynaklanan lipid peroksidasyonundan korumada önemli rol oynar. E vitamini, yağda çözünebilen bir antioksidandır. Tokoferol, E vitaminin biyolojik aktif formuna denir. Antioksidan aktivite için gerekli olan hidroksil gruplarını tokoferol formları olan α -, β -, γ - ve δ - formları içerir. α -tokoferol en yüksek antioksidan özelliğe sahiptir. α -tokoferol gibi antioksidanlar, serbest radikalleri ve lipid peroksil radikallerini temizleyerek onların vücutta yaptıkları hasarı önlemiş olurlar (Tüzün ve Garip 2005). E vitamini, tüm gıdalarda az miktarda da olsa bulunmaktadır. Tokoferoller, hidroksil grubunun hidrojenini lipid peroksil radikaline aktararak antioksidatif aktivite özelliği gösterir. Tokoferoller, ısıya karşı oldukça dayanıklı antioksidanlardır. E vitaminin antioksidan özelliğinin yanı sıra hücre çoğalmasında da etkili olduğu bilinmektedir. E vitamininin kalp hastalığı riskini azalttığı da yapılan birçok araştırma ile belirlenmiştir (Chen et al. 1988; Erdoğan 2012).

1.3.1.1.2. Askorbik Asit (C vitamini)

C vitamini, süperoksit radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi serbest radikallerle kolayca tepkimeye girerek onların etkisizleşmesinde rol oynar. İnsan plazmasında ve hücre zarında bulunan askorbik asit, zarı geçebilen bir antioksidan çeşididir. Suda çözünebilen bir antioksidan olup moleküler ağırlığı düşüktür. Lipid peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri temizleyerek lipidleri ve zırları oksidan etkisine karşı koruma görevi görür. E vitamininin rejenerasyonunda görev alarak tokoferoksil radikalinin α -tokoferole indirgenmesine neden olur. Böylece E vitamini ile birlikte etkin bir şekilde düşük yoğunluklu lipoproteini oksidasyona karşı korumuş olur. Kollojen sentezi, demir absorpsiyonu ve hücrelerin redoks durumunun korunmasında gerekli olan bir antioksidandır. C vitamininin antioksidan olarak esas görevi, lipid hidroperoksitlerin oluşumuna engel olmasıdır. C vitamini insanlarda sentezlenmez ancak dışardan alınması gerekir (Frei et al. 1990; Erdoğan 2012).

1.3.1.1.3. Fenolik Maddeler

Bitkilerde normal metabolizma sırasında ve herhangi bir stres durumunda (yaralanma, enfeksiyon, uv radyasyon) ikincil metabolit adı verilen ürünleri üretirler. Bu ikincil metabolit ürünlere fenolik bileşikler adı verilir. Aromatik bir yapıya sahiptirler. Fenolik

bileşikler; basit fenoller, fenolik asitler (benzoik asit, sinnamik asit türevleri), kumarinler, flavonoidler, stilbenler, hidrolizlenebilen kondanse taninler ve ligninler olarak farklılık gösterirler. Bu bileşiklerin bir kısmı antimikrobiyal aktivite için, bir kısmı antioksidan aktivite ve bir kısmı da koku, tat ve renklilik oluşturmak gibi görevleri üstlenmişlerdir (Bravo, 1998). Fenolik bileşikler, antioksidan etki gösterirken serbest radikalleri bağlarlar, metallerle şelat oluştururlar ve bazı enzimleri inaktive ederler (Yang and Tsao 2003; Erdoğan 2012).

Doğal antioksidanların en önemli gruplarını fenolik bileşikler oluşturur. Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görünür. En yaygın olanları flavonoidler ve fenolik asitlerdir. Bu flavonoidler ve fenolik asitler besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korurlar. Bu nedenle besinlerin koku ve tat gibi özelliklerini arttırmak için kullanılan baharat ve aromatik bitkiler giderek daha önemli hale gelmektedir. Bitki fenoliklerinin hastalıklara karşı direnç sağladığı da bilinmektedir. Fenolik asitlerin ve flavonoidlerin bir grubunun antibiyotik, antifungal ve antiinflamatuvar olarak görev yaptığı da tespit edilmiştir (Diken 2009).

Flavonoidler, bitkilerin dokularında, hücre içinde ve çeşitli bitkisel organların yüzeyinde tespit edilmiştir. Flavonoidlerin antioksidatif etkiye sahip olmaları en önemli biyolojik özellikleridir. Oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun, kalp damar hastalıkları, kanser ve kronik iltihaplanma gibi hastalıkların en önemli etkenleridir. Flavonoidlerin birçoğunun bu lipid peroksidasyonunu başlatan radikallerin ve lipid peroksi radikallerinin oluşumunu engellediği tespit edilmiştir. Yapısındaki bazı grupların serbest radikallerini stabilize ettiği ve antioksidan kapasitesini artırabildiği, flavonoidlerin bunların dışında metal iyonlarını bağlayarak lipidlerin oksidasyonunu önleyebildiği ve radikallerin oluşumunda görev yapan enzim sistemlerini inhibe edebildiği yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır (Karakaya ve El 1997). Flavonoidlerin, doğrudan bağırsak mukozası üzerinde bir etkisi olabileceği, kalp-damar ve kanser gibi hastalıklara karşı koruma sağladığı da düşünülmektedir (Hollman and Katan 1999; Erdoğan 2012).

Fenolik asitler; suda çözünebilen ve bitkisel besinlerde yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Benzoik ve sinnamik asitlerden türeyen hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asit türevleri olarak iki grupta incelenmektedir. Fenolik asitler bitki hücrelerinde serbest halde bulunmamaktadır. Bunlar, kompleks şeklinde ya vakuollerde

çözünmüş ya da hücre duvarı bileşenlerine bağlanmış durumda bulunmaktadır (İbadova 2006).

Son yıllarda, diğer fenolik bileşikler gibi fenolik asitler de tıbbi faydalarından dolayı ilgi çekmeye başlamıştır. Polifenoller, fenolik asitlerin güçlü antoksidanları oldukları ve antikanserojen, antiviral, antiinflamatuvar ve antibakteriyal aktivite gibi tıbbi etkiler gösterdikleri tespit edilmiştir (Mattila and Hellström 2007).

1.3.1.1.4. Karotenoidler

Doğadaki pigmentlerin çok sayıda ve geniş bir grubunu temsil ederler. Karotenoidler, canlılarda çeşitli parlak renklere sebep olmaktadır. Pigmentasyon işlevlerinin yanında, kimyasal özelliklerinden dolayı vücut içerisinde çeşitli reaksiyonlarda görev alırlar. Kimyasal karakterde değişen tek ve çift bağlar, diğer moleküllerden enerjinin absorbe edilmesini sağlamaktadır. Bu durum karotenoidlerin antioksidan özelliklerini ortaya çıkarır (Britton 1995).

Karotenoidler yapılarına göre iki sınıfa ayrılır. Bunlar hidrokarbon karotenoidler ve ksantofillerdir. Hidrokarbon karotenoidlerin başlıcaları α -karoten, β -karoten ve likopendir. Ksantofiller ise yapısında metoksi, hidroksi, keto, karboksi ve epoksi formunda oksijen bulundurmaktadır. Karotenoidler içerisinde önemli antioksidan likopendir. Bunu sırasıyla β -kriptoksantin ve β -karotenin izlemektedir. Ksantofiller ise minimum aktiviteye sahiptirler (Miller et al. 1996; Erdoğan 2012).

Karotenoidler, düşük yoğunluklu lipoproteinler üzerinde taşındığından, düşük yoğunluklu lipoproteinleri oksidasyondan koruyarak kalp-damar hastalıklarına karşı önlem almaktadır. Karotenoidlerin kanseri önleyici etkisinin, antioksidan özelliklerinin yanında hücreler arası boşluk bağlantı iletimlerini uyarıcı etkiye sahip olması ve bağışıklık sistemini güçlendirici etkileri tespit edilmiştir. Buna ilaveten, karotenoidlerin glutatyon, s-transferaz ve glutatyon peroksidaz gibi karsinojenleri detoksifiye eden enzimlerin aktivitelerini de artırdığı belirtilmiştir (Koca 2006).

1.3.1.1.5. Antioksidan Enzimler

Organizmalarda bulunan süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz gibi enzimler, hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri gibi aktif oksijen türlerini uzaklaştırarak veya lipid hidroperoksitlerini azaltarak antioksidatif aktivite gösterebilmektedirler. (Halliwell 2001; Erdoğan 2012).

1.3.1.2. Sentetik Antioksidanlar

1.3.1.2.1. Gallatlar

Propil gallat, oktil gallat, dodesil gallat ve lauril gallatlar gallik asitin en fazla kullanılan esterleridir. Bunlar suda çözünmezler. Ancak yağda sadece oktil ve dodesil gallatlar çözünür. Propil gallat, beyaz kristal toz şeklinde satılır. Erime noktası 148°C'dir. Bu derecenin üzerinde sıcaklıklarda etkisini yitirir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesini'nin izniyle gıdalarda 1947'den beri kullanılan sentetik bir antioksidandır. Literatürde, gallatların kullanılmasında toplum sağlığı ve gıda hijyeni açısından olumsuz herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır (Çakmakçı ve Çelik 2000).

1.3.1.2.2. Bütilenmiş Hidroksi Anisol (BHA)

BHA ($C_{11}H_{16}O_2$); ticari olarak 3-*ter*-butil-4 hidroksianisol (%85) ile 2-*ter*-butil-4-hidroksianisol (%15) izomerlerinin karışımı halinde satılmaktadır. Beyaz, mumsu katı bir yapıya sahiptir. Erime noktası 48-63°C'dir. Hem bitkisel yağlarda hem de hayvansal yağlarda çözünebilir suda ise çözünmeyen bir antioksidan çeşididir. Esansiyel yağların tat ve rengini korumada kullanılmaktadır. Aynı zamanda her çeşit gıdaya katılabilen antioksidan olarak da bilinir. BHA, özellikle tahıl ve şekerleme ürünlerinde kullanılan hindistancevizi ve palmiye özü yağları gibi yağların yağ asitlerinin oksidasyonunu kontrol edebilen bir antioksidandır (İbadova 2006; Erdoğan 2012).

1.3.1.2.3. Bütilenmiş Hidroksi Toluen (BHT)

BHT ($C_{15}H_{24}O$); 2,6-*ditert*-butil-4-metil fenol beyaz renkli kristal bir yapıya sahiptir. Kaynama noktası 265°C erime noktası ise 70°C'dir. Yağlarda çözünür suda çözünmeyen bir antioksidan çeşididir. Oksidasyonu önleyici etkisi, bitkisel yağlara oranla hayvansal yağlarda daha fazladır. Bu antioksidan bitkisel yağlarda daha düşük aktiviteye sahip

olmasına rağmen diğer antioksidanlar ile beraber kullanıldığında, ilave edildiği gıdayı koruma özelliğini gösterir. (Kar 2008).

BHT, gallatlar ile sinerjist etki göstermezken BHA ile gösterir. (Başoğlu 2006). Özellikle bu antioksidan kombinasyonu, fındık ve fındık ürünlerinin oksidatif reaksiyonlarını önlemede kullanılmaktadır. Bu antioksidanlar uçucu yapıya sahip olduklarından dolayı kullanıldıkları besin içine nüfuz edebilmektedirler. Bu nedenle, bu maddeler paketleme sırasında da kullanılabilir (İbadova 2006; Erdoğan 2012).

1.3.1.2.4. Tersiyer Bütil Hidrokinon (TBHQ)

TBHQ, kızartma yağlarının oksidasyonuna karşı kullanılan en iyi antioksidandır. Kızartma işleminden geçmiş olan ürünleri de korumaktadır. TBHQ bej renkli ve toz şeklindedir. Katı ve sıvı yağlarda çözünür. Bitkisel yağlar için en etkili sentetik antioksidandır. Yüksek sıcaklığa dayanıklıdır (Keskin ve Erkmen 1987). Tek başına da kullanılabilir, BHA ve BHT ile birlikte de kullanılabilir. Sitrik asit ile birlikte stabilize edici özellik kazanır. Ancak, sağlığa zararlı etkilerinden dolayı Avrupa Birliği ülkelerinde kullanımı yasaklanmıştır (Çakmakçı ve Çelik 2000).

1.4. Anason (*Pimpinella anisum L.*)

Anason (*Pimpinella anisum L.*), *Apiaceae* familyasından otsu bir bitki olup, beyaz çiçekli ve tek yıllıktır. Bitkinin boyu yaklaşık 30-50 cm civarındadır. Çiçekleri şemsiye biçimindedir. Meyvelerinin uzunluğu 3-6 mm genişliği ise 1-3 mm olup, ters armut biçiminde, gri-yeşil ya da yeşilimsi-sarı renkli ve üzeri tüyle örtülüdür. *Pimpinella* cinsi 23 tür mevcut olup, bunlardan 8 tanesi Türkiye'ye endemiktir (Arslan vd. 2004).

Anasonun kökeni Orta Doğu olup Antik Mısır dönemine dayanmaktadır. Türkiye dışında da anason üretimi yapan ülkeler mevcuttur. Bunlar Hindistan, Meksika, Mısır, İtalya, İspanya, Suriye, Fransa, Bulgaristan ve Tunus gibi ülkelerdir (Bulur 2010; Arslan vd. 2004). Anason meyveleri Türkiye için ekonomik değeri olup, ihraç edilen ürünler arasında yer almaktadır (Doğan vd. 2015).

Ülkemizin, Ege ve Akdeniz bölgelerinde anason ekim alanları yoğunlaşmaktadır. Ekimin çoğunlukla yapıldığı şehirler sırasıyla Burdur, Denizli ve Antalya'dır. Anason meyveleri

aynı zamanda anason tohumu olarak da adlandırılmaktadır (Arslan vd. 2004). Anason tarımı genelde tohum elde etmek için yapılmaktadır. Ülkemizde anason ekimi şubat ve mart aylarında, hasadı ise ağustos ve eylül aylarında yapılır. Anason meyveleri başta eczacılık, kozmetik ve gıda sanayisi olmak üzere değişik alanlarda kullanılmaktadır. Anasonun insanlar üzerinde iştah açıcı, hazmı kolaylaştırıcı, şişkinlik giderici ve ağrı dindirici özellikleri olduğu da tespit edilmiştir. Anason ülkemizde ağırlıklı olarak rakı üretiminde kullanılıp, baharat olarak ta tüketilmektedir. Akdeniz ülkelerinde de alkollü içeceklerde aroma verici olarak kullanılmaktadır (Gülçin vd. 2003). Anason ülkemiz için önemli bir tarım ürünüdür. Yılda yaklaşık olarak 10 bin ton civarında ürün elde edilmektedir. Bu ürünün yaklaşık 7 bin tonu rakı üretiminde kullanılırken 3 bin ton kadarı ihraç edilmektedir (Tabanca vd. 2006).

Anason uçucu yağ bakımında zengin olan aromatik bir bitkidir. Uçucu yağ, bitkilerin yaprak, meyve, kabuk veya kök gibi kısımlarından elde edilir. Su buharıyla sürüklenip, oda sıcaklığında genellikle sıvı halde bulunur. Genellikle renksiz veya açık sarı renklidir. Uçucu özelliğe, kolaylıkla kristalleşebilen, bulunduğu bitkiye özgü kuvvetli kokusu olan, çok sayıda bileşenden oluşan sekonder metabolitlerdir. Bu sekonder metabolitler, bitkilerin salgı sistemleri olan salgı tüyleri, salgı hücreleri, salgı kanalları ve salgı ceplerinde oluşur. Uçucu yağ, kekik, lavanta, fesleğen, nane gibi *Lamiaceae* üyelerinin yapraklarındaki salgı tüylerinde, anason, kimyon, rezene ve kişniş gibi *Umbelliferae* üyelerinin meyvelerindeki salgı kanallarında, portakal, limon, greylift gibi *Citrus* türlerinin kabuklarında bulunan salgı ceplerinde, karaçam, sarıçam gibi *Pinus* türlerinin ise gövde kabuklarındaki reçine kanallarında salgılanır. Bitkilerin bu salgıyı hangi amaçla yaptığı tam olarak bilinmemekle birlikte, buldukları bitkileri hastalıklara, zararlılara ve otobur hayvanlara karşı koruduğu bilinmektedir. Güzel ve hoş kokulu uçucu yağlar, başta bal arıları olmak üzere pek çok böceği buldukları bitkiye çeker. Böylelikle tozlaşmaya da yardımcı olmuş olur. Uçucu yağların çoğu da bakterilere, mantarlara ve virüslere karşı etkili olduğu bilinmektedir. Örnek olarak kekikten elde edilen uçucu yağın antibakteriyel etkisi, okaliptüsten elde edilen uçucu yağın antiviral etkisi, biberiye ve adaçayından elde edilen uçucu yağın ise antioksidan etkisi olduğu tespit edilmiştir. İklimin sıcak olduğu bölgelerde yetişen bitkilerin ürettiği uçucu yağların buharlaşma özellikleri sayesinde bitkiyi sıcaktan koruduğu bilinmektedir. Sıcak iklim bölgelerinde yetişen bitkiler uçucu

yağ bakımından serin iklim bölgelerinde yetişen bitkilere göre daha zengindir (Baydar 2007; Akıcı 2016).

Su distilasyonu, buhar distilasyonu, çözgen ekstraksiyonu, süperkritik akışkan ekstraksiyonu, katı faz mikro ekstraksiyon gibi yöntemler aromatik bitkilerden uçucu yağ elde etmek için kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemler arasında en fazla kullanılanı distilasyon yöntemidir. Uçucu yağ miktarı ve bileşenlerine bağlı olarak distilasyon yöntemi seçilir. (Kılıç 2008).

Günümüzde tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen uçucu yağların ve bu yağların ana etken maddelerinin elde edilip değerlendirilmesi hem bilimsel hem de ekonomik açıdan oldukça önemli hale gelmiştir. Bu bitkilerden elde edilen uçucu yağların önemli hale gelmesi uzun yıllardan beri ilaç, gıda, parfüm ve kozmetik sanayi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmasından kaynaklanmaktadır (Albayrak vd. 2011).

Anason %1,5-6 arasında uçucu yağ içeriğine sahiptir. Başlıca iki izomer bileşikten; normal sıcaklıkta katı halde olan *trans*-anetol (%80-95) ve sıvı halde olan estragol (metil kavikol) (%1-2)'den oluşmaktadır. Bunun yanında bitki uçucu yağında *cis*-anetol, limonen, anisaldehit ve daha bazı bileşikler de tespit edilmiştir (Arslan vd. 1999). *Trans*-anetol bir fenilpropen bileşiğinden oluşur. Erime noktası 21°C, kaynama noktası 235°C'dir. Oda sıcaklığında katı halde bulunur. Kar beyazı şeklinde pulcuklar oluşturur. Soğutma ile uçucu yağdan izole edilebilir. Işık ve hava ile temas halinde oksitlenerek anisaldehit bileşiğini meydana getirir. Anasonun kendine özgü kokusunu veren ana bileşen anetol'dur. Anasonun tatlımsı tadı bu maddeden kaynaklanmaktadır. Bu özelliğinden dolayı *trans*-anetol diş macunu üretiminde kullanılıp macuna tatlılık kazandırır. Estragol bileşiğinin ise kaynama noktası 215°C'dir. Oda sıcaklığında sıvı haldedir. Estragol kokusu anason kokusunu andırır fakat tadı değişiktir (Fidan ve Şahin 1993). *Trans*-anetol ve estragol rakı kalitesinde etkilidirler (Cabaroğlu ve Yılmaztekin 2011). Anason tohumu rakının aromatize edilmesinde kullanılmaktadır (Fidan ve Şahin 1993; Akıcı 2016).

Anason içerdiği bileşenler nedeniyle başka amaçlar için de kullanılmaktadır. %70-90 anetol içeren ekstreleri uyarıcı ve aromatik özelliğindedir. Bunun yanında anetol ve türevleri ilaç sanayisi için başvurulan maddelerdir (Doğan vd. 2015). İçerdiği uçucu yağ

miktarı ve bileşimine bağı olarak anasonun kalitesini belirler (Güneyli ve Karaçalı 2002).

Bu tez çalışmasındaki amaç; önemli bir gıda ve tıbbi bitki olan anasonda tuzluluk ve kuraklığın neden olduğu oksidatif hasarı belirlemek ve bu stresler esnasında antioksidan kapasitenin nasıl değiştiğini belirlemektir. Ayrıca uçucu bileşenlerin stres esnasında nasıl bir değişime uğradığıda belirlenmiştir. Elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirilmiş ve bütüncül olarak ele alınmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu çalışmada; tuz ve kuraklık stresine maruz bırakılan anason ile kontrol için normal şartlarda yetiştirilen anason bitkisinin antioksidan aktiviteleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ile süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) miktarı, lipid peroksidasyon seviyesi, hücrel antioksidan enzimlerin (katalaz, peroksidaz ve süperoksid dismutaz) aktivitesi ile uçucu yağ bileşenleri incelenmiştir. İçeriğinde antioksidan miktarı, uçucu yağ bileşenleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ile süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) miktarı, lipid peroksidasyon seviyesi, hücrel antioksidan enzimlerin (katalaz, peroksidaz ve süperoksid dismutaz) aktivitesinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmanın benzerlerini aşağıda açıklayacak olursak;

Gülçin ve arkadaşları, anason tohumlarını ekstrakte ederek antioksidan aktivitesini incelemişler. Bu çalışmada toplam antioksidan aktivitesi tayini için metal şelatlama aktivitesi tayini metodu kullanılmış ve absorbans değerlerini 500 nm'de ölçülmüştür. Toplam fenol tayini için Folin-Ciocalteu metodunu uygulanmış, örneklerin absorbans değerleri 760 nm'de okuduktan sonra gallik asit cinsinden ifade edilmiştir (Gülçin vd. 2003).

Tekeli ve arkadaşları, Konya yöresinde yetişen ve Peygamber çiçeği olarak ta bilinen *Centaurea Pterocaula*'nın fenolik yapısını ve antioksidan etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla Tuz Gölü civarından toplanan *Centaurea Pterocaula*'nın antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için çalışılmıştır. *Centaurea Pterocaula* sokset aparatı ile petrol eterinde ekstrakte edilmiştir. Sonra materyal %70 lik metanolde ekstraksiyona tabi tutulmuş olup çözücüsünden uzaklaştırılmıştır. Bitkinin fenolik yapısını HPLC ile belirlemişlerdir (Tekeli vd. 2008).

De Marino ve arkadaşları rezenedeki fenolik glikozitleri ve antioksidan aktivitesini tespit etmek için çalışmışlardır. Bu çalışmada rezeneden iki toluen trimeri ve bir benzoizoforanon olarak bilinen dokuz bileşik izole edilmiştir. Bunların yapılarını 1D, 2D,

NMR ve kimyasal metotlar içeren spektral metotlar ile açıklamışlar. DPPH, toplam antioksidan kapasitesi ve lipid peroksidasyon metotlarıyla antioksidan kapasitesi tespit edilmiştir (De Marino et al. 2007).

Naithani ve arkadaşları bitkisel çaylarda depolanma süresi boyunca antioksidan aktivitesindeki değişim ve fenolik içeriğini çalışmışlar. Yapılan bu çalışmada sekiz farklı bitkisel çayda toplam antioksidan kapasitesi ve fenol içeriği araştırılmıştır. Toplam fenol tayini için Folin-Ciocalteu metodu ile çalışılmış ve sonuçlar gallik asit cinsinden ifade edilmiştir. Bitkisel çaylar, yüksek fenolik bileşiğe kıyasla düşük antioksidan kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Naithani et al. 2006).

Özcan ve arkadaşları anason ve rezene başta olmak üzere bazı bitkisel çayların mineral içeriklerini araştırmışlardır. İnfüzyon ve dekoksasyon yöntemleri ile örnekleri analize hazırlamışlar. Hem infüzyon hem de dekoksasyon için 10, 15 ve 20 dakika zaman parametresini kullanmışlar. Sonuç olarak minerallerin çaydan geçişi için en uygun zamanın 10 dakikalık sürenin olduğunu öngörmüşlerdir (Özcan vd. 2007).

Shan ve arkadaşları, 46 tıbbi bitki ve baharat ekstraktlarının antibakteriyal etkisini 5 gıda kaynaklı patojen bakteri (*Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* ve *Salmonella anatum*) üzerindeki etkilerini çalışmışlar. Toplam fenolik içerikleri hesaplanan ekstraktlardan, antibakteriyal miktarı yüksek olanların büyük çoğunluğunda fenolik madde miktarı da yüksek bulunmuştur. Çalışmada kullanılan baharat ekstraktlarına karşı gram negatif bakterilerin gram pozitif bakterilerden daha dirençli olduğu, çalışılan bakterilerden en hassasının ise *S. Aureus* en dirençlisinin ise *E. coli*, olduğu tespit edilmiştir (Shan et al. 2007).

Tanker ve İzgü, İç Anadolu bölgesinde yetiştirilen *Pimpinella* L. türleri üzerine çalışmışlar. Çalışmalarında bu türleri farmasötik botanik yönünden incelemişler. Bu çalışmada bitkilerin morfolojik olarak incelemesi yapılmış. Bunun yanında bölgeden toplanan değişik *Pimpinella* L. türlerinin meyvelerinden uçucu yağ elde edilmiştir. Uçucu yağ oranı %1,1-2.8 arasında tespit edilmiştir. Türler arasında %8,7 oranı ile en fazla uçucu yağ taşıyan tür olarak *P. anisetum* belirlenmiştir. *P. anisum* uçucu yağının kırılma indisi normal şartlarda 1,552-1,560 arasındadır. İç Anadolu bölgesinde yetiştirilen türler üzerinde yapılan araştırmada ise kırılma indisi 1,487-1,536 arasında bulunmuştur.

Kırılma indisi, anetol oranı ile doğru orantılı bulunmuştur. Anetol oranı yüksek örneklerde kırılma indisi yüksek, anetol miktarı düşük örneklerde ise kırılma indisi düşük çıkmıştır (Tanker ve İzgü 1988).

Misharina, kişniş tohumunun depolama koşulları ve süresinin elde edilen uçucu yağın aroma bileşenleri üzerine yaptığı etkiyi incelemiştir. Kişniş tohumu örneklerinden bir kısmı güneş ışığı altında, bir kısmı ise karanlık bir ortamda 1 yıl süreyle depolanmıştır. Bu süre sonunda karanlık ortamda depolanan kişniş tohumunun aroma bileşiminde önemli değişimler görülmediğini, güneş ışığına maruz kalan örneklerde ise bileşiklerin bazı kimyasal değişimlere uğradığını belirtilmiştir. Güneş ışığına maruz kalan kişniş tohumlarının aroma bileşimindeki değişimin ışığa bağlı oksidasyon, izomerizasyon veya transformasyon sonucunda oluştuğu tespit edilmiştir (Misharina 2001).

Güneyli ve Karaçalı, depolanan anason tohumlarında meydana gelen değişiklikler üzerine araştırma yapmışlardır. Bu çalışmada kurutulmuş anason tohumları Tekel-İzmir deposundan temin edilmiştir. Jüt çuvallar halinde (50-70 kg) üst üste istiflenmiş örneklerden ilk olarak üst, alt ve kapı yanı çuvallarından alınmıştır. Bir sonraki çalışmada 3'er kilogramlık küçük jüt torbalar içinde cam dolaplarda (hava hareketsiz, hava dolaşımı, havalandırma), üçüncü olarak da %3 oksijenli ve havalı kavanozlarda oda sıcaklığında ve soğuk depo koşullarında tutularak inceleme yapılmıştır. Yapılan çalışmanın sonunda gözlemlenen gelişmeler sınırlıdır. Tekel deposu koşullarında saklanan anason tohumlarında daha fazla değişim gözlenmiştir. Buradaki üst ve kapı yanında bulunan çuvallardaki tohumlarda uçucu yağ miktarı ve *trans*-anetol oranı düşmüş buna karşılık su miktarı artmıştır. Tohumlarda zamanla matlaşma gözlenmiş ve özellikle nemli havanın tohumlarda bozulmalara neden olduğu belirlenmiştir (Güneyli ve Karaçalı 2002).

Al-İsmail ve Aburjai, papatya çiçeği, anason ve dereotu tohumlarındaki antioksidan aktivitesi üzerine bir araştırma yapmışlardır. Linoleik asit ile lipozom model sistemleri ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil) radikali tutma yöntemlerini kullanılarak antioksidan aktivitelerini tespit etmişler. Araştırma sonuçlarına göre, papatya çiçeği ve dereotu tohumlarından elde edilen su ekstraktlarında antioksidan miktarı anason tohumuna göre daha fazla bulunmuş, fakat her üç bitkinin de alkol ekstratları düşük antioksidan aktivite

göstermiştir. Bitkilerin ekstraktlarının antioksidan aktivite miktarı en fazla papatya çiçeği tohumunda, en az ise anason tohumunda tespit edilmiştir (Al-Ismail and Aburjai 2004).

Arslan ve arkadaşları, Türkiye'deki anasonun uçucu yağ miktarı ve bileşiminin değişimi üzerine bir çalışma yapmışlar. Farklı bölgelerden 29 çeşit anason tohumu örneği materyal olarak kullanmışlar. Anason hasattan 3 ay sonra analizler yapılmaya başlanmış. Araştırma sonuçlarına göre anasondaki uçucu yağ oranları %1,3-3,7 arasında değişim gösterdiği gözlenmiş. En fazla uçucu yağ miktarları genellikle Türkiye'nin Ege Bölgesi yöresinden toplanan örneklerden elde edilmiş. Trans-anetol uçucu yağların temel bileşeni olup, oranı %78,63-95,21 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. (Arslan vd. 2004).

Besharati-Seidani ve arkadaşları, İran'da yetiştirilen Anason tohumlarının uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi için çalışmışlar. Bunun için yeni ve hızlı bir metot olan tepe boşluğu katı faz mikro ekstraksiyon (HS-SPME) metodunu kullanmışlar. Bu metot ile toz haline getirilmiş anason tohumları 15 mL'lik bir vial içerisine alınmış, vialin ucuna özel bir soğutucu sistem takılmış ve tepe boşluğundan mikro şırınga ile 1µl kadar çözgen ilave edilerek ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş. Yapılan bu işlen sonucunda anason tohumlarının temel bileşeni olan trans-anetol oranı %90 olarak bulunmuştur (Besharati-Seidani et al 2005).

Tabanca ve arkadaşları, Türkiye'nin orta ve kuzey bölgelerinden toplanan anason türlerinden elde edilen uçucu yağların gaz kromatografik ve kütle spektrometrik analizleri üzerine çalışmışlar. Uçucu yağlar, hidro-distilasyon yöntemi ile elde edilmiş. Elde edilen bu uçucu yağlarda belirlenen bileşenler arasında trans-anetol en fazla oranda tespit edilmiş olup, estragol, γ -himachalen, α -zingiberen, valensen, β -bizabolen, cis-anetol, anisaldehit ve hegzadekanoik asit gibi bileşenler de belirlenmiştir (Tabanca vd. 2006).

Orav ve arkadaşları, çeşitli Avrupa ülkelerinden elde edilen anason tohumunun uçucu yağ bileşimi üzerine bir araştırma yapmışlardır. Araştırma sonuçlarında, toplamda 21 adet bileşen belirlenmiştir. Ancak örnekler arasında önemli farklılıklar gözlemlenmiştir. Anason tohumundaki uçucu yağının temel bileşeni olan trans-anetol (%76,9-93,7) ve diğer bileşenler γ -himachalen (%0,4-8,2), p-anisaldehit (%5,4) ve estragol (%0,5-2,3) olarak belirlenmiştir. En fazla trans-anetol miktarı sırasıyla Yunanistan, Macaristan, İskoçya, Litvanya, İtalya ve Almanya'dan alınan anason tohumlarında tespit edilmiştir.

Estonya'dan toplanan anason tohumlarında γ -himachalen (%8,2) bileşeni diğer örneklere göre daha fazla tespit edilmiştir. Fransa'dan toplanan anason tohumlarında ise diğer örneklerle kıyasla en yüksek oranda anisaldehit (%5,4) bileşeni tespit edilmiştir. Alınan bu anason örneklerinden elde edilen uçucu yağda ilk defa β -bourbonene (%0-0,9) ve α -farnesen (%00,4) bileşenleri tespit edilmiştir (Orav vd.2008).

Şanlı ve arkadaşları, Burdur'da tarımı yapılan anason (*Pimpinella anisum* L.), rezene (*Foeniculum vulgare* Mill.), kişniş (*Coriandrum sativum* L.), kimyon (*Cuminum cyminum* L.) ve dereotu (*Anethum graveolens* L.) gibi türlerin uçucu yağ ve bileşenleri üzerine bir araştırma yapmışlardır. Araştırma sonucunda anasonun %2,68, rezenenin %2,74, dereotunun %3,02, kimyonun %1,82 ve kişnişin %0,32 oranında uçucu yağ içerdiği tespit edilmiştir. Temel bileşenler ise sırası ile trans-anetol (%90,35-85,27), karvon (%71,80), 2-karen-10-al (%50,02) ve linalol (%95,56) olduğu sonucuna varılmıştır (Şanlı vd. 2012).

Haşimi ve arkadaşları, anason (*Pimpinella anisum* L.) ve kimyon (*Cuminum cyminum* L.) tohumlarının uçucu yağ bileşenleri, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerini belirlemek amacıyla çalışma yapmışlardır. Yaptıkları bu çalışma sonucunda, anason uçucu yağının bileşenleri olan trans-anetol (%52,94), izoanetol (%13,89), karyofilen oksit (%8,55) ve karyofilen (%4,29) içerdiği, kimyon uçucu yağında ise sırası ile β -pinen (%15,77), α -terpinen (%15,52), 1fenil-1-bütanol (%15,13) ve kuminik aldehit (%12,74) içerdiği tespit edilmiştir. Mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitede ise anason düşük, kimyon ise orta derecede etkili olduğu tespit edilmiştir. Kimyonun antioksidan aktivitesinin anasonunkine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (Haşimi vd. 20014).

Acimovic ve arkadaşları, Sırbistan'da yetiştirilen anason ve rezene meyvelerinden elde edilen uçucu yağlarının bileşenleri üzerine çalışma yapmışlardır. Araştırma sonunda, anason meyvelerinden elde edilen uçucu yağ oranı %3,91, rezene meyvelerinden elde edilen uçucu yağ miktarları ise %7,1 olarak tespit edilmiştir. Uçucu yağdaki bileşen olarak anason meyvelerinden 20 adet, rezene meyvelerinden ise 10 adet belirlenmiştir. Anason meyvelerindeki uçucu yağın bileşenlerinde trans-anetol (%96,8), γ himachalen (%1,84) ve diğeri ise %1'den az, rezene meyvelerindeki uçucu yağın bileşenlerinde ise trans-anetol (%83,43), limonen (%9,34), fenkon (%4,58) ve metil kavikol (%1,36) tespit edilmiştir (Acimovic et al. 2015)

Erdoğan, *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamita* bitkisinin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini incelemiştir. Kullanılan bütün yöntemlerde *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamita* bitkisinin tüm ekstraktlarının genel standart antioksidan maddeler olarak bilinen BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks'a yakın değerlerde antioksidan olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri ise en iyi antibiyotiklerden olan Streptomisin'e göre daha düşük çıkmasına rağmen, diğer çalışmalarla kıyaslandığında, sonuçların yeterli derecede iyi olduğu gözlemlenmiştir (Erdoğan 2012).

Bakır, üç farklı bölgeden işlenmemiş ve üç farklı markada işlenmiş paketlenmiş olarak temin edilen anason ve rezenede toplam fenol, toplam flavonoid, antioksidan aktivitesi ve metal içeriğinin (Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Ni, Cd, Cr, Pb, Co, Al) belirlenmesi ve metal miktarı ile toplam fenol/flavonoid miktarları ve antioksidan aktivitesi arasındaki ilişkiyi istatistiksel olarak incelemiştir. Toplam fenolik madde miktarı kaynatma, demleme ve ekstraksiyonda en yüksek olarak anasonda bulunmuştur (6399,151 $\mu\text{g GA / gr numune}$, 7879,756 $\mu\text{g GA / gr numune}$ ve 7376,778 $\mu\text{g GA / gr numune}$). Toplam flavonoid madde miktarı kaynatma, demleme ve ekstraksiyonda en yüksek olarak yine anasonda bulunmuştur (11785,42 $\mu\text{g QE/ gr numune}$, 11638,42 $\mu\text{g QE / gr numune}$ ve 23376,74 $\mu\text{g QE / gr numune}$). Metal şelatlama aktivitesi kaynatma, demleme ve ekstraksiyonda en yüksek olarak rezenede bulunmuştur (%78,31, %78,14 ve %52,37). Toplam fenol ve toplam flavonoid miktarlarının en yüksek değeri, ekstraksiyon sonucu elde edilen numunelerde belirlenmiştir. Metal içeriğinin ise kaynatma ve demlemeye göre kuru yakma işlemiyle daha yüksek çıktığını gözlemlenmiştir (Bakır 2010).

Akıcı, 10°C'de, farklı sürelerde (yeni hasat, 6 ay, 9 ay ve 12 ay) depolanmış anason (*Pimpinella anisum* L.) tohumlarının uçucu yağ oranları ve uçucu yağın aroma bileşimi üzerine depolama süresinin etkisini araştırmıştır. Anasonda uçucu yağ oranı en yüksek yeni hasatta %2 ve bunu takiben 6 ay depolananda %1,7, 9 ay depolananda %1,5 ve 12 ay depolananda %1,4 bulunmuş ve depolama süresine bağlı olarak azalmıştır. Anason uçucu yağında yeni hasat ve 6 ay depolanmış anasonlarda toplamda 41 adet, 9 ay ve 12 ay depolanmış anasonlarda ise toplamda 43 adet aroma bileşiği tespit edilmiştir. Anason aromasında miktar olarak en önemli bileşikler trans-anetol, estragol, γ -himachalene, anisaldehit ve linalol olmuştur. Uçucu yağ oranı ve aroma bileşiklerinin miktarları

depolama süresi arttıkça azalma göstermiştir. Aromadaki süreye bağlı azalma duyusal analizlerle de doğrulanmıştır (Akıcı 2016).

Kayabaşı, soya bitkilerine (*Glycine max.* L. cv., “A3935”), kuraklık stresi (6, 9, 12, 15, 18 gün) uygulanarak, prolin birikiminin etkileri üzerine çalışmıştır. Sonuçlar kuraklık stresi ile prolin arasında pozitif bir korelasyon olduğunu, MDA aktivitesindeki artışın klorofil miktarındaki artıştan kaynaklanmadığını göstermektedir. Kuraklık stresine bağlı olarak bitkilerin stomalarını kapatarak fotosentez aktivitesini en düşük seviyeye indirdiği, bunun strese karşı koruyucu bir mekanizma olduğu, stoma hareketlerinin yapraktaki birçok fizyolojik ve biyokimyasal olayla bağlantılı olduğu sonucuna varılmıştır. Kuraklık uygulamasına bağlı olarak bitkilerin su seviyelerini belirli düzeyde tutmak için osmotik potansiyellerini düşürdükleri, klorofil ve MDA değerlerinin kuraklık stresine bağlı olarak değiştiği fark edilmiştir. Kuraklık stresinde klorofil seviyesinin azaldığı, MDA miktarının arttığı, iyon miktarlarında stresin süresine ve şiddetine bağlı olarak değişik oranlarda etkilendikleri ve strese karşı değişik tepkiler verdikleri belirlenmiştir. Aynı şekilde prolin miktarının artması da strese karşı verilen bir cevap olarak algılanmıştır (Kayabaşı 2011).

Çulha, yaptığı çalışmada aspir (*Carthamus tinctorius* L.) çeşitlerini artan NaCl konsantrasyonlarına (0-kontrol-, 75, 150, 225, 300 mM NaCl) maruz bırakarak tuzluluğun bitki büyümesi üzerine etkisi ile tuzluluğa karşı oluşturulan içsel savunma mekanizmaları arasındaki ilişkiyi ortaya koymaya çalışmıştır. Çimlenme ve erken fide evresinde artan NaCl konsantrasyonlarına maruz bırakılan aspir çeşitlerinde çimlenme yüzdesi ile hipokotil ve radikula uzunlukları azalmıştır. Artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak çeşitlerin hipokotil ve radikula uzunluklarında benzer oranlarda gözlenen azalma, çimlenme yüzdesinde belirlenen azalmaya göre daha fazladır. Büyüme evresinde, 12 gün boyunca çimlenme ve erken fide evresinde uygulanan aynı miktardaki NaCl konsantrasyonu ile oluşturulan tuz stresi, aspir çeşitlerinde ölçülen morfolojik parametreleri (gövde büyümesi, yaprak sayısı, taze ve kuru ağırlık) ile gerçek ve oransal su içeriğini olumsuz etkilemiştir. Bu parametreler ışığında, çeşitler içinde en az etkilenen çeşit Dinçer, en fazla etkilenen çeşit ise Yenice olmuştur. Artan tuz stresine bağlı olarak, çeşitlerin yapraklarındaki malondialdehit (MDA) ile hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarı ve iyon sızıntı oranı artmıştır. Tuz stresi aspir çeşitlerinin K^+ miktarı ile K^+/Na^+ oranını azaltırken Na^+ içeriğini artırmıştır. Tuz stresi çeşitlerin serbest prolin içeriğinin artmasına neden olmuştur ve tüm NaCl uygulamalarında en yüksek prolin birikimi Remzibey-05

çeşidinde belirlenmiştir. Ayrıca, tuz stresinde toplam klorofil (a+b) ve karotenoid içeriğini de azalmıştır. Bunun yanı sıra, tuz stresi çeşitlerde PSII'nin fotokimyasal aktivitesini de önemli düzeyde etkilemiştir. Ancak, bu etki çeşitlerin hiçbirinde PSII aktivitesini durduracak düzeyde olmamıştır. Tüm klorofil a floresans parametreleri dikkate alındığında, çeşitler dayanıklıdan duyarlıya doğru Dinçer, Remzibey-05 ve Yenice olarak sıralanmıştır. Çeşitlerin tuz stresine karşı oluşturdukları içsel savunma sistemleri olarak bilinen antioksidan enzimlerin (SOD, POD, APX ve GR) aktivitelerindeki değişim incelendiğinde, bu enzimlerin uygulanan NaCl konsantrasyonuna ve çeşide göre farklı tepkiler oluşturduğu görülmüştür. Dinçer çeşidi antioksidan enzim aktivitesindeki artış ile diğer çeşitlere göre daha etkin bir savunma gerçekleştirmiştir. (Çulha 2011)

Baran, yaptığı çalışmada soya fasulye bitkilerinde tuz stresine bağlı prolin ve salisilik asit etkileşimleri incelemiştir. Bulgular prolin ile içsel salisilik asit miktarındaki artışın, prolin ve salisilik asitin oksijen radikallerine karşı koruyucu rol oynadığını ve hücre duvarlarının dayanıklılığına katıldığını göstermektedir. Sonuçlar oksidatif hasarla yaprak yaşı arasında ve oksidatif hasara dayanıklılıkla prolin aktivitesi arasında pozitif bir korelasyon olduğunu, enzim aktivitesindeki artışın salisilik miktarındaki artıştan kaynaklanmadığını düşündürmektedir. Tuz stresine bağlı olarak bitkilerin stomalarını kapatarak fotosentez aktivitesini en düşük seviyeye indirdiği, bunun strese karşı koruyucu bir mekanizma olduğu, stoma hareketlerinin yapraktaki birçok fizyolojik ve biyokimyasal olayla bağlantılı olduğu sonucuna varılmıştır. Tuz uygulamasına bağlı olarak bitkilerin su seviyelerini belirli düzeyde tutmak için osmotik potansiyellerini düşürdükleri, klorofil ve MDA değerlerinin ise tuz stresiyle değiştiği fark edilmiştir. Tuz stresinde klorofil seviyesi azalmış, MDA, prolin ve salisilik asit miktarı artmış, soyanın strese karşı değişik tepkiler verdiği, 0,50-0,75 mM salisilik asit dozun tuzlu alanlarda soya bitkisi için en uygun doz olacağı belirlenmiştir (Baran 2011).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Materyal

Çalışmada kullanılan anason tohumu internet üzerinden satışını yapan Havancızade firmasından temin edildi. Bu tohum Bingöl ili ile Genç ilçesi arasında bulunan bir tarlada 17 Nisan 2016 tarihinde 9 adet saksıda aynı şartlarda ekimi yapıldı (Şekil 3.1). 2 gün arayla düzenli olarak sulaması yapıldı. 72 gün sonra (çiçeklenme döneminde) 3 adet saksıya 150 mM NaCl eklenerek tuz stresi, 3 adet saksıya da sulama yapılmamak üzere kuraklık stresi uygulandı. Diğer 3 saksı ise kontrol için aynı şartlarda yetiştirilmeye devam edildi (Şekil 3.2). 5 gün sonra da hasat işlemi yapıldı.



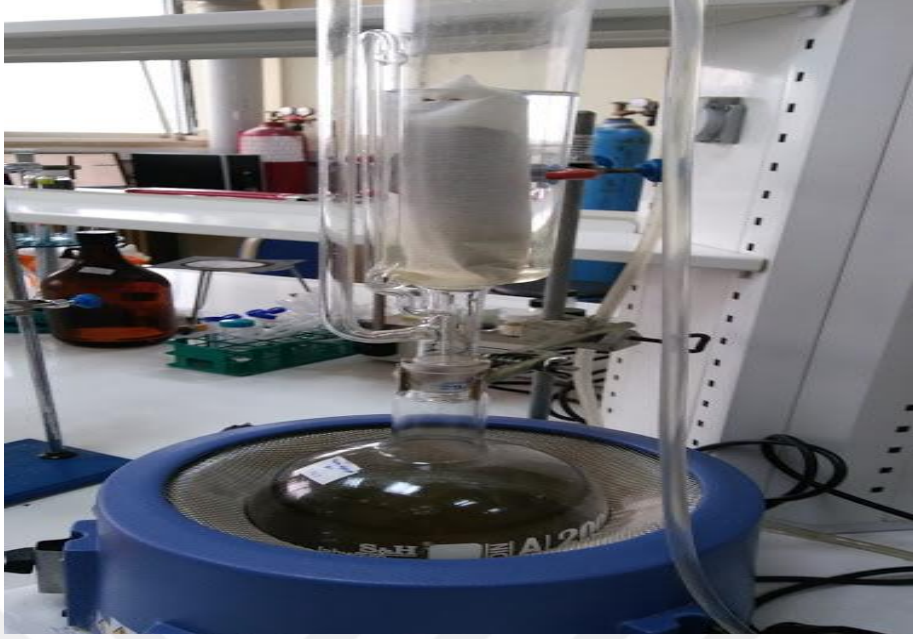
Şekil 3.1. Anason ekiminin yapıldığı saksılar



Şekil 3.2. Kontrol grubu, tuz stresi ve kuraklık stresine sokulan anason bitkisi

3.1.1. Ekstraktların Hazırlanması

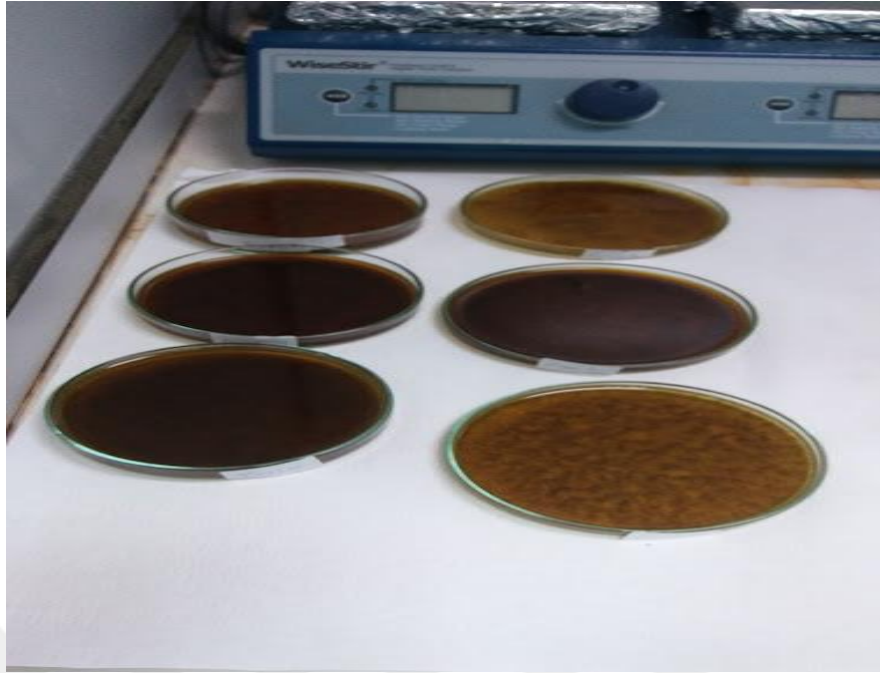
Tuz ve kuraklık stresine maruz bırakılan anason ile kontrol için normal şartlarda yetiştirilen anason bitkilerinin hasadı yapıldıktan sonra hidrojen peroksit (H_2O_2) ile süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) miktarı, lipid peroksidasyon seviyesi, hücresel antioksidan enzimlerin (katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz) aktiviteleri için bitkilerin toprak üstü kısımlarından bir miktar alınarak derin dondurucuya (-86) konuldu. Geri kalan kısımları kurutulduktan sonra blender yardımı ile öğütülüp toz haline getirildi. Uçucu yağ bileşenleri için toz haline getirilen örneklerin bir kısmı kullanıldı. Geri kalan örnekler ise çeker ocak altında (Şekil 3.3), metanol ile çözülerek bucher hunisi ile süzülde. İçindeki çözücü rotary evaporator yardımıyla uçuruldu (Şekil 3.4). Daha sonra elde edilen bitki ekstratlarından (Şekil 3.5) 100 mg alınıp 100 mL metanol de çözülerek total flavanoid, total fenolik, antosiyanin, radikal giderme aktivitesi, indirgenme gücü, metal şelatlama aktivitesi ölçümleri için kullanıldı.



Şekil 3.3. Bitki ekstralarının soxklet ekstraktöründe hazırlanması



Şekil 3.4. Çözücü ihtiva eden bitki ekstralarının rotary evaporator ile çektilmesi



Şekil 3.5. Anason örneklerinin kuru ekstraktları

3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmada, Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvarı ile Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Laboratuvarında bulunan aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Buzdolabı	:4 °C, Arçelik
Çeker Ocak	:Hedlab
Değişik cam malzemeler	
Derin dondurucu	:-86 °C, Hettich/ Nuair
Desikatör	
Döner evaporatör	:Ika RV06-ML
Etüv	:Mettler 100-800
GC-MS	:Agilent
Hassas terazi	:Denver
Manyetik karıştırıcı	:ADVANCED
Otomatik pipetler	:Rainin
Öğütücü	:WARING
pH metre	:Hanna
Saf su cihazı	:GFL 2004

Santrifüj	:Hettich Universal 320
Steril kabin	:Esco class II type A2
Ultrasonik banyo	:Elma S 60 H
UV lambası	:Camag
UV-VIS Spektroskopisi	:Shimadzu/ Jasco V650
Vorteks	:IKA MS3 Basic

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Hazırlanması

3.1.3.1. DPPH Giderme Aktivitesi Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler

- 0,1 mM'lık DPPH çözeltisinin hazırlanması; 4 mg DPPH 100 mL metanol içinde karıştırılarak tamamen çözülerek hazırlandı.

3.1.3.2. Metal Şelatlama Kapasitesi Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler

- 2 mM'lık FeCl_2 çözeltisi; 0,014 gr FeCl_2 alınıp 50 mL saf etanolda çözülerek hazırlandı.
- 5 mM'lık ferrozin çözeltisi; 0,06 gr ferrozin alınıp 25 mL saf etanolda çözülerek hazırlandı.

3.1.3.3. Toplam İndirgeme Kuvveti Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler

- %1'lik Potasyum ferrisiyanür [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] çözeltisi; 1 g [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] 100 mL destile suda çözünene kadar karıştırılarak hazırlandı.
- 0,2 M'lık PH'sı 6,6 olan fosfat tamponu; 2,4 g NaH_2PO_4 bir miktar destile suda çözülüp, pH metre ile pH'sı 6,6'ya ayarlandı ve toplam hacim destile suyla 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
- %10'luk Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi; 10 g TCA 100 mL destile suda çözülerek hazırlandı.
- %0,1'lik Demir klorür (FeCl_3) çözeltisi; 165 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mL destile suda çözülerek hazırlandı.

3.1.3.4. Total Fenol İÇeriği Tayini İÇin Hazırlanan Çözeltiler

- %2'lik sodyum karbonat çözeltisi; 2 g Na_2CO_3 100 mL destile suda çözülerek hazırlandı.
- Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR), satın alındığı şekilde kullanıldı.

3.1.3.5. Ttotal Flavanoid İÇeriği Tayini İÇin Hazırlanan Çözeltiler

- %5'lik sodyum nitrit çözeltisi; 5 g NaNO_2 100 mL destile suda çözülerek hazırlandı.
- %10'luk alümiyum klorit çözeltisi; 10 g AlCl_3 100 mL destile suda çözülerek hazırlandı.
- %4'lük NaOH çözeltisi; 4 g NaOH 100 mL destile suda çözülerek hazırlandı.

3.1.3.6. ABTS Radikali Giderme Aktivitesi Tayini İÇin Hazırlanan Çözeltiler

- 0,1 M'lık fosfat tamponu (pH: 7,4); 2,84 g Na_2HPO_4 170 mL saf suda çözüldü. pH metre yardımı ile pH'sı 7,4'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 200 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 2 mM'lık ABTS çözeltisi; 110 mg ABTS 0,1 M'lık ve pH'sı 7,4 olan 100 mL fosfat tamponunda tamamen çözünmesi için bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda bekletilerek hazırlandı.
- 2,45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisi; 66,25 mg $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ 0,1M'lık ve pH'sı 7,4 olan 100 mL fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak hazırlandı.

3.1.3.7. Toplam Antosiyanin Tayini İÇin Hazırlanan Çözeltiler

- 1,5 M HCl çözeltisi; 5,5 mg HCl alınıp 100 mL destile suda çözüldü.
- 0,2 M KCl çözeltisi; 1,49 mg KCl alınıp 100 mL destile suda çözüldü.
- 1 M $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ çözeltisi; 8,3 mg $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ alınıp 100 mL destile suda çözüldü.

3.1.3.8. Standart Çözeltiler

- Gallik asit çözeltisi; 25 mg Gallik asit 25 mL destile suda çözülerek 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı.
- Kersetin çözeltisi; 25 mg kersetin 25 mL destile suda çözülerek 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı.
- BHA çözeltisi; 25 mg BHA 25 mL destile suda çözülerek 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı.
- E-vitamini çözeltisi; 25 mg e-vitamini 25 mL destile suda çözülerek 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı.
- EDTA çözeltisi; 25 mg EDTA 25 mL destile suda çözülerek 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı.
- Troloks çözeltisi; 25 mg troloks bir miktar metanolde çözüldü, üstü 25 mL olacak şekilde destile su ile tamamlanarak 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı.

3.1.3.9. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarının Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler

- %5'lik Ti(SO₄)₂ çözeltisi; 1 gram Ti(SO₄)₂ 20 mL saf suda çözülerek hazırlandı.
- %19'luk NH₄OH çözeltisi; 4.16 mL NH₃ 20 mL saf suda çözülmesiyle hazırlandı.
- 2 M'lık H₂SO₄ çözeltisi; 40 mL %98'lik H₂SO₄ alınmış 160 mL saf su içerisine ilave edildikten sonra 200 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.1.3.10. Süperoksit Anyon Miktarının Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler

- 65 mM K₂HPO₄, pH: 7.8 çözeltisi; 1,132 g K₂HPO₄ 70 mL saf su da çözüldü pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 10 mM Hydroxilamine çözeltisi; 0,0069 g Hydroxilamine alınıp 10 mL saf suda çözdürülerek hazırlandı.
- 17 mM amonyum benzeno sülfonik asit (ABSA) çözeltisi; 0,1472 g alınmış ve 50 mL saf suda çözdürülerek hazırlandı.
- 17 mM 1-Naftilamine çözeltisi; 0,243 g 1- Naftilamine alınmış 10 mL asetonda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.1.3.11. Lipid Peroksidasyon Aktivitesinin Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler

- %5 lik TCA (trikloroasetik asit) çözeltisi; 100 mL saf su içerisine 5 g TCA ilave edilir. TCA tam olarak çözünene kadar karıştırılarak hazırlandı.
- %0,5 lik TBA (tiobarbutirik asit) çözeltisi; 100 mL saf su içine 20 gram TCA çözüldü ve içerisine 0,5 g TBA ilave edilip iyice karıştırılarak hazırlandı.

3.1.3.12. Süperoksid Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler

- 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7,8) çözeltisi; 1.7 g KH_2PO_4 200 mL saf suda çözüldü, pH: 7,8'e ayarlandıktan sonra ve hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.
- 13 mM metionin çözeltisi; 0,586 g metionin alınıp önceden hazırlanmış olan 250 mL 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek hazırlandı.
- 63 μM NBT (Nitroblue Tetrazolium Klorür) çözeltisi; 0,0128 g NBT alınıp önceden hazırlanmış olan 250 mL 50mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek hazırlandı.
- 0,1 mM EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik asit) çözeltisi; 0,073 g EDTA alınıp önceden hazırlanmış olan 250mL 50mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek hazırlandı.
- 13 μM riboflavin çözeltisi; 0,019 g riboflavin, 500 mL saf suda çözüldü, 3 mL'lik reaksiyon karışımının 13 μM riboflavin içermesi için 390 μL riboflavin alınarak hazırlandı.

3.1.3.13. Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler

- 0,1 M Na_2HPO_4 , pH: 5,5 çözeltisi; 3,55 g Na_2HPO_4 alınarak 200 mL saf suda çözüldü ve pH: 5,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 250 mL'ye tamamlandı.
- Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi; 54 μL quairol ve 15 μL H_2O_2 'den ($d=1,13$ g/mol) 5 mM olacak şekilde 100 mL 0,1 M fosfat tamponu (pH: 5,5) içinde çözümlenerek hazırlandı.

3.1.3.14. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler

- 103.5 mM KH_2PO_4 , pH: 7,5 çözeltisi; 1,4 g KH_2PO_4 , 80 mL saf suda çözüldü, 1 N NaOH ile pH: 7,5'e kadar titre edildi ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- 40 mM H_2O_2 çözeltisi; 408 μL %30'luk H_2O_2 hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 5 mM H_2O_2 çözeltisi; 41 μL %30'luk H_2O_2 hacmi saf su ile 100mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Total Fenolik Madde İçeriği Tayini

Kontrol grubu anason, tuz stresine maruz bırakılan anason ve kuraklık stresine maruz bırakılan anason ekstraktlarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu yöntemiyle belirlendi (Singleton and Rossi 1965). Standart madde olarak gallik asit kullanıldı. Öncelikle kalibrasyon grafiği çizildi. Bu amaçla 1 mg/mL konsantrasyonunda stok çözelti hazırlamak için 25 mg gallik asit alınarak 25 mL destile suda çözüldü. Bu stok çözeltilerden 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200 μL gallik alınarak 25 mL'lik balon jöjelere aktarıldı ve destile suyla hacim 23 mL'ye tamamlandı. Balon jöjelere sırasıyla 0,5 mL FCR ve 3 dakika sonra da %2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 1,5 mL ilave edildi. Karışım 2 saat oda sıcaklığı ile birlikte karanlık ortamda bekletildi. Sonra örneklerin absorbansı 760 nm'de destile sudan oluşan köre karşı ölçüldü.

Aynı işlemler kontrol grubu anason, tuz stresine maruz bırakılan anason ve kuraklık stresine maruz bırakılan anason örnekleri içinde ayrı ayrı yapıldı. Hazırlanan örneklerden 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200 μL alınıp 25 mL'lik balon jöjelere aktarıldı ve hacim destile suyla 23 mL'ye tamamlandı. Sonra sırasıyla 0,5 mL FCR ve 3 dakika sonra da 1,5 mL %2'lik Na_2CO_3 ilave edildi. Numuneler 2 saat boyunca oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletildikten sonra absorbansları destile sudan oluşan köre karşı 760 nm'de ölçüldü. Bu işlemler her örnek için üç kez tekrarlandı (Geçibesler 2013).

3.2.2. Total Flavonoid Madde İçeriği Tayini

Kontrol grubu anason, tuz stresine maruz bırakılan anason ve kuraklık stresine maruz bırakılan anason ekstraktlarında bulunan toplam flavonoid madde miktarı Chang ve arkadaşlarının yapmış olduğu metoda göre belirlendi (Chang et al 2002). Standart flavonoid bileşik olarak kersetin kullanıldı. Bunun için öncelikle kalibrasyon grafiği çizildi. Bu amaçla 1 mg/mL konsantrasyonunda stok çözelti hazırlamak için 25 mg kersetin alınarak 25 mL destile suda çözüldü. Bu stok çözülden 25, 50, 75, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 μ L alınarak deney tüplerine konuldu. Daha sonra bunların üzeri 1,5 mL su ile tamamlandı. Sırasıyla 75 μ L %5'lik NaNO_2 çözeltisi, 6 dakika sonra 150 μ L %10'luk AlCl_3 çözeltisi, 5 dakika sonra da 0,5 mL 1 M NaOH çözeltisinden eklendi. Son olarak ta hacmi 2,5 mL'ye destile suyla tamamlanıp vortekslendikten sonra örneklerin absorbansı 510 nm'de destile sudan oluşan köre karşı ölçüldü.

Aynı işlemler kontrol grubu anason, tuz stresine maruz bırakılan anason ve kuraklık stresine maruz bırakılan anason örnekleri içinde ayrı ayrı yapıldı. Hazırlanan örneklerden 50, 200, 800 μ L alınıp deney tüplerine konuldu. Bunların üzeri 1,5 mL su ile tamamlandı. Sırasıyla 75 μ L %5'lik NaNO_2 çözeltisinden, 6 dakika sonra 150 μ L % 10'luk AlCl_3 çözeltisinden, 5 dakika sonra da 0,5 mL 1 M NaOH çözeltisinden eklendi. Son olarak ta hacmi 2,5 mL'ye destile suyla tamamlanıp vortekslendikten sonra örneklerin absorbansı 510 nm'de destile sudan oluşan köre karşı ölçüldü. Bu işlemler her örnek için üç kez tekrarlandı (Geçibesler 2013).

3.2.3. Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (DPPH Testi)

Bitki ekstratlarının DPPH serbest radikalini süpürücü etkileri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil stabil radikalinin mor/menekşe rengini azaltma yetenekleri ile ölçümü yapılmaktadır. Bu metot, maddelerin DPPH ile oluşturdukları rengin 517 nm'de ölçülerek standart kimyasallar ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır (Blois 1958). Metot, bitki ekstraktlarının bir proton veya elektron verebilme yeteneğinin, mor/menekşe renkli DPPH çözeltisinin rengini açması esasına dayanır. Reaksiyon karışımının absorbansının düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesi olduğunu gösterir. DPPH radikalinin etkinliğinin giderilmesi çalışmaları çeşitli araştırmacıların ortaya koydukları metodu takiben yapılmıştır.

Bu metoda göre, 0,1 mM'lık DPPH çözeltisi vorteks yardımıyla 30 saniye karıştırıldıktan sonra karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 60 dakika bekletildi. Sonra 50, 100, 200, 400, 600, ve 1000 µL'lik bitki örnekleri ile 0, 10, 20, 30, 40, 50, 75,100, 200 ve 400 µL'lik standartlar deney tüplerine konarak hazırlandı. Üzerleri etanol ile 3 mL'ye tamamlandı. 1 mL DPPH eklenip vortekslenildikten sonra 30 dakika inkübe edildi. Sonra 517 nm'de kör numuneye karşı ölçüm alındı. Kontrol olarak DPPH çözeltisi, kör olarak da etanol kullanıldı. Ölçümler her örnek için 3 kez tekrarlandı (Geçibesler 2013).

3.2.4. Metal Şelatlama Aktivitesinin Belirlenmesi

Metal şelatlama özelliği olan antioksidan maddeler serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirir. Böylece fenton reaksiyonları sonucu oluşan hidroksil ve peroksit gibi radikal oluşumu engellenmiş olur. Bu deneyde örneklerin Fe^{2+} şelatlama etkisi araştırıldı. Bu amaçla $FeCl_2$ çözeltisi kullanıldı. Fe^{2+} iyonu ve ferrozinin oluşturduğu kompleksin 562 nm'de mor renk oluşturmasına dayanılarak şelatlama aktivitesi belirlendi. Örneklerin ve standartların metal şelatlama kapasitesi Dinis ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemler esas alınarak uygulandı (Dinis et al 1994).

50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µL'lik bitki örnekleri ile 0, 10, 15, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µL'lik standart çözeltiler alınarak deney tüplerine konuldu. Toplam hacimleri etanol ile 3 mL'ye tamamlandı. Her bir numune 50 µL 2 mM $FeCl_2$ çözeltisi ile 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 200 µL 5 mM ferrozin eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Demir iyonları ve ferrozinin oluşturduğu kompleksin absorbansı 562 nm'de ölçüldü. Ölçümler her örnek için 3 kez tekrarlandı (Geçibesler 2013).

3.2.5. İndirgeme Gücü Aktivitesi

Bitki ekstraktlarının ve standartların indirgeme kapasitesi Oyaizu metoduna göre belirlendi (Oyaizu 1986). Ortamdaki indirgen madde, Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına indirgeyerek ve $FeCl_3$ ilavesiyle oluşan prusya mavisi rengindeki kompleksin absorbansı ölçüldü. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesi olduğunun göstergesidir.

Bu metoda göre, bitki ekstraktları ile standartlardan oluşan 15, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µL'lik örnekler oluşturuldu. Her örnek saf su ile 1 mL'ye tamamlandı. Önce

2,5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH=6,6), sonra 2,5 mL %1'lik potasyum ferrisiyanür [$K_3Fe(CN)_6$] eklenerek 50°C'de 20 dk. inkübasyona bırakıldı. Bu aşamadan sonra reaksiyon karışımı oda sıcaklığına getirilip üzerine 2,5 mL %10'luk trikloroasetik asit eklenerek 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu çözeltinin üst kısmından 2,5 mL alınarak 2,5 mL destile su ve 500 µL %0,1'lik $FeCl_3$ eklendikten sonra 700 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Ölçümler her örnek için 3 kez tekrarlandı (Geçibesler 2013).

3.2.6. ABTS Radikali Giderme Aktivitesi

ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzothiazolin-6-sülfonat)) radikali giderme aktivitesi, Re ve arkadaşlarının metodu ile belirlendi (Re et al 1999). ABTS'nin potasyum persülfat oksidasyonu ile direkt ABTS radikali oluşturulur.

Bu işlem için 2 mM'lık ABTS çözeltisi, 2,45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisine eklenerek ABTS radikali elde edildi. Elde edilen ABTS radikali çözeltileri işlemlerden önce 734 nm'de absorbansı 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile $0,700 \pm 0,025$ nm olarak belirlendi. 25, 50, 75, 100, 150, 200 ve 250 µL ekstrelerinin stok çözeltileri 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile 500 µL'ye tamamlandı. Daha sonra 2,5 mL ABTS radikali çözeltisi ilave edildikten sonra 8 dakika inkübe edildi. Tampondan oluşan köre karşı 734 nm'de absorbansları kaydedildi. Yapılan işlemler üç kez tekrar edildi. (Geçibesler 2013).

3.2.7. Toplam Antosiyanin Tayini

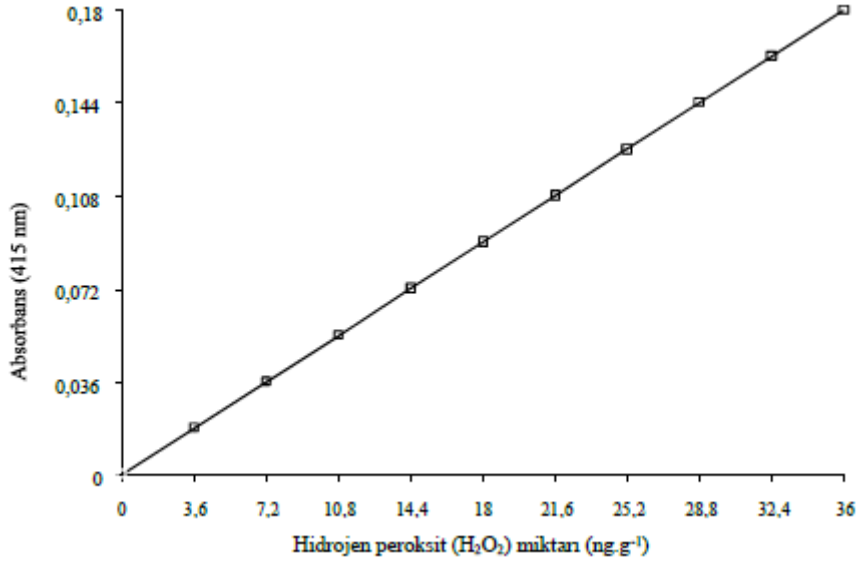
Tuz stresi uygulanan, kuraklık stresi uygulanan ve kontrol için yetiştirilen anason örneklerinden hazırlanan ekstraktardan toplam antosiyanin tayini pH diferansiyel metodu ile gerçekleştirildi. Bitki ekstraktlarından 50 mg'lık örnekler alınıp 6800 µL etanol ve 1200 µL 1,5 M HCl çözeltisi ile yeni çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerden deney tüplerine 1000'er µL alındı, pH: 1 olan tampondan (0,2 M KCl) 5000 µL ilave edildi. Örneklerin 510, 520 ve 700 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Daha sonra aynı işlemler pH: 4,5 olan tampon çözeltisi (1 M $C_2H_3NaO_2$) ile tekrarlandı. Tüm örnekler için ölçüm üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.8. Reaktif Oksijen Türleri Miktarının Belirlenmesi

3.2.8.1. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarının Belirlenmesi

Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi için; anason bitkilerinin toprak üstü kısımlarından 0,5 gram alındı. Alınan örnekler 10 mL soğuk aseton içinde homojenize edildi. Sonra homojenat 10.000 x g'de 10 dakika santrifüje tabi tutuldu. Daha sonra elde edilen süpernatantın 1,5 mL'si alınıp, önce 0,15 mL %5'lik Ti(SO₄)₂ (titanyum disülfat), sonra 0,3 mL %19'luk NH₄OH (amonyum hidroksit) ile karıştırıldı. Çökelek oluştuktan sonra karışım 10.000 x g'de 10 dakika daha santrifüje tabi tutuldu. Böylelikle tüpünsüpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Elde edilen pelet 3 mL 2 M'lık H₂SO₄ (sülfürik asit) içinde çözüldükten sonra 415 nm'de absorbansı ölçülerek kaydedildi. Daha önceden hazırlanmış standart grafik yardımıyla bu ortalama absorbans değerleri nanogram cinsinden H₂O₂ miktarına dönüştürüldü. Sonuçlar g yaprak başına düşen H₂O₂ miktarı (ng/g⁻¹) olarak değerlendirildi (He et al. 2005; Esim 2011).

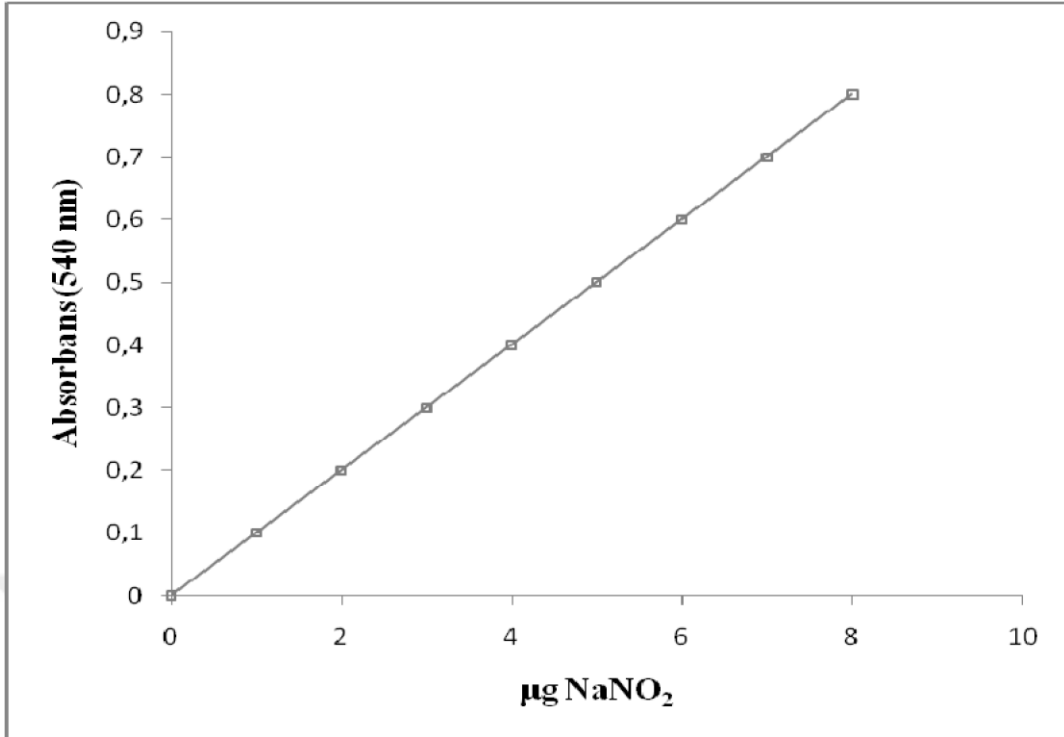
H₂O₂ miktarını belirlemede kullanılan hidrojen peroksit standardı için, %35'lik H₂O₂ çözeltilisinden hazırlanan 3 mM'lık stok çözeltiden tüplere; 3,6, 7,2, 10,8, 14,4, 18, 21,6, 25,2, 28,8, 32,4 ve 36 nanogram şeklinde konuldu. Her tüpün hacmi aseton ile 1.5 mL'ye tamamlandı ve her tüpe sırasıyla 0,15 mL %5'lik Ti(SO₄)₂ ve 0,3mL %19'luk NH₄OH eklendi. Çökelek oluştuktan sonra karışım 10.000 x g'de 5 dakika daha santrifüje tabi tutuldu. Elde edilen pelet, 3 mL 2 M'lık H₂SO₄ içinde çözüldü. Sonra 415 nm'de absorbans köre karşı okundu. Absorbans değerlerine karşılık gelen nanogram H₂O₂ değerleri kullanılarak standart grafik oluşturuldu (Esim 2011).



Şekil 3.6. H₂O₂ miktarını belirlemede kullanılan standart grafik (ng.g⁻¹)

3.2.8.2 Süperoksit Anyon Miktarının Belirlenmesi

Süperoksit anyon miktarının belirlenmesi için; 0,5 g anason bitkilerinin toprak üstü kısmı sıvı azot ile toz haline getirildikten sonra üzerine 2 mL 65 mM (pH: 7,8) fosfat tamponu eklendi. Homojenat 5000 x g' de 10 dk. ve + 4 °C de santrifüje tabi tutuldu. Süpernatant 1 mL, 10 mM hidroxilamin'den 0.1 mL ve aynı fosfat tamponundan 0,9 mL alınıp karıştırıldı. Sonra 25 °C' de 20 dk. inkübe edildi. İnkübasyona bırakılan karışımın 1 mL'si alınıp üzerine 1 mL 17 mM aminobenzene sülfonik asit ve 1 mL 17 mM 1-naftilamin eklendi. Tekrar 25 °C de 20 dk. inkübe edildikten sonra spektrofotometre de 530 nm'de ölçüm alındı. Sonuçlar NaNO₂ standart grafiğine bakılarak değerlendirildi (Eltner and Heupel 1976; Esim 2011).



Şekil 3.7. O₂⁻ miktarını belirlemede kullanılan standart grafik (µg.g⁻¹).

3.2.9. Lipid Peroksidasyon Miktarının Belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu için; 0.5 g anason bitkilerinin toprak üstü kısmı alınarak 5 mL %5 lik TCA içinde homojenize edildi. Elde edilen homojenat 10.000 x g'de 15 dakika santrifüje tabi tutuldu. Tüpün süpernatant kısmından 4 mL alındıktan sonra üzerine 1 mL %0,5'lik TBA çözeltisi ilave edildi. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika bekletildikten sonra reaksiyon, tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durduruldu. Örnekler tekrar 10.000 x g'de 10 dakika santrifüje tabi tutuldu. Süpernatant kısmı alınarak absorbansı 532 nm de okundu. Sonra 600 nm'deki nonspesifik absorpsiyon için absorbans değeri belirlendi. Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm'de belirlenen değeri çıkarıldı ve 1 mL çözeltideki MDA (nmol/g): $[(A_{532}-A_{600})/155000] \times 10^6$ formülüyle hesaplandı. Sonuçlar MDA (nmol/gram doku) şeklinde verildi (Ananieva et al. 2002; Esim 2011).

3.2.10. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.10.1. Hücresel Proteinlerin Ekstraksiyonunun Belirlenmesi

Hücresel proteinlerin ekstraksiyonu için, anason toprak üstü kısmından 0,5 g alınıp soğuk bir havan içine konuldu ve üzerine sıvı azot ilave edilerek toz haline gelinceye kadar öğütüldü. Üzerine 5 mL soğuk homojenat tamponu (%1 PVP ve 1 mM EDTA ihtiva eden 0,1 M KH_2PO_4 pH: 7,0) ilave edildikten sonra karışım bir santrifüj tüpüne aktarılarak $15.000 \times g$ ' de ve $+4^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika santrifüje tabi tutuldu. Santrifüj işlemi sonucunda elde edilen süpernatant, antioksidan enzimlerin aktivite ölçümleri için kullanıldı (Angelini et al. 1990; Esim 2011).

3.2.10.2. Süperoksid Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Süperoksid dismutaz aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun süperoksid dismutaz enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirleme esasına dayanır. 3 mL'lik reaksiyon karışımı; 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7,8), 13 mM metiyonin, 63 μM NBT, μM riboflavin ve 0,1 mM EDTA'dan oluşmaktadır. Aktivite ölçümü için 3 mL spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2,58 mL alındı ve üzerine 30 μL enzim ekstraktı eklendi. Reaksiyon, tüp üzerine 13 μM 'lık riboflavin çözeltisinden 390 μL eklenerek karıştırıldıktan sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatıldı. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk. tutuldu ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durduruldu. 15 dk. içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de ölçüm alındı. Kör; aynı çözeltinin enzimsiz olanından oluşmaktadır. Süperoksit dismutaz aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi ve değerler EU/g protein olarak sunuldu (Agarwal and Pandey 2004; Esim 2011).

3.2.10.3. Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidaz aktivite tayini, guaikol ve H_2O_2 'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşimde meydana gelen absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır. Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 100 mL 0,1 M,

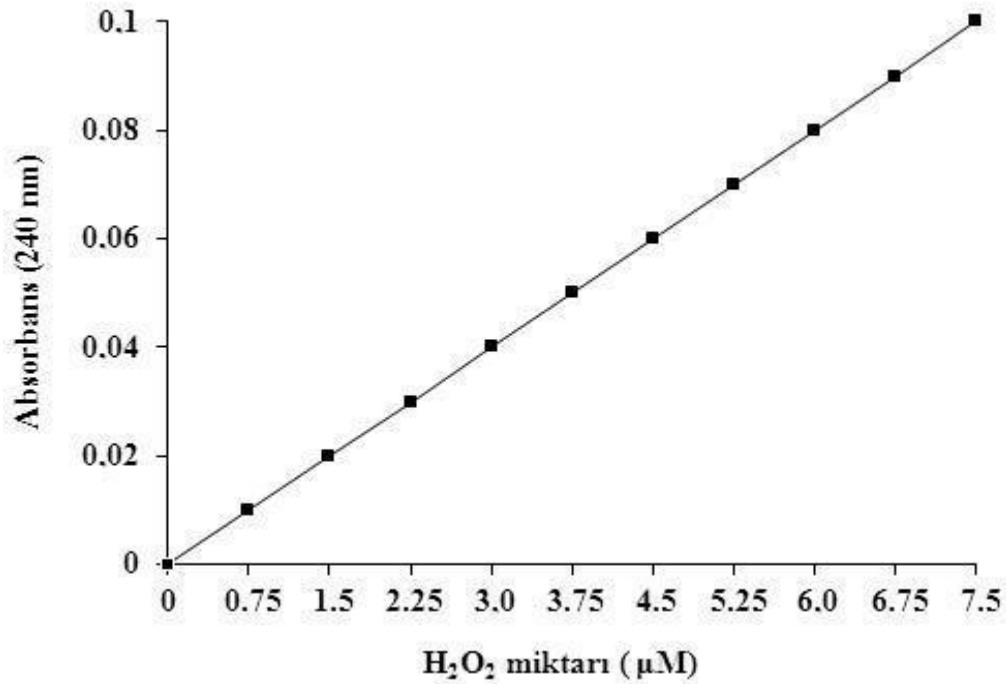
NaH₂PO₄ (pH: 5,5) ile 5 mM guaikol ve 5 mM H₂O₂ içeren substrat çözeltisinden 3 mL konuldu. Sonra üzerine 10 µL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. 470 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedildikten sonra absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlandı. 25 °C'de 1 dakikada, absorbansı 0,01 abs artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi ve sonuçlar g protein başına düşen enzim ünitesi (EU/g protein) olarak sunuldu (Yee et al. 2002; Esim 2011).

3.2.10.4. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalazın aktivite tayini için Gong ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı. Bu metot, katalazın ortamdaki hidrojen peroksit'in oksijen ve suya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans değişiminin izlenmesi esasına dayanır.

Öncelikle reaksiyonda azalan H₂O₂ miktarını belirlemek için standart grafik oluşturuldu. Grafik oluşturmak için, 5 mM H₂O₂ çözeltisinden 3 mL'lik spektrofotometre tüplerine sırasıyla; 0,15, 0,3, 0,45, 0,6, 0,75, 0,9, 1,05, 1,2, 1,35 ve 1,5 mL konuldu. Tüplerin hacimleri saf su ile 1,5 mL'ye tamamlandı. Sonra her tüpe 1,47 mL 103,5 mM KH₂PO₄ ve 30 µL su ilave edildi. Spektrofotometrede 240 nm'de absorbans değeri ölçüldü ve absorbans değerlerine karşılık gelen µM H₂O₂ değerleri kullanarak standart grafik oluşturuldu.

Aktivite tayini için; spektrofotometre küvetine, 103 mM KH₂PO₄ tamponundan 1,475 mL, 40 mM'lık H₂O₂ çözeltisinden 1,5 mL, sonra 25 µL enzim ekstraktı eklendi. Spektrofotometrede 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla absorbans değeri ölçüldü ve absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. Standart grafik yardımıyla absorbans değerleri µmol cinsinden H₂O₂ miktarına dönüştürüldü. 25 °C'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 µmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi ve sonuçlar g protein başına düşen enzim ünitesi (EU/g protein) olarak sunuldu (Gong et al. 2001; Esim 2011).



Şekil 3.8. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik.

3.2.11. Uçucu Yağ Bileşenlerinin Belirlenmesi

Uçucu yağ bileşenleri Bingöl Üniversitesi Merkez Laboratuvarındaki Agilent Technologies 5975 C model Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometrisi (Gas Chromatography / Mass Spectrometry, GC-MS) cihazında belirlenmiştir (Şekil 3.9). Ekstraksiyon yönteminde katı faz ekstraksiyon (solid phase extraction) yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla hiçbir işleme tabii tutulmamış yaklaşık 2 gr öğütülmüş kuru bitki örneği, kapalı vialler içine konulduktan sonra sırasıyla 60 °C'de 15 dakika fibersiz ısıtma, 15 dakika fiberle absorpsiyon ve 5 dakika 250 °C'de desorbisyon işlemlerinden geçirilerek analiz edilmişlerdir. Analizde kullanılan GC-MS koşulları aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.9. Uçucu yağ bileşenleri miktarının tespitinde kullanılan HS-SPME/GS-MS cihazı.

3.2.11.1. Uçucu Yağ Bileşenlerinin Belirlenmesinde Kullanılan GC-MS Koşulları

Enjeksiyon Bloğu: 275 °C

Dedektör: 275 °C

Akış Hızı: 3 mL dak⁻¹

Dedektör: 70 eV

İyonlaştırma Türü: EI

Kullanılan Gaz: Helyum

Kullanılan Kolon: HP 5 MS 3,0 x 0,25 mm, 0,25 µm

Fırın Programı: 2 °C dak⁻¹ hızla 70 °C'den 275 °C'ye çıkma, 80, 190 ve 260 °C'de 3 dakika bekleme (Toplam 65 dk.).

Kullanılan Kütüphaneler: Wiley, Nist, Tutor

3.2.12. İstatiksel Analiz

Örneklerin antioksidan aktivite testleri ve sekonder metabolit analizleri üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Analiz sonuçları ortalama + standart sapma olarak verildi. Örnekler arasındaki farklar tek yönlü varyans analizinde (One-Way ANOVA) çoklu karşılaştırmalı (Post Hoc) Tukey HSD testi ile karşılaştırılmıştır. $p < 0,05$ düzeyi anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Seviyesi

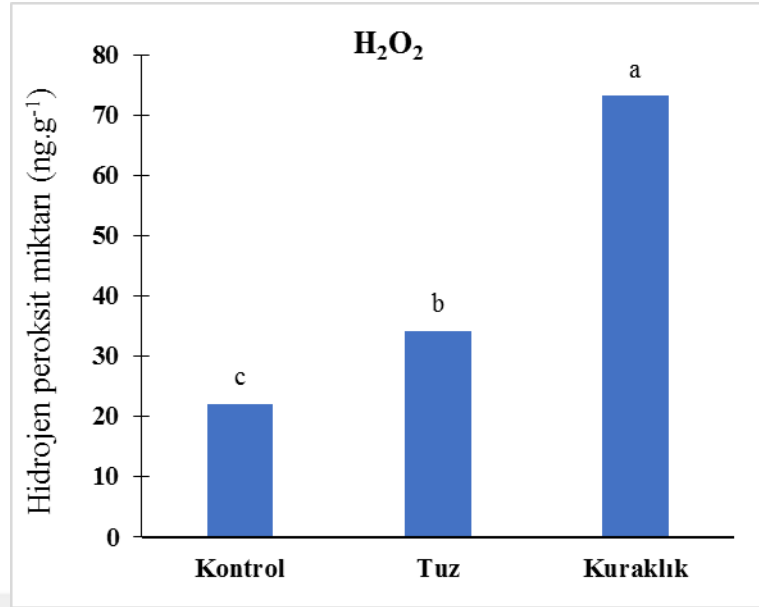
4.1.1.1. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarı

Anason bitkisinin kontrol, tuzluluk ve kuraklık gruplarında Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarındaki değişim tablo 4.1 ve şekil 4.1 de belirtildiği gibi tespit edilmiştir. Buna göre; 150 mM NaCl ve kuraklık uygulamaları kontrole göre anason bitkisinin toprak üstü kısımlarında H₂O₂ miktarlarında önemli ($p<0,05$) artışlara neden olmuştur. Kontrol grubu bitkilerinde H₂O₂ miktarı 22,08 ng.g⁻¹ olarak ölçülürken, 150 mM NaCl uygulaması ise bu değeri %45'lik bir artış ile 32,04 ng.g⁻¹'a kadar arttırdığı görülmektedir (Tablo 4.1 ve şekil 4.1). Benzer şekilde kuraklık stresi anason bitkilerinin toprak üstü kısımlarında H₂O₂ miktarında %231,5 gibi çok önemli bir artış sağlamış ve H₂O₂ miktarı 73,21 ng.g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1 ve şekil 4.1).

Tablo 4.1. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarları.

Gruplar	H ₂ O ₂ (ng.g ⁻¹)
KOG	22,08 ± 0,39 ^c
TUG	32,04 ± 0,21 ^b
KUG	73,21 ± 0,33 ^a

*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $p<0,05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.1. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarları.

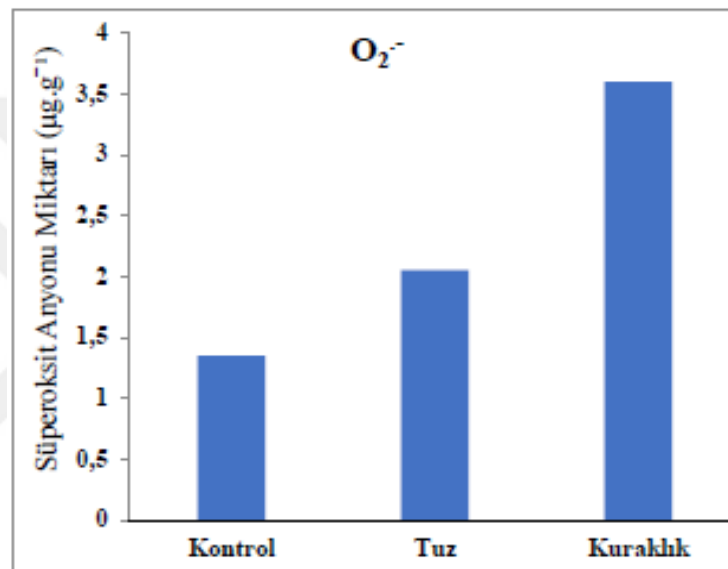
4.1.1.2. Süperoksit Anyonu ($O_2^{\cdot-}$) Miktarı

Anason bitkisinin kontrol, tuzluluk ve kuraklık gruplarında süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) miktarındaki değişim Tablo 4.2 ve şekil 4.2 de belirtildiği gibi tespit edilmiştir. Buna göre; 150 mM NaCl ve kuraklık uygulamaları kontrole göre anason bitkisinin toprak üstü kısımlarında $O_2^{\cdot-}$ miktarlarında ($p < 0,05$) önemli artışlara neden olmuştur. Kontrol grubu bitkilerinde $O_2^{\cdot-}$ miktarı $1,35 \mu\text{g.g}^{-1}$ olarak ölçülürken, 150 mM NaCl uygulaması ise bu değeri %51,8'lik bir artış ile $2,05 \mu\text{g.g}^{-1}$ 'a kadar arttırdığı görülmektedir (Tablo 4.2 ve şekil 4.2). Benzer şekilde kuraklık stresi anason bitkilerinin toprak üstü kısımlarında $O_2^{\cdot-}$ miktarında %166,6 gibi çok önemli bir artış sağlamış ve süperoksit anyon miktarı $3,60 \mu\text{g.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2 ve şekil 4.2).

Tablo 4.2. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki süperoksit anyon miktarları.

Gruplar	Süperoksit Anyon ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
KOG	$1,35 \pm 0,39^c$
TUG	$2,05 \pm 0,21^b$
KUG	$3,60 \pm 0,33^a$

*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $p < 0,05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.2. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki süperoksit anyon miktarları.

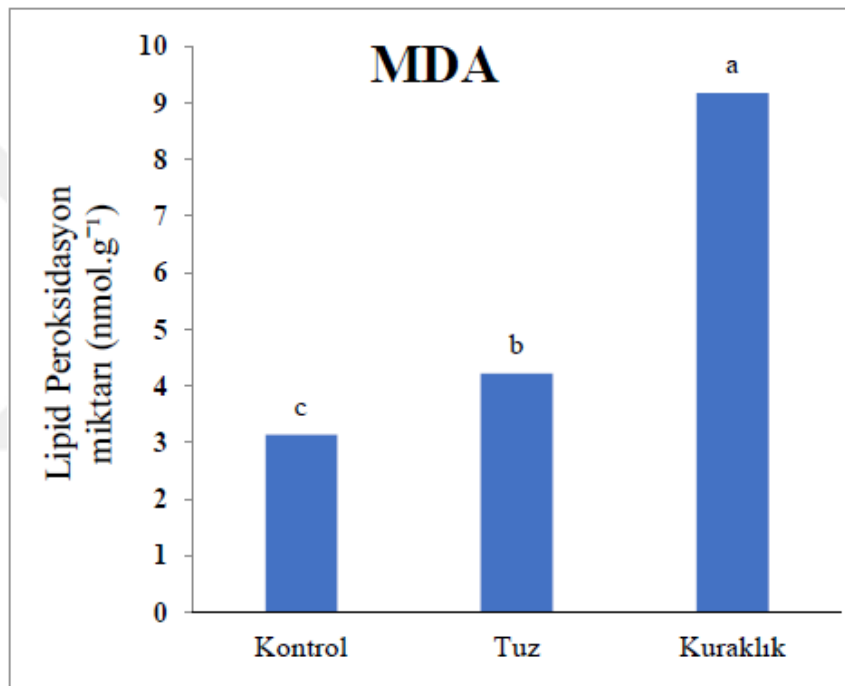
4.1.2 Lipid Peroksidasyon Miktarı

Anason bitkisinin kontrol, tuzluluk ve kuraklık gruplarında lipid peroksidasyon seviyesindeki (malodialdehit, MDA) değişim Tablo 4.3 ve şekil 4.3 de belirtildiği gibi tespit edilmiştir. Buna göre; 150 mM NaCl ve kuraklık stresi uygulamaları kontrole göre anason bitkisinin toprak üstü kısımlarında MDA seviyesinde ($p < 0,05$) artışlara neden olmuştur. Kontrol grubu bitkilerinde MDA seviyesi $3,14 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak ölçülürken, 150 mM NaCl uygulaması ise bu değeri %34'lük bir artış ile $4,21 \text{ nmol.g}^{-1}$ 'e kadar arttırdığı görülmektedir (Tablo 4.3 ve şekil 4.3). Benzer şekilde kuraklık stresi anason bitkilerinin toprak üstü kısımlarında MDA seviyesinde %191 gibi çok önemli bir artış sağlamış ve lipid peroksidasyon aktivitesi $9,17 \text{ nmol.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2 ve şekil 4.2).

Tablo 4.3. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki lipid peroksidasyon miktarları.

Gruplar	MDA (nmol.g ⁻¹)
KOG	3,14 ± 0,39 ^c
TUG	4,21 ± 0,21 ^b
KUG	9,17 ± 0,33 ^a

*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $p < 0,05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.3. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki lipid peroksidasyon miktarları.

4.1.3. Protein Miktarı

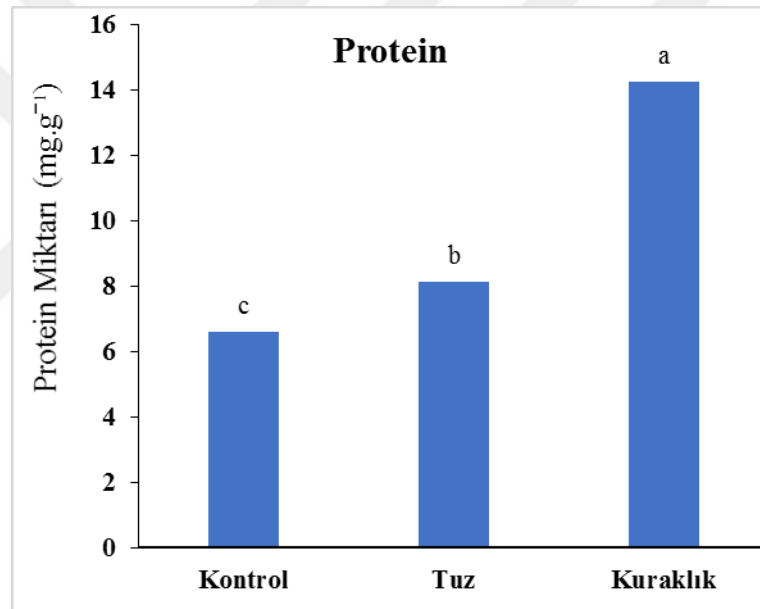
Anason bitkisinin kontrol, tuzluluk ve kuraklık gruplarında protein miktarındaki değişim Tablo 4.4 ve şekil 4.4 de belirtildiği gibi tespit edilmiştir. Buna göre; 150 mM NaCl ve kuraklık uygulamaları kontrole göre anason bitkisinin toprak üstü kısımlarında protein miktarlarında ($p < 0,05$) artışlara neden olmuştur. Kontrol grubu bitkilerinde protein miktarı 6,60 mg.g⁻¹ olarak ölçülürken, 150 mM NaCl uygulaması ise bu değeri %23'lük bir artış ile 8,13 mg.g⁻¹'a kadar arttırdığı görülmektedir (Tablo 4.4 ve şekil 4.4). Benzer şekilde kuraklık stresi anason bitkilerinin toprak üstü kısımlarında lipid peroksidasyon

miktarında %115,6 gibi önemli bir artış sağlamış ve protein miktarı $14,23 \text{ mg.g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Tablo 4.4 ve şekil 4.4).

Tablo 4.4. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki protein miktarları.

Gruplar	Protein (mg.g^{-1})
KOG	$6,60 \pm 0,39^c$
TUG	$8,13 \pm 0,21^b$
KUG	$14,23 \pm 0,33^a$

*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $p < 0,05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.4. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki protein miktarları.

4.1.4. Antioksidan Enzimler

4.1.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi

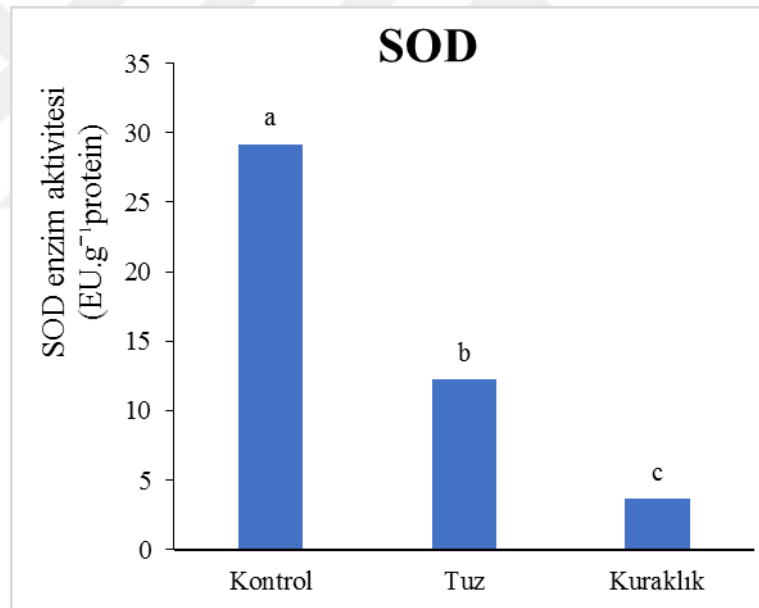
Anason bitkisinin kontrol, tuzluluk ve kuraklık gruplarında SOD aktivitesindeki değişim Tablo 4.5 ve şekil 4.5 de belirtildiği gibi tespit edilmiştir. Buna göre; 150 mM NaCl ve kuraklık uygulamaları kontrole göre anason bitkisinin toprak üstü kısımlarında SOD aktivitesinde ($p < 0,05$) önemli oranda azalmaya neden olmuştur. Kontrol grubu bitkilerinde SOD aktivitesi $29,18 \text{ EU.g}^{-1}$ protein olarak ölçülürken, 150 mM NaCl uygulaması ise bu değeri %138'lik önemli bir azalma ile $12,26 \text{ EU.g}^{-1}$ protein'e kadar

düşürdüğü görülmektedir (Tablo 4.5 ve şekil 4.5). Benzer şekilde kuraklık stresi anason bitkilerinin toprak üstü kısımlarında SOD aktivitesinde %699 gibi çok önemli bir azalma sağlamış ve SOD aktivitesi $3,65 \text{ EU.g}^{-1}\text{protein}$ olarak belirlenmiştir (Tablo 4.5 ve şekil 4.5).

Tablo 4.5. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki SOD aktivitesi.

Gruplar	SOD ($\text{EU.g}^{-1}\text{protein}$)
KOG	$29,18 \pm 0,33^a$
TUG	$12,26 \pm 0,21^b$
KUG	$3,65 \pm 0,39^c$

*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $p < 0,05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.5. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki SOD aktivitesi

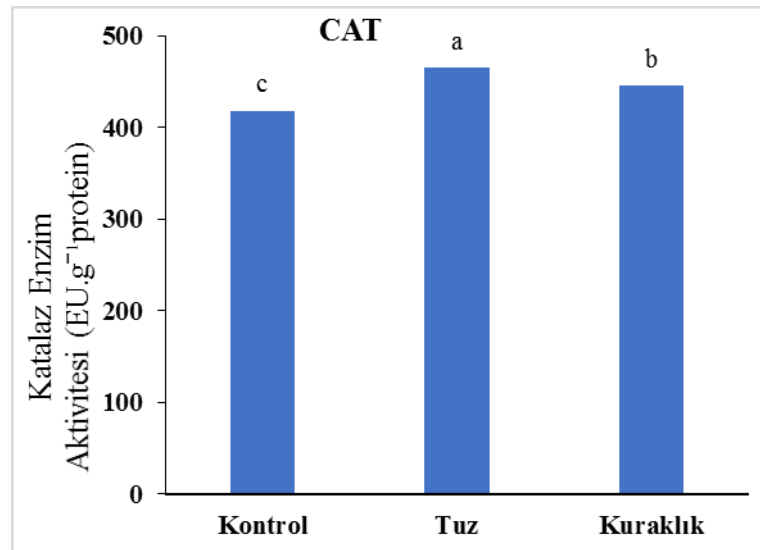
4.1.4.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi

Anason bitkisinin kontrol, tuzluluk ve kuraklık gruplarında CAT aktivitesindeki değişim Tablo 4.6 ve Şekil 4.6 de belirtildiği gibi tespit edilmiştir. Buna göre; 150 mM NaCl ve kuraklık uygulamaları kontrole göre anason bitkisinin toprak üstü kısımlarında CAT aktivitesinde ($p<0,05$) az bir oranda artmaya neden olmuştur. Kontrol grubu bitkilerinde CAT aktivitesi $417,92 \text{ EU.g}^{-1}\text{protein}$ olarak llrken, 150 mM NaCl uygulaması ise bu değeri %11'lik bir artma ile $464,84 \text{ EU.g}^{-1}\text{protein}$ 'e kadar artırdığı görülmektedir (Tablo 4.6 ve Şekil 4.6). Benzer Şekilde kuraklık stresi anason bitkilerinin toprak üstü kısımlarında CAT aktivitesinde %6,5'lik bir artma sağlamış ve CAT aktivitesi $445,36 \text{ EU.g}^{-1}\text{protein}$ olarak belirlenmiştir (Tablo 4.6 ve Şekil 4.6).

Tablo 4.6. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki CAT aktivitesi.

Gruplar	CAT ($\text{EU.g}^{-1}\text{protein}$)
KOG	$417,92 \pm 0,39^c$
TUG	$464,84 \pm 0,33^a$
KUG	$445,36 \pm 0,21^b$

*Bir sütün içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $p<0,05$ önem seviyesine göre anlamsızdır



Şekil 4.6. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki CAT aktivitesi

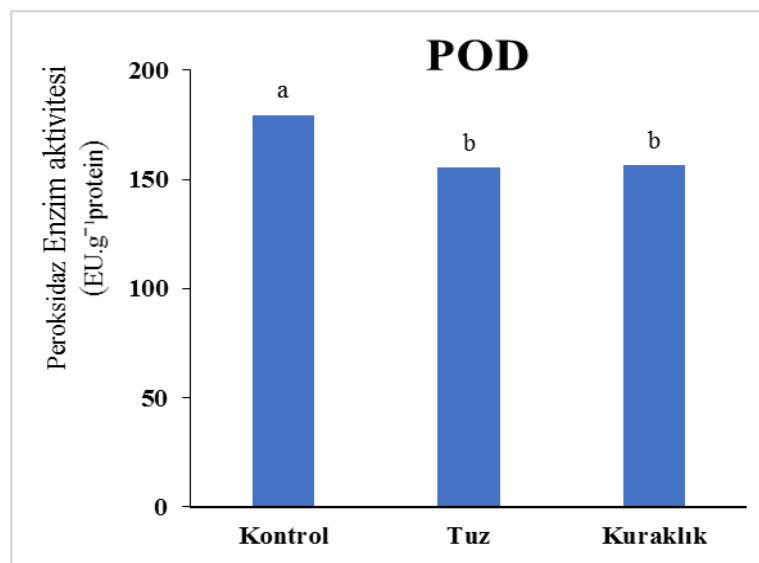
4.1.4.3. Peroksidaz (POD) Enzim Aktivitesi

Anason bitkisinin kontrol, tuzluluk ve kuraklık gruplarında POD aktivitesindeki değişim Tablo 4.7 ve Şekil 4.7 de belirtildiği gibi tespit edilmiştir. Buna göre; 150 mM NaCl ve kuraklık uygulamaları kontrole göre anason bitkisinin toprak üstü kısımlarında POD aktivitesinde ($p < 0,05$) azalmaya neden olmuştur. Kontrol grubu bitkilerinde POD aktivitesi $179,54 \text{ EU.g}^{-1}\text{protein}$ olarak lrken, 150 mM NaCl uygulaması ise bu değeri %15,6'lık bir azalma ile $155,28 \text{ EU.g}^{-1}\text{protein}$ 'e kadar azaldığı görülmektedir (Tablo 4.7 ve Şekil 4.7). Benzer Şekilde kuraklık stresi uygulanan anason bitkilerinin toprak üstü kısımlarında POD aktivitesinde %14,8'lik gibi bir azalma sağlamış ve POD aktivitesi $156,35 \text{ EU.g}^{-1}\text{protein}$ olarak belirlenmiştir (Tablo 4.7 ve Şekil 4.7).

Tablo 4.7. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki POD aktivitesi

Gruplar	POD ($\text{EU.g}^{-1}\text{protein}$)
KOG	$179,54 \pm 0,33^a$
TUG	$155,28 \pm 0,39^b$
KUG	$156,35 \pm 0,21^b$

*Bir sütün içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $p < 0,05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.7. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki POD aktivitesi.

4.1.5. Antioksidan Aktivite Testleri

4.1.5.1 Metal Şelatlama Aktivitesi

Bitkisel ekstraktların metal şelatlama aktivitesinde azalan absorbans değeri ferrozinin bağlanmadan önce metal iyonlarının şelatlandığının bir belirtisidir. Şelatlanan metal iyonu miktarı aşağıda verilen eşitlik ile hesaplanır.

$$\% \text{ Şelatlama Kapasitesi} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Numune}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

Yukarıdaki eşitlikte A_{Kontrol} değeri ortamda sadece kompleks oluşturan maddeler olan ferrozinin ve Fe^{2+} iyonlarının varlığındaki kontrol numunesinin absorbans değeridir. A_{Numune} ise ekstraktların absorbans değerini ifade etmektedir.

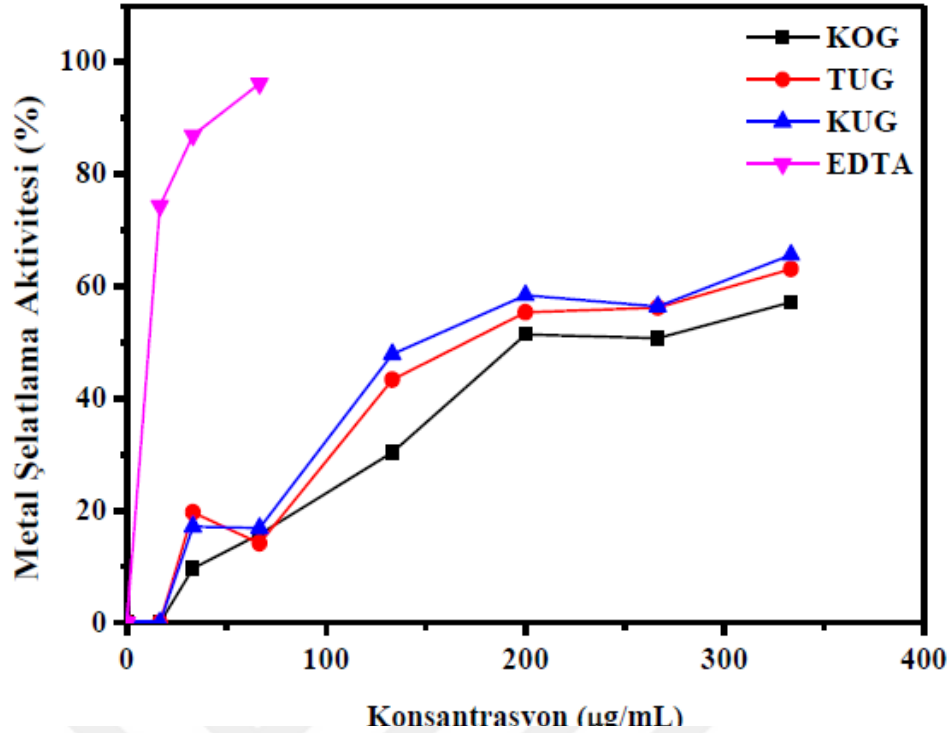
Bitki ekstraktların konsantrasyonları 50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde deney tüplerine konuldu. Toplam hacimleri metanol ile 3 mL'ye tamamlandı. Her bir numune 50 μL , 2 mM FeCl_2 ile 60 dakika inkübe edilip 200 μL , 5 mM ferrozinin eklendikten sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Demir iyonları ve ferrozinin oluşturduğu kompleksin 652 nm'de absorbansı değerlerine bakıldı.

Tablo 4.8. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki metal şelatlama kapasiteleri (%)

	16,6 $\mu\text{g/mL}$	33,3 $\mu\text{g/mL}$	66,6 $\mu\text{g/mL}$	133,3 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	266,6 $\mu\text{g/mL}$	333,3 $\mu\text{g/mL}$
KOG	TE	9,67 \pm 1,31 ^a	15,77 \pm 0,87 ^a	30,36 \pm 6,11 ^a	51,37 \pm 5,19 ^a	50,76 \pm 8,48 ^a	57,19 \pm 0,99 ^a
TUG	TE	19,64 \pm 3,56 ^a	14,16 \pm 0,89 ^a	43,36 \pm 3,72 ^a	55,37 \pm 2,26 ^a	56,19 \pm 9,32 ^a	63,10 \pm 3,52 ^b
KUG	TE	17,11 \pm 1,81 ^a	16,85 \pm 3,97 ^a	47,89 \pm 9,00 ^b	58,44 \pm 4,87 ^a	56,40 \pm 4,69 ^a	65,60 \pm 1,42 ^b
EDTA	74,40 \pm 6,40 ^b	86,98 \pm 11,91 ^b	96,19 \pm 1,03 ^b	TE	TE	TE	TE

Kısaltmalar TE: Test edilmedi; *Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $p < 0,05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

Tablo 4.8'de kontrol ile kıyaslandığında strese maruz kalan anasonda metal şelatlama kapasitesinin arttığı gözlenmiştir. Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde en yüksek şelatlama kapasitesinin olduğu belirlenmiştir. Tüm konsantrasyonlarda metal şelatlama kapasiteleri KUG>TUG>KOG olarak belirlenmiştir (Tablo 4.8 ve şekil 4.8).



Şekil 4.8. Strese maruz kalan anasonda % metal şelatlama kapasiteleri

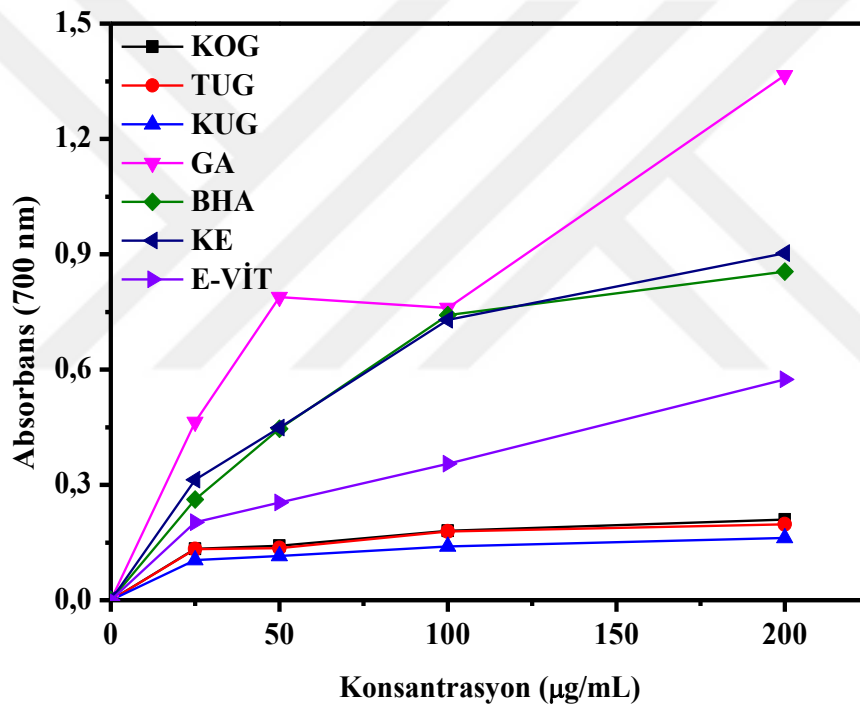
4.1.5.2. Toplam İndirgeme Kuvveti

Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan bitki ekstraktlarının (50-200 µg/mL) 1 mL'sine, 2,5 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH=6,6) ve 2,5 mL %1'lik $K_3Fe(CN)_6$ eklendi. Karışımlar 50 °C'de 20 dakika bekletildikten sonra 2,5 ml %10'luk TCA eklendi ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Sonra süpernatantlardan 2,5 ml alınarak eşit hacimde saf su ve 0,5 ml %0,1'lik $FeCl_3$ çözeltisi ile karıştırıldı. 700 nm'de absorbans değerleri okundu. Yüksek absorbans yüksek indirgeme gücünü göstermektedir. Kontrol ile kıyaslandığında strese maruz bırakılan anasonda indirme gücünün azaldığı belirlenmiştir (Tablo 4.9 ve şekil 4.9). Tüm konsantrasyonlarda toplam indirgeme kuvveti $KUG < TUG < KOG$ olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.9. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki toplam indirgeme kuvveti (700 nm absorbands)

	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
KOG	0,134 ± 0,01 ^a	0,141 ± 0,00 ^a	0,180 ± 0,01 ^a	0,209 ± 0,01 ^a
TUG	0,133 ± 0,00 ^a	0,135 ± 0,00 ^a	0,179 ± 0,00 ^a	0,197 ± 0,00 ^a
KUG	0,104 ± 0,01 ^a	0,115 ± 0,00 ^a	0,140 ± 0,00 ^a	0,162 ± 0,02 ^a
GA	0,464 ± 0,07 ^d	0,789 ± 0,05 ^d	0,760 ± 0,06 ^c	1,366 ± 0,45
BHA	0,262 ± 0,01 ^b	0,446 ± 0,01 ^c	0,742 ± 0,02 ^c	0,855 ± 0,02 ^b
KE	0,314 ± 0,01 ^c	0,449 ± 0,03 ^c	0,729 ± 0,03 ^c	0,902 ± 0,05 ^b
E-VİT.	0,203 ± 0,01 ^b	0,254 ± 0,01 ^b	0,355 ± 0,06 ^b	0,574 ± 0,08 ^a

*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $p < 0,05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.9. Strese maruz kalan anasonda Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeme kapasitesi

4.1.5.3. DPPH Giderme Aktivitesi

Farklı konsantrasyonlarda (0,05-1 mg/ml) hazırlanan bitki ekstratlarından (0,5 ml) alınarak litresinde 6×10^{-5} mol olacak şekilde hazırlanan DPPH radikali solüsyonundan 2,5 ml eklendi. Bu karışım güçlü bir şekilde karıştırılarak 60 dakika karanlıkta bekletildi ve 517 nm'de absorbands değerlerine bakıldı.

Her bir numuneye ait ekstrelerin serbest radikal giderici etkileri DPPH radikali üzerinden tayin edildi. Serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplandı.

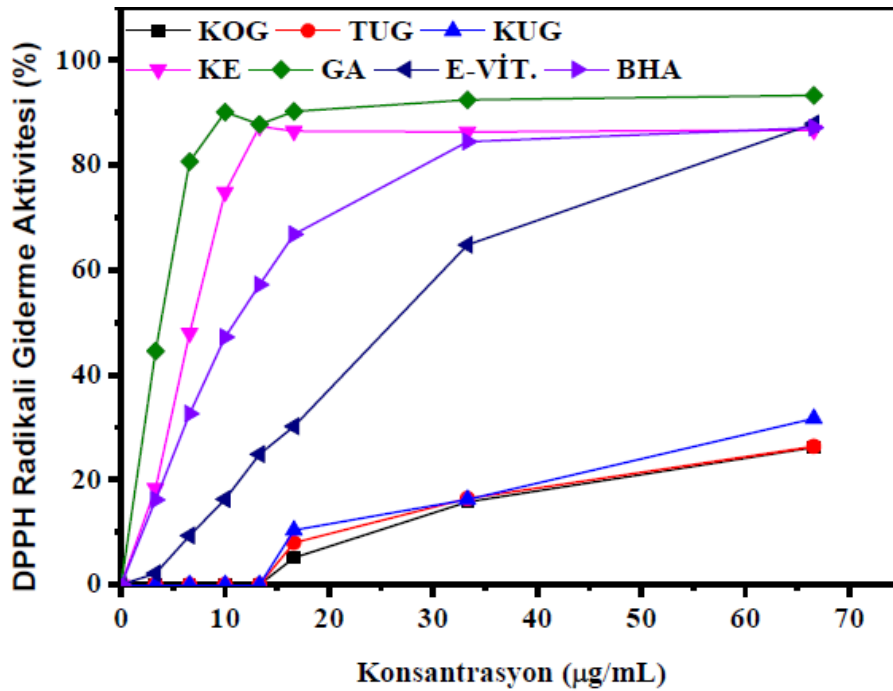
$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Numune}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

Bu eşitlikte A_{Kontrol} , DPPH radikalinin absorbans değeridir. A_{Numune} ise bitki ekstresinin absorbansıdır. Çalışmamızda hem kuraklık hem de tuzluluk kontrole göre DPPH giderme aktivitesini artırmıştır (Tablo 4.10 ve şekil 4.10). Buna göre genel olarak en yüksek DPPH aktivitesi TUG>KUG>KOG olarak sıralanmıştır.

Tablo 4.10. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki % DPPH giderme aktivitesi

	3,3 µg/mL	6,6 µg/mL	10 µg/mL	13,3 µg/mL	16,6 µg/mL	33,3 µg/mL	66,6 µg/mL
KOG	TE	TE	TE	TE	5,13 ± 0,59 ^a	15,78 ± 0,43 ^a	26,12 ± 0,25 ^a
TUG	TE	TE	TE	TE	7,98 ± 0,47 ^a	16,44 ± 0,85 ^a	26,37 ± 0,71 ^a
KUG	TE	TE	TE	TE	10,35 ± 0,16 ^a	16,23 ± 1,39 ^a	31,68 ± 2,39 ^b
KE	18,34 ± 1,82 ^b	47,95 ± 9,18 ^c	74,82 ± 4,69 ^c	87,36 ± 0,82 ^c	86,42 ± 2,53 ^d	86,32 ± 1,77 ^c	86,62 ± 1,87 ^c
GA	44,49 ± 9,20 ^c	80,64 ± 1,39 ^d	90,07 ± 1,77 ^d	87,74 ± 6,61 ^c	90,24 ± 2,77 ^d	92,41 ± 1,13 ^d	93,23 ± 0,54 ^d
E.VİT.	2,17 ± 0,39 ^a	9,32 ± 1,37 ^a	16,31 ± 0,17 ^a	24,83 ± 1,28 ^a	30,20 ± 3,38 ^b	64,78 ± 0,80 ^b	87,88 ± 0,17 ^c
BHA	16,18 ± 2,26 ^b	32,58 ± 1,61 ^b	47,19 ± 0,73 ^b	57,15 ± 1,19 ^b	66,79 ± 2,22 ^c	84,42 ± 0,96 ^c	87,11 ± 0,28 ^c

*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $p < 0,05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.10. Strese maruz kalan anasonda % DPPH giderme aktivitesi

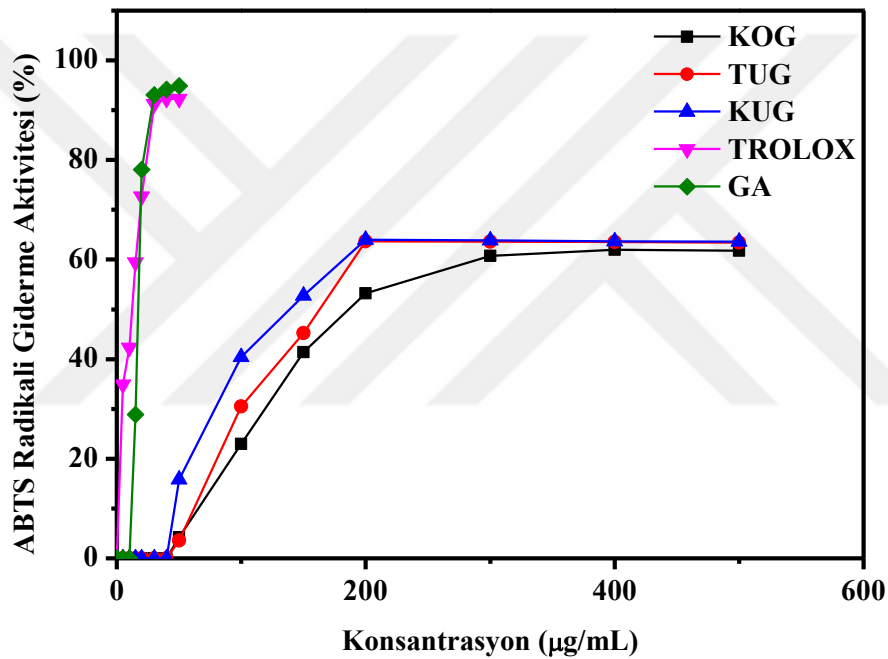
4.1.5.4. ABTS Katyon Radikali Giderme Aktiviteleri

ABTS radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre belirlendi. Öncelikle 2 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiye 2,45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisi eklenerek ABTS radikali elde edildi. Oluşturulan ABTS radikali çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbansı 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile $0,700 \pm 0,025$ nm'ye ayarlandı. Farklı konsantrasyonlardaki (100-400 µg/ml) ekstralarının stok çözeltisine (100µl) ABTS radikali çözeltisi (2,4 ml) ilave edildikten sonra 8 dakika inkübe edildi. Tampondan oluşan köre karşı 734 nm'de absorbansları kaydedildi. (Re ve ark., 1999).

Çalışmamızda hem kuraklık stresinin hem de tuzluluk stresinin ABTS radikalini giderme aktivitesini arttırdığı görülmektedir (Şekil 4.11). Her iki stresin de aynı oranlarda ABTS radikalini giderme aktivitesi gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.11. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki ABTS katyon radikali giderme aktiviteleri

	5 µg/mL	10 µg/mL	15 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	40 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	300 µg/mL	400 µg/mL	500 µg/mL
KOG	TE	TE	TE	TE	TE	TE	4,19 ±0,5 ^a	23,00 ±2,33 ^a	41,43 ±2,47 ^a	53,24 ±2,89 ^a	60,76 ±0,16 ^a	62,00 ±1,40 ^a	61,81 ±0,65 ^a
TUG	TE	TE	TE	TE	TE	TE	3,57 ±0,62 ^a	30,48 ±2,37 ^b	45,24 ±3,43 ^a	63,67 ±0,29 ^b	63,62 ±0,29 ^b	63,52 ±0,08 ^a	63,38 ±0,08 ^b
KUG	TE	TE	TE	TE	TE	TE	15,81 ±2,77 ^b	40,43 ±1,73 ^c	52,76 ±0,35 ^b	64,00 ±0,00 ^b	63,86 ±0,14 ^b	63,67 ±0,08 ^a	63,57 ±0,14 ^b
TROLOX	34,90 ±3,21	42,29 ± 3,22	59,48 ±3,63 ^b	72,67 ±5,15 ^a	91,24 ±0,21 ^a	92,29 ±0,14 ^a	92,29 ±0,14 ^c	TE	TE	TE	TE	TE	TE
GA	TE	TE	28,86 ±5,66 ^a	78,10 ±2,32 ^a	93,05 ±0,37 ^b	94,14 ±0,37 ^b	94,90 ±0,37 ^c	TE	TE	TE	TE	TE	TE



Şekil 4.11. Anason örnekleri ve antioksidan bileşiklerin ABTS katyon radikali giderme aktiviteleri

***EK₅₀ Değerlerinin Bulunması:** EK₅₀ radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonudur. EK₅₀ değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonu hazırlanıp absorbans ölçümleri yapıldı ve absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen yani absorbansı yarıya düşüren konsantrasyon miktarı EK₅₀ değerini vermektedir. EK₅₀ değeri µg/mL veya mM gibi birimlerle ifade edilmektedir.

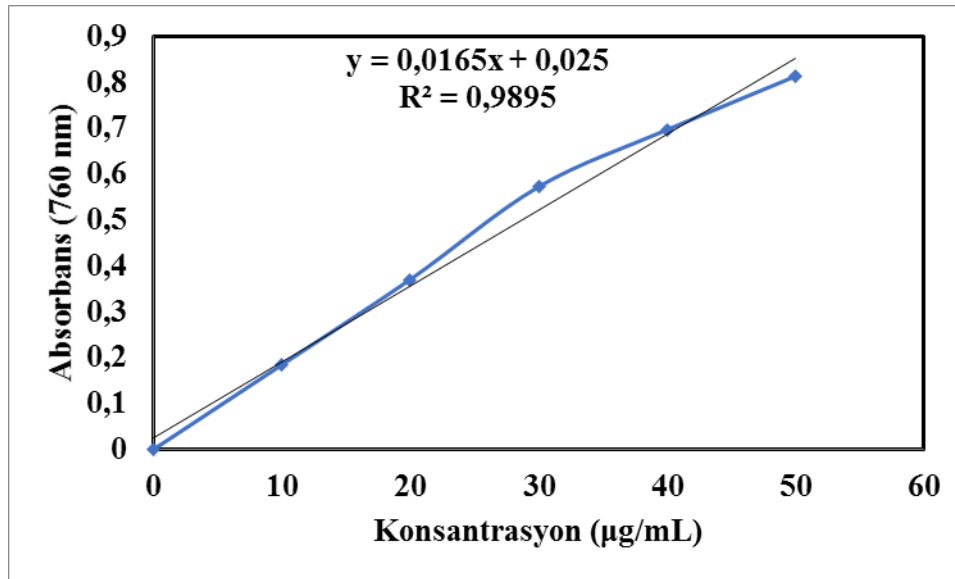
Tablo 4.12. Anason örnekleri ve antioksidan bileşiklerin etkili konsantrasyon (EK₅₀) değerleri

	EK ₅₀ (µg/mL)			
	DPPH	ABTS	İGA	MŞA
KOG	123,75 ± 0,29 ^f	301,12 ± 3,65 ^d	540,59 ± 61,42 ^b	257,25 ± 25,90 ^c
TUG	123,78 ± 3,98 ^f	275,79 ± 4,44 ^c	560,96 ± 41,75 ^b	224,77 ± 17,02 ^b
KUG	105,91 ± 8,63 ^e	251,43 ± 3,94 ^b	675,50 ± 100,20 ^c	214,63 ± 8,31 ^b
KE	7,32 ± 1,77 ^b	TE	80,33 ± 6,72 ^a	TE
GA	<0 ^a	18,41 ± 0,85 ^a	47,52 ± 10,30 ^a	TE
E-VİT.	33,48 ± 0,17 ^d	TE	163,94 ± 20,49 ^a	TE
BHA	19,64 ± 0,50 ^c	TE	85,36 ± 2,62 ^a	TE
TROLOX	TE	15,04 ± 1,16 ^a	TE	TE
EDTA	TE	TE	TE	17,65 ± 3,49 ^a

Kısaltmalar: TE: test edilmedi, DPPH: DPPH serbest radikal giderme aktivitesi; MŞA: metal iyonu şelatlama aktivitesi; İGA: indirgeme gücü aktivitesi; TE: Test edilmedi. EDTA (etilen diamin tetra asetik asit), GA (gallik asit), KE (Kersetin), E-VİT. (α -tokoferol), trolox, ve BHA (butilenmiş hidroksi anisol) referans antioksidan ajan olarak kullanılmıştır. Değerler üç bağımsız çalışmanın ortalaması ve ortalama standart sapma olarak olarak verilmiştir. Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel açıdan farklıdır ($p < 0,05$). Etkili konsantrasyon değeri DPPH veya ABTS testi için ortamda bulunan DPPH veya ABTS radikalini %50 oranında azaltan numune konsantrasyonunu; metal şelatlama gücü testi için ortamda bulunan ferröz iyonlarını %50 oranında şelatlayan numune konsantrasyonunu; indirgenme gücü aktivitesi ise 700 nm'de absorbans değerini 0,5'e düşüren numune konsantrasyonunu ifade etmektedir.

4.1.6. Toplam Fenol İçerikleri

Bitki ekstraktlarındaki farklı çözücü sistemlerine geçen çözünebilir total fenolik maddeler Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edildi. Standart grafiği gallik asit kullanılarak oluşturuldu. Bunun için, öncelikle bitki ekstraktlarından ve standarttan (gallik asit) 1 mg/ml konsantrasyonunda çözeltiler hazırlandı. Standartlar ve bitki ekstraktlarından 6 farklı konsantrasyonla çalışıldı. 0,5 mL'lik her bir ekstre/standart çözeltilisine sırasıyla; Folin-Ciocalteu reaktifinin solusyonundan 0,5 mL ilave edilerek 5 dakika boyunca vortekslendi. Karışıma 0,5 mL Na₂CO₃ (%2'lik) eklenerek 1 dakika vortekslendi. Son olarak 3,5 mL destile su eklenerek 25°C'de 90 dakika inkubasyona bırakıldı. Ayrıca numune ve standartın her bir konsantrasyonu için birer kör (Folin-Ciocalteu reaktifi ve Na₂CO₃ çözeltisi) ile çalışıldı. Süre sonunda 760 nm'de ölçümler yapıldı. Hesaplamalarda iki paralelin ortalaması alınıp kör değerleri bu ortalamadan çıkarıldıktan sonra elde edilen değerlerle grafik çizildi (Şekil 4.12). Total fenolik madde miktarı, mg ekstre başına mg gallik asit ekvivalenti (GAE) olarak ifade edildi. Hem kuraklık hem de tuzluluk toplam fenolik içeriğinde azalmalara neden olmuştur. Buna göre üç grup arasındaki toplam fenolik içerikleri KOG1>TUG>KUG olarak belirlenmiştir (Tablo 4.13).



Şekil 4.12. Gallik asit için kalibrasyon grafiği

Tablo 4.13. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki toplam fenol içerikleri (µg GAE/mg kuru ekstre)

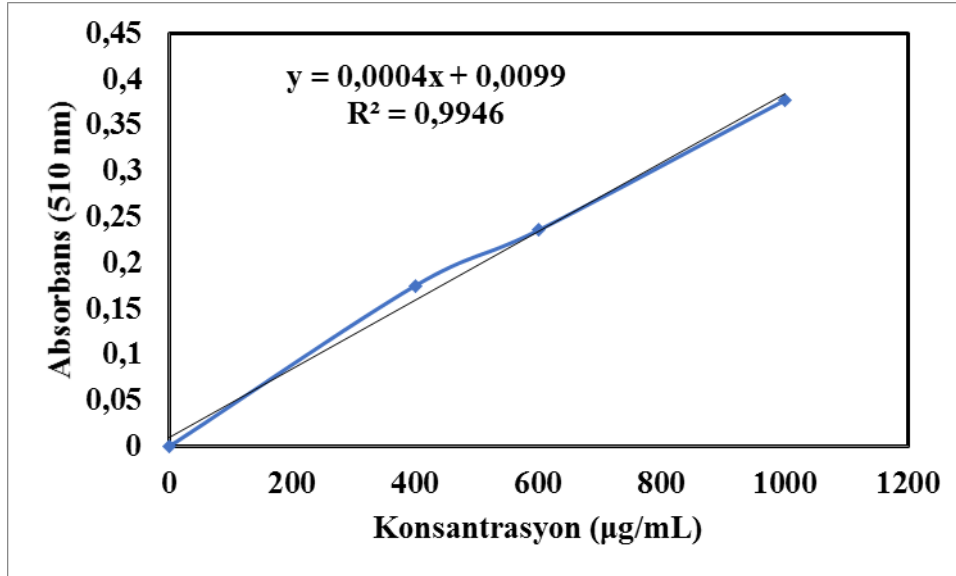
Numune	Toplam fenol içeriği (µg GAE/mg kuru ekstre)
KOG	139,79 ± 3,89 ^b
KUG	28,28 ± 3,05 ^a
TUG	21,81 ± 0,00 ^a

Anason örneklerindeki toplam fenol içeriği mg kuru ekstre içerisinde bulunan µg gallik asit ekvivalenti (GAE) olarak verilmiştir. Analiz sonuçları üç tekrarlı yapılarak ortalama + standart sapma olarak verildi. Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel açıdan $p < 0,05$ düzeyinde farklıdır.

4.1.7. Toplam Flavonoid Miktarı

Her bir bitki grubuna ait ekstraksiyon örneğinden 250 µL alınarak 1 mL saf su ile tamamlandı. 150 µL sodyum nitrit solusyonundan (%15'lik) eklenip 6 dakika sonrasında ise litresinde 100 gram olacak şekilde hazırlanan stok alüminyum klorür çözeltisinden 75 µL ilave edilerek hafifçe karıştırıldı. Dengeye gelmesi için 5 dakika kadar bir süre bekletildi. Üzerine litresinde 40 gram olarak önceden hazırlanmış olan stok NaOH çözeltisinden 1 mL eklendi. Sonra karışıma hızlıca 2,5 mL saaf su ekleyip iyi bir şekilde karıştırıldı ve 510 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri okundu. Standart olarak değişik konsantrasyonlarda hazırlanan kersetin için 415 nm'de kantitatif kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 4.13). Anason ekstrelerindeki total flavonoid miktarı kalibrasyon grafiğine göre kersetin eşdeğeri (KE) olarak ifade edilmiştir (Tablo 4.14).

Çalışmamızda total flavonoid içeriklerinde kontrole göre hem tuz hem de kuraklık stresi uygulamalarında önemli bir değişiklik meydana gelmemiştir (Tablo 4.14).



Şekil 4.13. Kersetin için kalibrasyon grafiği

Tablo 4.14. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki toplam flavonoid içerikleri (µg KE/mg kuru ekstre)

Numune	Toplam flavonoid içeriği (µg KE /mg kuru ekstre)
KOG	930 ± 77,33 ^a
KUG	962,81 ± 75,13 ^a
TUG	986,25 ± 24,30 ^a

Anason örneklerindeki toplam flavonoid içeriği mg kuru ekstre içerisindeki µg kersetin ekivalenti (KE) olarak verilmiştir. Analiz sonuçları üç tekrarlı yapılarak ortalama + standart sapma olarak verildi. Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel açıdan $p < 0,05$ düzeyinde farklıdır.

4.1.8. Antosiyanin İçeriği

Çalışmamızda anason bitkisinin kuraklık stresine maruz bırakılması ile antosiyanin miktarının yaklaşık %400 oranında arttığı belirlenmiştir. Ancak tuzluluk stresi uygulamasında ise antosiyanin miktarının kontrol grubu ile kıyaslandığında %50 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki toplam antosiyanin içerikleri ($\mu\text{g SGE}/\text{mg}$ ekstre)

Numune	Toplam antosiyanin içeriği ($\mu\text{g SGE}/\text{mg}$ ekstre)
KOG	$61,98 \pm 10,43^b$
KUG	$225,23 \pm 10,91^c$
TUG	$33,13 \pm 2,44^a$

Anason örneklerindeki toplam antosiyanin içeriği ise mg kuru ekstre içerisinde μg siyanidin-3-glikozit ekivalenti (SGE) olarak verilmiştir. Analiz sonuçları üç tekrarlı yapılarak ortalama + standart sapma olarak verildi. Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel açıdan $p < 0,05$ düzeyinde farklıdır.

4.1.9. Uçucu Yağ Bileşenleri

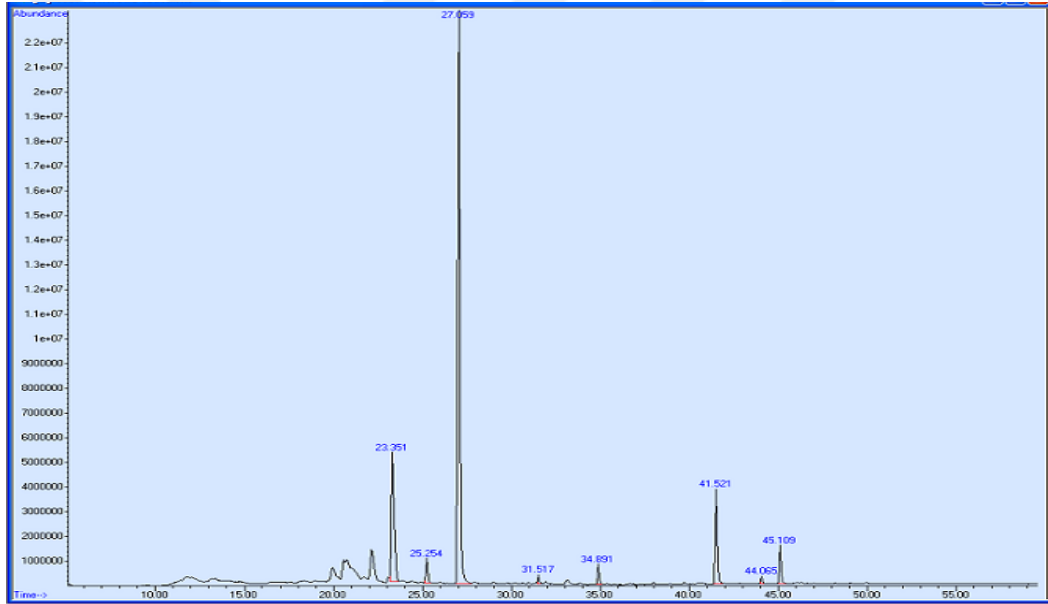
Anasonda uçucu yağ bileşenleri tuz ve kuraklık stresi uygulamalarına göre farklılıklar göstermiştir. Buna göre bileşenlerin sentez miktarı bu uygulamalara göre değişiklik göstermiştir. Aynı zamanda kontrol bitkilerinde sentezlenmeyen bazı bileşenlerin sentezlenmesine ya da kontrol bitkilerinde olan bazı bileşenlerin uygulamalarla birlikte sentezlenmemesine neden olmuştur (Tablo 4.16). Anasonun ana bileşenlerinden biri olan anetol, tuz ve kuraklık stresi uygulamasında artış göstermiştir. Anetol miktarı kontrole göre tuz ve kuraklık uygulanmış bitkiler de sırasıyla %14,2 ve %8,4 oranlarında artmıştır.

Metil Kavikol (Estragol) miktarı tuz uygulamasında pek değişmemiş ancak kuraklık uygulaması sonucu %49,8'lik gibi önemli miktarda azalma görülmüştür. Anisaldehyd bileşeni miktarının, tuz ve kuraklık uygulamasında az miktarda arttığı görülmüştür. 4-Metoksi-2-Fenil 2-Metil butanoat bileşen miktarının tuz uygulamasından ziyade kuraklık uygulamasına göre daha fazla azaldığı tespit edilmiştir. 2,4-Dimetil-6-Allylfenol ile 2,4-Metoksyfenil-Metil Butanoat bileşenleri yalnızca tuz uygulamasında, Bizabolen ile Hekzametil Benzen bileşenleri ise sadece kuraklık uygulamasında tespit edilmiştir.

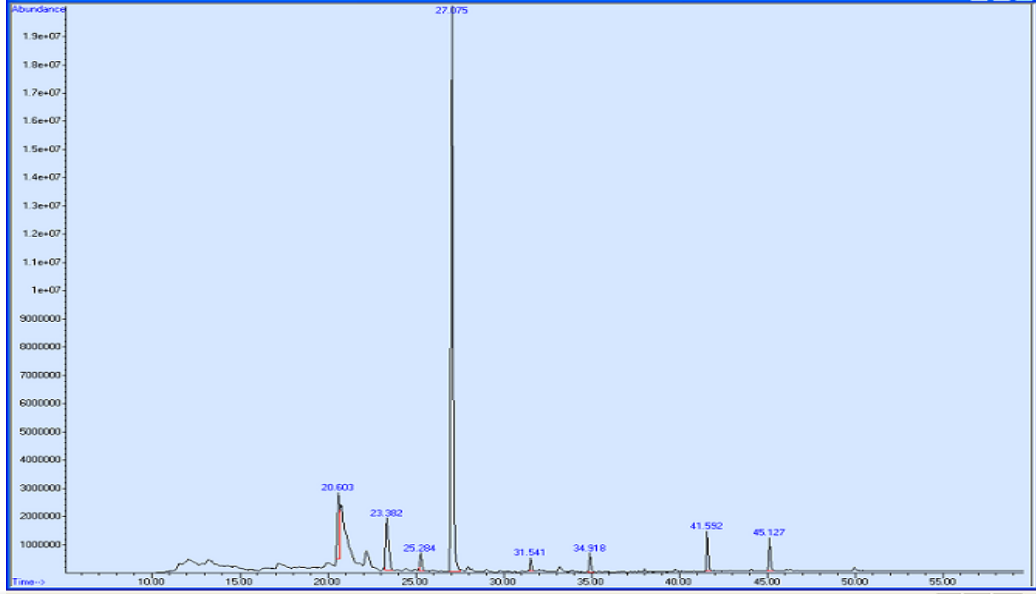
Tablo 4.16. Tuz ve kuraklık uygulanmış anason bitkisinin toprak üstü kısımlarındaki uçucu bileşenlerinin değişimi

Bileşikler	Alınma süresi (dk.)	Kontrol (%)	Tuzluluk (%)	Kuraklık (%)
Metil Kavikol	23.380	17.50	17.25	8.78
Anetol	27.076	66.78	76.27	72.40
Anisaldehyd	34.916	1.68	1.91	1.93
Heksandioik Asit	41.519	9.57	-	-
4-Dimetoksi-2- Fenil 2-Metil butanal	45.106	3.24	2.05	3.15
2,4-Dimetill-6-Allyfenol	31.545	-	0.84	-
2,4-Metoksi fenil- Metil butanal	41.599	-	1.88	-
Bisabolen	20.605	-	-	8.99
Hekzametil Benzen	31.540	-	-	1.24

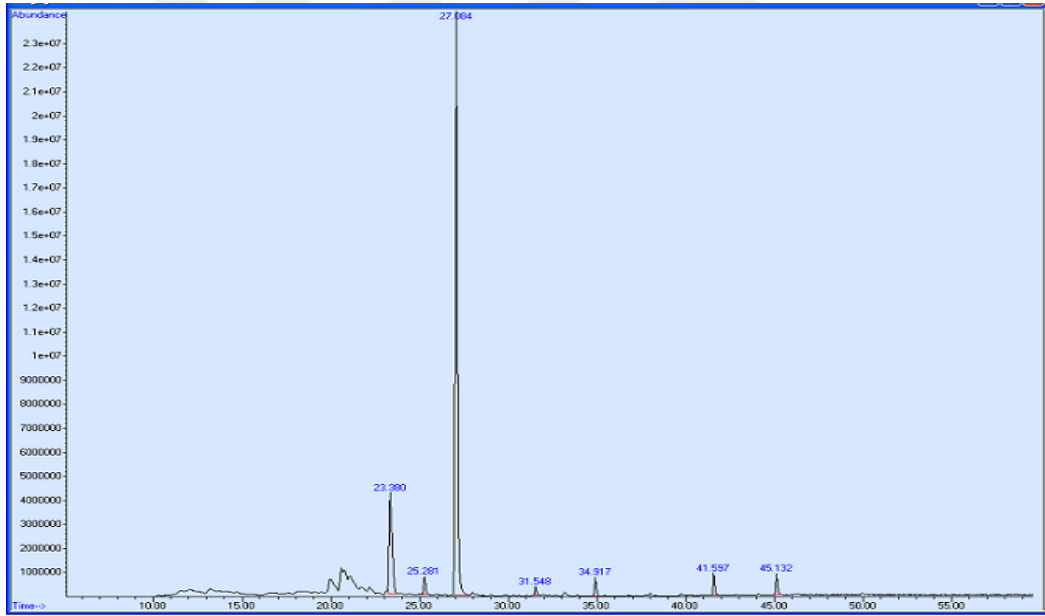
*Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $p < 0,05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.14. Kontrol grubu anasonun uçucu bileşenlerinin GC-MS kromatografik görüntüsü



Şekil 4.15. Kuraklık stresine maruz bırakılan anasonun uçucu bileşenlerinin GC-MS kromatografik görüntüsü



Şekil 4.16. Tuzluluk stresine maruz bırakılan anasonun uçucu bileşenlerinin GC-MS kromatografik görüntüsü

4.2. Tartışma

Dünya nüfusunun artışına bağlı olarak gıda tüketiminde de artış görülmektedir. Buna bağlı olarak tarım alanlarındaki azalmayla birlikte çeşitli stres faktörlerinin de etkisiyle meydana gelen ürün kaybı, üretim-tüketim oranlarında bozulmaya yol açmaktadır. Bundan dolayı ya tarım alanlarının artırılması gerekmekte ya da ürün geliştirilmesine yönelik uygulamalar önem kazanmaktadır. Artan dünya nüfusunun 2050 yılının sonunda 9 milyar kişiye ulaşacağı tahmin edilmektedir. Meydana gelen iklim değişikliğinden dolayı 2050 yılı itibariyle tüm ekilebilir alanların yarısından fazlasında tuz konsantrasyonunda ciddi bir artış beklenmektedir (Mahajan ve Tuteja, 2005). Tuzluluk ve kuraklık da tarım alanlarının verimini tehdit eden iki temel stres faktörüdür. Bitkiler, olumsuz şartlara karşı hayatta kalmak için çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerle bu faktörlere karşı kendilerini koruma pozisyonuna geçer. Araştırmacılar, tarımsal alanlarda strese dayanıklı bitkiler geliştirerek bu durumun üstesinden gelmeyi hedeflemiştir (Bartels ve Sungar 2005; Liu et al. 2008; Diken 2008).

Bu tez çalışmasında materyal olarak anason (*Pimpinella anisum* L.) bitkisi kullanılmıştır. Tuz stresi, ortama 150 mM NaCl eklenmesiyle, kuraklık etkisi ise bitkilerin 5 gün susuz bırakılmasıyla oluşturulmuştur. Tuz ve kuraklık stresine maruz bırakılan anason bitkisinde oluşan oksidatif hasarın seviyesini belirlemek için reaktif oksijen türlerinden (ROT) hidrojen peroksit (H_2O_2) ile süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) miktarı, lipid peroksidasyon (malondialdehit, MDA) oranı, hücresel antioksidan enzimlerin (katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz) aktivitelerindeki değişim incelenmiştir. Ayrıca stres esnasında biyoaktif bileşenlerin değişimini belirlemek için de tüm bitki uçucu yağ bileşenleri, total fenolik, total flavanoid ve antosiyanin içerikleri incelenerek antioksidan aktivitesindeki değişimler araştırılmıştır. Kuraklık ve tuzluluk bitki büyüme-gelişmesini ve dünya üzerinde yayılışını sınırlayan en önemli çevresel faktörlerdir (Krasensky and Jonak, 2012). Bu iki strese karşı tolerans, bitkinin oksidatif hasarı elimine etmek için sahip olduğu genetik kapasiteye bağlıdır (Golldack et al., 2011). Bu yüzden antioksidan savunma sisteminin fizyolojik ve biyokimyasal bileşenlerinin tanımlanması bitkilerin strese tolerans yollarının anlaşılması için gereklidir (Vaseva et al., 2012).

Tuzlu topraklarda yetiştirilen bitkilerde, toprakta artan osmotik potansiyelden dolayı bitkinin suyu yeterince kullanamamasına neden olur. Toprakta biriken Na^+ ve Cl^- iyonlarının neden olduğu toksik etki ve iyon dengesindeki bozulmalar ürün kaybı

nedenlerindedir (Kalloo ve Bergh 1993). Araştırmalarda tuz olarak NaCl kullanıldığında bitkide Na^+ - K^+ dengesi değişmekte ve hücreye alınan Na^+ iyonu, hücrenin K^+ iyonu alımını azaltmaktadır (Kaya vd. 2002).

Çalışmamızda hem tuz hem de kuraklık etkisinde bırakılan anason bitkisinde H_2O_2 ve O_2^- miktarında stres faktörünün etkisine bağlı olarak değişim gözlenmiştir. Kontrol grubu bitkilerine oranla, 150 mM tuz stresine maruz bırakılmış anason bitkilerinde H_2O_2 miktarında %45'lik, O_2^- miktarında ise %51,8'lik gibi bir artış olduğu, kuraklık stresinde de H_2O_2 miktarında %231,5'lik, O_2^- miktarında ise %166,6'lık gibi önemli bir artış olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1, Tablo 4.2, şekil 4.1, şekil 4.2). Tuz stresi ve kuraklık bitkilerde reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı üretilmesine ve bunun sonucunda hücrelerde oksidatif hasarın oluşumuna neden olurlar (El-Baky et al. 2003). Stres faktörüne bağlı olarak hücre içine su alınımının azalması, stomaların açıklığının azalması, zarlardaki iyon dengesinin bozulması ve kloroplastlardaki elektron transfer zincirinin bundan etkilenmesi gibi metabolik süreçlerin sonucunda ROT üretimi artmaktadır (Bian and Jiang 2009). ROT'un üretimini artıran diğer bir neden de klorofil moleküllerinin fotooksidasyona uğrayarak yüksek seviyede eksite olmasıdır (Arora et al. 2002). Kuraklık ve tuz stresleri özellikle hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit anyonu (O_2^-) gibi ROT'ların birikiminin artmasından dolayı oluşan oksidatif stres ile kaçınılmaz olarak bağlantılıdır (Bian and Jiang 2009).

H_2O_2 ; bitkilerde özellikle peroksizom, mitokondri ve kloroplastlardaki metabolik etkinlikler sonucunda oluşan non-radikal bir oksidan üründür. H_2O_2 , bitkilerin abiyotik ve biyotik stres etmenleri ile hormon ve yerçekimi gibi uyarıcılara karşı yanıt olarak sentezlenen bir sinyal molekülü olarak da bilinmektedir (Dat et al. 1998; Apel and Hirt 2004; Gechev et al. 2006; Mittler 2006). Normal konsantrasyonlarda toksisitesi diğer oksijen bileşiklerine göre daha az olan H_2O_2 , ortamda Fe ve Cu gibi geçiş metallerinin varlığında O_2^- ile tepkimeye girerek biyolojik sistemlerdeki en tehlikeli serbest radikal olan hidroksilin (OH^\cdot) oluşumuna neden olmaktadır (Liochev and Fridovich 2007). Bu bileşiklerin hücrelerdeki birikimi, membran lipidlerinin peroksidasyonu ve enzim aktivitelerinin inaktivasyonu gibi pek çok yapısal ve fizyolojik hasara yol açtığı bilinmektedir (Gutteridge 1995; Eryılmaz 2007). Bitki stres derecesinin belirlenmesinde biyolojik bir işaret olarak kullanılan bu bileşiklerin düşük miktarları, bitki savunma sisteminin aktifleştirilmesine pozitif bir etki göstermekteyken, antioksidan enzim

aktivitelerinin yeterince aktifleştirilemediği veya yetersiz kaldığı durumlarda hücrede yüksek miktarlarda bulunduğu zaman dokularda oksidatif hasarlara, yani strese neden olmaktadır (Liu et al. 2010). Mevcut çalışmada, anason bitkisinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında H_2O_2 miktarının hem tuz hem de kuraklık etkisiyle arttığı tespit edilmiştir (Tablo 4.1 ve Şekil 4.1). Bu durum önceki çalışmalarla iyi bir uyum göstermektedir. Domates ve yabani yonca (alfalfa) gibi bitkiler ile yapılan çalışmalarda strese bağlı olarak H_2O_2 miktarında önemli derecede bir artış görülmüştür (Cho and Park 2000; Zhou et al. 2007; Huaifu et al. 2007; Li et al. 2008). Bakla bitkisi ile yapılan başka bir çalışmada da stres altında H_2O_2 içeriğinin önemli bir şekilde arttığı gözlenmiştir (Myrene and Devaraj 2013). Görüldüğü gibi bizim çalışmamıza paralel olarak birçok çalışmada stresin bitkide içsel H_2O_2 seviyesini artırdığı belirlenmiştir. Bu artış bitkide birçok fizyolojik ve metabolik işlevlerin bozulmasına yol açar ve dolayısıyla stres esnasında bitkiye zarar veren mekanizmalardan birisidir. Çalışmamızın sonuçları literatürdeki tüm bu çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir.

$O_2^{\cdot-}$, stres şartlarında içsel seviyesi artan ve hücrelerde önemli hasarlara neden olan bir radikaldir. Bu radikalın lipid peroksidasyonu, membran hasarı, hücresel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırılmalarına sebep olduğu belirtilmiştir (Fridovich 1995; Desikan et al. 2005; Asada 2006). Mevcut çalışmamızda kontrol ile karşılaştırıldığında hem tuz hem de kuraklık içsel $O_2^{\cdot-}$ miktarını artırmıştır (Tablo 4.2 ve Şekil 4.2.). Daha önce yapılan çalışmalarda; domates, medikago, çeltik, bakla ve salatalık bitkilerinin strese maruz kalmasıyla $O_2^{\cdot-}$ miktarının arttığı rapor edilmiştir (Cargnelutti et al. 2006; Zhou et al. 2007, 2008; Chen et al. 2012; Myrene and Devaraj 2013). Stres şartlarında artan $O_2^{\cdot-}$ miktarı özellikle membran hasarlarına neden olmaktadır. Hücre zarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyon vererek peroksidasyon ürünlerinin oluşmasına neden olmakta ve bunun sonucunda zar geçirgenliği ve özellikleri bozulmaktadır. Membran hasarının olup olmadığını belirlemenin en önemli göstergelerinden bir tanesi de zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinin yıkımı olan lipid peroksidasyonudur.

Lipid peroksidasyonu (LPO) doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımıdır. LPO miktarının artması zar viskozitesini de etkileyeceğinden zarlarda elektrolit sızıntısı oranında da değişimler meydana gelmektedir. LPO, hücresel düzeyde stresin sebep olduğu hasarın hem derecesi hem de yansıması olduğu bilinmektedir (Neto et al. 2006).

Bitkiler strese maruz kaldıklarında, doymamış yağ asitlerinin bozulmasıyla son ürün olarak oluşan malondialdehit (MDA) miktarındaki artış, hücrelerde zarların yapısal bütünlüğünün bozulduğunu gösteren iyi bir indikatördür (Posmyk et al. 2005). LPO hücre için çok tehlikelidir. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Bundan dolayıdır ki LPO ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkuş 1995).

Çalışmamızda hem tuz hem de kuraklık stresine maruz bırakılan anason bitkisinde MDA seviyesinde stres faktörünün etkisine bağlı olarak değişim gözlenmiştir. Kontrol grubu bitkilerine oranla, 150 mM tuz stresine maruz bırakılmış anason bitkilerinde MDA seviyesinde %34'lük gibi bir artış, kuraklık stresinde de %191 gibi önemli bir artış olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.3 ve şekil 4.3). Literatürde kuraklık stresiyile MDA seviyesinin arttığı ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Shi et al. 2007; Li et al. 2008; Zhao et al. 2008; Arasimowicz-Jelonek et al. 2009). Bu bağlamda, mısır ve hıyarda yürütülen çalışmalarda kuraklık stresinin neden olduğu en karakteristik değişikliğin MDA seviyesindeki artış olduğu bulunmuştur (Chen et al. 2000; Hodges et al. 1999; Shalata et al. 2001; Munne-Bosch and Penueles 2003; Ben-Amor et al. 2006). Doğan (2004) tarafından yapılan bir çalışmada 28 gün boyunca tuz stresine maruz bırakılan domatesin yapraklarında MDA seviyesinin 14 gün sonunda artmaya başladığını, stresin şiddetlendiği 28 günün sonunda MDA seviyesinin çok daha arttığını rapor etmiştir. Kuraklık ve tuz streslerine bağlı olarak anason membranlarında oluşan MDA içeriğindeki artış oksidatif hasarın bir sonucu olduğunun belirtisidir. Stres uygulamalarıyla MDA seviyesinde görülen artma, bir ya da daha fazla mekanizmayla membranların hasarının göstergesidir. Kuraklık ve tuz streslerinin MDA üzerinde etkili olduğu, hücre hasarının artması sonucu MDA miktarının arttığı söylenebilir.

Antioksidan enzimler olumsuz çevresel faktörler nedeniyle ROT'ların bitki hücrelerinde ortaya çıkışındaki artışa bağlı olarak aktive olabilmekte ve bu durum bitkinin değişen çevre şartlarına uyum sağlamasına yardımcı olmaktadır. Bundan dolayı kuraklık ve tuzluluğa karşı anasonun antioksidan enzim aktivitelerini artırması toksisiteye karşı tolerans sağlamada önemli bir gösterge olabilir. ROT, normal metabolizma sonucunda hücrelerde meydana gelmekle birlikte, bitki strese maruz kalınca üretimi ve birikimi artmaktadır. Gerek normal şartlarda gerekse stres şartları altında ROS miktarını kontrol etmek ve hücreleri ROS' un olumsuz etkilerinden korumak için bitkiler hem enzimatik

hem de enzimatik olmayan bileşenlerden oluşan antioksidan savunma sistemine sahiptirler. Başlıca antioksidan enzimlerden olan SOD, CAT ve POD aktivitelerinin birbirlerine göre dengede bulunması; hücrelerdeki O_2^- ve H_2O_2 'nin kararlı düzeylerde tutularak zararlı etkilerinin önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Halliwell 2006; Eryılmaz 2007). Antioksidan enzimler, antioksidan savunma sistemindeki önemli serbest elektron süpürücüleridir. Hücre içinde artan süperoksit radikallerinin H_2O_2 'ye dönüşümünü katalizleyen enzim SOD enzimidir. Yüksek seviyede toksik olan H_2O_2 'nin hücreden uzaklaştırılması katalaz ve peroksidaz enzimleri aracılığıyla gerçekleştirilir. Katalaz, H_2O_2 'nin su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizlerken, peroksidaz enzimi ise bu işlevi, fenolik birleşikler veya antioksidanlar gibi substratların oksidasyonu ile gerçekleştirir (Pan et al. 2006).

Çalışmamızda hem tuz hem de kuraklık etkisinde bırakılan anason bitkisinde SOD enzim aktivitelerinde stres faktörünün etkisine bağlı olarak değişim gözlenmiştir. Kontrol grubu bitkilerine oranla, 150 mM tuz stresine maruz bırakılmış anason bitkilerinde SOD aktivitesinde %138 gibi bir düşüş, kuraklık stresinde de %699 gibi çok önemli bir düşüş olduğu belirlenmiştir. Kalefetoğlu (2006) farklı buğday çeşitlerine uyguladığı kuraklık stresinde kısa süreli uygulamada SOD miktarında artış, uzun vadede ise düşüş tespit etmiştir. Diken (2008) de arpa bitkisine uyguladığı tuz ve kuraklık stresi uygulamış, yüksek konsantrasyonlu NaCl uygulamasında da uzun vadeli kuraklık stresinde de SOD miktarında düşüş olduğunu tespit etmiştir. Kuraklığın erken dönemlerinde SOD aktivitesindeki artış bitkiyi, oksidatif hasardan koruyabilmektedir. Ancak kuraklık süresinin artmasıyla birlikte SOD aktivitesinde görülen azalma, şiddetli kuraklığın SOD aktivitesini kısıtladığını göstermektedir (Fu and Huang, 2001). Yaptığımız çalışmanın sonucu literatürdeki açıklamalarla uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda hem tuz hem de kuraklık etkisinde bırakılan anason bitkisinde peroksidaz (POD) enzim aktivitelerinde stres faktörünün etkisine bağlı olarak değişim gözlenmiştir. Kontrol grubu bitkilerine oranla, 150 mM tuz stresine maruz bırakılmış anason bitkilerinde POD aktivitesinde %15,6'lık bir düşüş, kuraklık stresinde de %14,8'lik bir düşüş olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda hem tuz hem de kuraklık etkisinde bırakılan anason bitkisinde katalaz (CAT) enzim aktivitelerinde stres faktörünün etkisine bağlı olarak değişim gözlenmiştir. Kontrol grubu bitkilerine oranla, 150 mM tuz stresine maruz bırakılmış anason

bitkilerinde CAT aktivitesinde %11'lik bir artış, kuraklık stresinde de %6,5'lik bir artış olduğu belirlenmiştir. Katalaz enzimi (CAT), hidrojen peroksitin, su ve oksijene kadar parçalanmasını sağlayan bir antioksidatif enzimdir. Katalaz enzim ile ilgili araştırmacıların yaptığı çalışmalarda genel olarak strese maruz kalan çeşitlerin CAT enzim aktivitelerinde artış gözlenmiştir. Yaşar (2003), patlıcan genotiplerinde yapmış olduğu çalışmada tuza toleransı yüksek çeşitlerde CAT aktivitesinin duyarlı çeşitlere göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Rahnama ve arkadaşları (2003), 4 farklı patates bitkisinde yapmış oldukları çalışmada farklı dozlardaki tuz stresi uygulamalarının CAT enzim aktivitesinde artışa neden olduğunu belirlemişlerdir. Azevedo Neto ve arkadaşları (2006), mısır genotiplerinin yapraklarında tuza hoşgörülü çeşitlerin CAT enzim aktivitesinde değişiklik olmadığı, tuza duyarlı türlerde ise CAT enzim aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmanın sonucu literatürdeki açıklamalarla uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada tuz ve kuraklık stresine sokulan anason bitkisinin DPPH radikal süpürücü aktivitesi, toplam fenolik bileşik miktarı, toplam flavonoid madde miktarı, ABTS katyon radikali giderme aktiviteleri, antosiyanin içeriği, toplami indirgeme kuvveti ve metal şelatlama ayrı ayrı belirlendi. Bu yöntemlerde yüksek antioksidan aktiviteye sahip BHA, gallik asit, kersetin, α -tokoferol ve Troloks standart maddeleri kullanıldı ve bu yöntemlerden elde edilen sonuçlar birbirleriyle karşılaştırıldı.

Strese sokulan bitki örneklerinin toplam fenol içeriğinde azalma olduğu görülmüştür. Buna göre üç grup arasındaki toplam fenolik içerikleri KOG>TUG>KUG olarak belirlenmiştir (Tablo 4.13). Yapılan bir çalışmada bitkilerin fenol içerikleri ışık, hasat zamanı iklimsel koşullar depolama koşulları ve tarımsal işlemler gibi faktörlerin bitkilerdeki fenol içeriğini değiştirdiğini, bunun yanında farklı çözücü grupları ile ekstraksiyon ve farklı ekstraksiyon teknikleri de bitkilerin toplam fenol içeriğinin değişmesine neden olmaktadır. (Heimler et al. 2007). Can ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ise, toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivite doğru orantı olduğunu yayınlamışlardır (Can ve ark. 2005).

Strese sokulan bitki örneklerinin toplam flavonoid içeriğinde önemli sayılmayacak derecede bir artışın olduğu gözlenmemiştir (Tablo 4.14).

Anason bitkilerinin DPPH radikali süpürme aktivitesi değerlendirildiğinde genel olarak artış gözlenmiştir. Çalışmadaki bitki ekstraları sentetik antioksidanlardan daha düşük DPPH giderme aktivitesi gösterdi. Buna göre genel olarak en yüksek DPPH aktivitesi TUG>KUG>KOG olarak sıralanmıştır (Tablo 4.10 ve şekil 4.10). DPPH aktivitesindeki artış strese sokulan anason bitkilerinde antioksidan kapasitenin arttığını göstermektedir.

Bitki ekstralarının Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} indirgemeleri test edilmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında strese maruz bırakılan anasonda indirgeme gücünün azaldığı belirlenmiştir (Tablo 4.9 ve şekil 4.9). Tüm konsantrasyonlarda toplam indirgeme kuvveti KUG>TUG>KOG olarak belirlenmiştir. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi o bileşiğin potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesidir (Meir et al. 1995). Bitki ekstralarında artan konsantrasyona paralel olarak indirgeme gücünün de arttığı görüldü.

Bitki ekstralarının metal şelatlama aktivitesi incelendiğinde Tablo 4.8'de kontrol ile kıyaslandığında strese maruz kalan anasonda metal şelatlama kapasitesinin arttığı gözlenmiştir. Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde en yüksek şelatlama kapasitesinin olduğu belirlenmiştir. Tüm konsantrasyonlarda metal şelatlama kapasiteleri KUG>TUG>KOG olarak belirlenmiştir (Tablo 4.8 ve şekil 4.8). Metal şelatlamadaki artmaya paralel olarak antioksidan kapasitenin de arttığı söylenebilir.

ABTS radikali giderme aktivitesi sentetik antioksidan olan trolox ile mukayese edilerek değerlendirildi. Çalışmamızda hem kuraklık stresinin hem de tuzluluk stresinin ABTS radikalini giderme aktivitesini arttırdığı görülmektedir (Şekil 4.11). Her iki stresin de aynı oranlarda ABTS radikalini giderme aktivitesi gösterdiği sonucuna varılmıştır. ABTS radikali giderme aktivitesindeki artış, strese sokulan bitkilerdeki antioksidan kapasitenin de arttığını göstermektedir.

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de aromatik bitkiler ve bu bitkilerden elde edilen esansiyel yağlar çok eski yıllardan bu yana halk tarafından hastalıkların tedavisi amacıyla ve gıda ürünlerinde koruyucu ve lezzet verici olarak kullanılmaktadır. Sentetik katkı maddelerinin sağlık üzerinde birçok yan etkilerinin ortaya konulmuştur. Mikroorganizmalar da bu sentetik maddelere karşı zamanla direnç kazanmaktadır. Bu sebepler tıbbi ve aromatik bitkilerin ve bunlardan elde edilen esansiyel yağların ve ekstraktların kullanımını tekrar ön plana çıkarmış ve bu ürünlerin gıdalarda, hayvan

yemlerinde ve organik tarım uygulamalarında kullanımının geliştirilmesiyle ilgili çalışmaları hızlandırmıştır. Bitki uçucu yağlarının antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidatif ve antimutajenik etkilerine yönelik elde edilen araştırma sonuçları genel olarak olumlu yöndedir. Bu nedenle bitkisel uçucu yağ ve ekstrakt kullanımının etkili çözüm yollarından biri olabileceği kabul edilmektedir. Bitki uçucu yağlarının çoğunda mutajenik etki görülmemiştir. Bu yağların birçok sentetik katkı maddesinin yerine kullanılabilir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Beyaz 2013).

Pek çok araştırmacı da tıbbi bitkilerin ve bazı bitkilerin uçucu yağlarının gıda koruyucusu olarak kullanılabilirliğini tavsiye etmektedir. Kullanılacak uçucu yağın güvenliği ve toksisitesinden emin olunmalıdır. Uçucu yağların direkt kullanımlarıyla çeşitli maddelere ekstrakte edilerek kullanılmaları antimikrobiyel etkinliğin belirlenmesinde farklı sonuçlar vermesi nedeniyle koruyucu ajan olarak kullanımında bu durum göz önünde bulundurulmalıdır. Uçucu yağların ortamdaki diğer maddelerle etkileşmelerinden dolayı invitro çalışmalardan elde edilen etkinlik değerleri, gıda maddelerinde uçucu yağların kullanım oranlarını tam yansıtmayacağından gıda maddelerinde direkt kullanımını sınırlamaktadır (Evren ve Tekgüler 2011).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Olumsuz şartlarda hücrede biriken reaktif oksijen türlerinden H_2O_2 ve O_2^- hem kuraklık hem tuzluluk streslerinin uygulanmasıyla miktarları artmıştır. Stres esnasında miktarları artan bu bileşiklerin oranlarının azaltılması ile ilgili çalışmalar yapılarak anasonun strese dayanıklılığı artırılabilir.

Hem biyotik hem de abiyotik streslerde miktarı genelde artan ve stresin meydana getirdiği hasarın önemli bir ölçütü olarak kullanılan lipid peroksidasyon (LPO) seviyesi hem kuraklık hem tuzluluk streslerinin uygulamasıyla artmıştır. Membran hasarının azaltılması, anasonun olumsuz şartlara dayanıklılığını artıracaktır.

SOD, CAT ve POD antioksidan enzimlerinin aktivitesi her iki stres esnasında değişmiştir. SOD ve POD enzimlerinin aktivilerinin azalması aşırı substrat birikiminden ve stresin derecesinin yüksekliğinden kaynaklanabilir. CAT enzim aktivitesinin artması tek başına H_2O_2 miktarını düşürememiştir.

SOD aktivitesi düşük olduğundan O_2^- bertaraf edilememiş ve bunun sonucunda da membranda hasar (yüksek lipid peroksidasyon) meydana gelmiştir. Stres uygulamaları ile anasonda total protein artmıştır. Bu durum anasonda strese bir cevap mekanizmasının başladığını ancak stresin seviyesinin yüksek olması bu cevabın yetersiz olduğunu göstermektedir.

Anasonda stres uygulaması ile uçucu bileşenlerin oranı değişmiş, yeni bileşikler sentezlenmiş ve bazı bileşiklerde stres esnasında üretilmemiştir. Anasonun en önemli bileşiği olan anetol hem tuz hem de kuraklık uygulaması ile miktarı artmıştır. Bu durum anetol için anason yetiştiriciliği yapılacaksa öldürücü olmayan stres şartlarında daha fazla anetol elde edilebileceğini göstermiştir.

Stres şartlarında anasonda metal şelatlama kapasitesi, ABTS radikali giderme aktivitesi ve DPPH radikali süpürme aktivitesi artmıştır. Ancak total fenolik bileşiklerin miktarı ile indirgeme gücü aktivitesi azalmış total flavonoid miktarı ise değişmemiştir. Bu veriler strese sokulan anasonda antioksidan kapasitenin arttığını göstermektedir.



KAYNAKLAR

Acimovic M, Oljaca S, Tesevic V, Todosijevic M, Djislov J (2015) Compositional characteristics of the essential oil of *pimpinella anisum* and *foeniculum vulgare* grown in serbia. *Botanica Serbica* 39(1): 09-14

Agarwal S, Pandey V (2004) Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in cassia angustifolia. *Biologia Plantarum* 48(4): 555-560

Akıcı MT (2016) Anason (*Pimpinella Anisum* L.) tohumunun uçucu yağı ve aroma bileşimi üzerine depolama süresinin etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Akkuş İ (1995) Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkiler. Mimoza Yayınları, Konya

Akowuah GA, Zhari I, Norhayati I, Sadikun A (2004) Radical scavenging activity of methanol leaf extracts of *Orthosiphon stamineus*. *Pharm. Biol* 42: 629–635

Albayrak S, Aksoy A, Sagdic O, Albayrak, S (2011) Antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of some medicinal herbs consumed as tea and spices in turkey. *Journal of Food Biochemistry* 36: 547-554

Al-Ismail KM, Aburjai T (2004) Antioxidant activity of water and alcohol extracts of chamomile flowers, anise seeds and dill seeds. *Journal of The Science Food and Agriculture* 84: 173-178

Ananieva EA, Alexieva VS, Popova LP (2002) Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *J. Plant Physiol* 159: 685-693

Angelini R, Manes F, Federico R (1990) Spatial and functional correlation between daimine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon deetilation and wounding in chick-pea. *Planta* 182: 89-96

Anjum SA, Xie X, Wang L, Saleem MF, Man C, Lei W (2011) Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stres. *African Journal of Agricultural Research* 6: 2026-2032

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol* (55): 373–399

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plant. *Current Science* 82(10): 1227-1238

Arslan N, Gürbüz B, Sarihan EO, Bayrak A, Gümüşçü A (2004) Variation in essential oil content and composition in turkish anise (*Pimpinella anisum* L.) populations. *Turkish Journal Agriculture And Forestry* 28: 173-177

Aşer HC (2000) Sustainable wild harvesting of medicinal and aromatic plants: an educational approach, harvesting on non-wood forest products, Seminar Proceedings, İzmir, Turkey

Azevedo Neto D, Dias A (2006) Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany* 56.1: 87-94

Azevedo Neto D, Prisco JT, En'eas-Filho J (2006) Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 56: 87–94

Bakır C (2010) Anason (*Pimpinella anisum*) ve rezene (*Foeniculum vulgare*)'de toplam fenol/flavonoid miktarları ve antioksidan aktivitelerinin metal içeriği ile değişiminin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

Baran A (2011) Bitkilerin tuz stresine toleransında salisilik asit ve prolinin fizyolojik rolünün araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Barlow EWR, Lee JW, Munns R, Smart MG (1980) Water relations of developing wheat grains. *Australian Journal of Plant Physiology* 7: 519–525

Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci* 24:23–58

Baydar H (2007) Tıbbi, Aromatik ve Keyif Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, Isparta s. 288

Ben-Amor N, Jimenez A, Megdiche W, Lundqvist M, Sevilla F, Abdel-ly C (2006) Response of antioxidant systems to nacl stres in the ha-lophyte cakile maritima, *physiologia plantarum* 126: 446-457

Belyurt SÇ (2014) Gaziantep yöresinde yetişen bazı makromantar türlerinin antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Besharati-Seidani A, Jabbari A, Yamini Y (2005) Headspace solvent microextraction: a very rapid method for identification of volatile components of iranian pimpinella anisum seed. *Analytica Chimica Acta* 530: 155-161

Beyaz M (2013) *Academic Food journal*. esansiyel yağlar: Antimikrobiyal, antioksidan ve antimutajenik aktiviteleri 12(3): 45-53

Bian S, Jiang Y (2009) Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery *Scientia Horticulturae* 120(2): 264-270

Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199–1200

Blum A (1986) Breeding Crop Varieties for Stress Environments. *Critical Reviews in Plant Sciences* 2: 199-237

Botella MA, Rosado A, Bressan RA, Hasegawa PM (2005) Plant adaptive responses to salinity stress, plant abiotic stress. Blackwell Publishing Ltd. s. 270

Bray E (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2: 48-54

Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* s. 158-1249

Britton G (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function 9: 1551-1558

Cabaroglu T, Yilmaztekin M (2011) Methanol and major volatile compounds of turkish raki and effect of distillate source. *Journal of The Institute of Brewing* 117(1): 98-105

Can A, Özçelik B, Güneş G (2005) Meyve sebzelerin antioksidan kapasiteleri. GAP IV. Tarım Kongresi, Şanlıurfa

Cargnelutti D, Tabaldi LA, Spanevello RM, Jucoski GO, Battisti V, Redin M, Linares CEB, Dressler VL, Flores MM, Nicoloso FT, Morsch VM, Schetinger MRC (2006) Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. *Chemosphere* 65: 999–1006

Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern, JC (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10(3): 178-182

Chen J, Yang ZM (2012) Mercury toxicity, molecular response and tolerance in higher plants. *Biometals* 25: 847–857

Chen LH, Boissonneault GA, Glauert HP (1988) Vitamin c, vitamin e and cancer (review). *Anticancer Research* 8: 739-748

Chen WP, Li PH, Chen THH (2000) Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in zea mays l. plant. *Cell environ* 23: 609-618

Cho UH, Park JO (2000) Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings, *Plant Sci* 156: 1–9

Çakmakçı S, Çelik I (2000) Gıda katkı maddeleri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ders notu, Erzurum s. 249

Çulha Ş (2011) Tuz stresinin aspir (*carthamus tinctorius* L.) çeşitlerindeki bazı fizyolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine etkisinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Çulha Ş, Çakırlar H (2011) Tuzluluğun bitkiler üzerine etkileri ve tuz tolerans mekanizmaları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, Afyon 11: 11-34

Dajic Z (2006) Salt stress. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*, ISBN-13 978-14020-4224-9, Dordrecht, The Netherlands s. 345

Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, Scott IM (1998) Paralel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol* 116: 1351-1357

De Marino S, Gala F, Borbone N, Zollo F, Vitalini S, Visioli F, Iorizzi M (2007) Phenolic glycosides from *Foeniculum vulgare* fruit and evaluation of antioxidative activity. *Phytochemistry* 68: 1805–1812

Diken ME (2009) Bazı şifalı bitkilerin antioksidan içerikleri, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Diken Ö (2008) Tuz ve kuraklık stresi etkisindeki arpa (*hordeum vulgare* l.) bitkisinde moleküler analizler. Yüksek lisans tezi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Dinis TCP, Maderia VMC, Almeida LM (1994) Action of phenolic derivates (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. Archives of Biochemistry and Biophysics 315: 161-169

Doğan G, Hayta Ş, Demirpolat A, Bağcı E (2015) Doğu anadolu’da yetişen bir anason türünün uçucu yağ analizi. Düzce Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Dergisi 3:236-240

Doğan M (2004) Domates (*Lycopersicon sp.*)’te tuz stresinin bazı fizyolojik parametreler ve antioksidant enzim aktiviteleri üzerindeki etkilerinin *in vivo* ve *in vitro* olarak incelenmesi. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı

Doğru A (2006) Kolza’nın bazı kışlık çeşitlerinde düşük sıcaklık toleransı ile ilgili fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerin araştırılması. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Dolferus R (2014) To grow or not to grow: A stressful decision for plants. Plant Science 2229: 247-261

Domingo C (2012) K-permeable transporter identified in a salt-tolerant rice cultivar through surveys of natural genetic polymorphism. The Plant Journal 71: 750-762

Elstner EF, Heupel A (1976) Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish. Planta 130: 175-180

El-baky A, Hanaa H, Amal AM, Hussein MM (2003) Influence of salinity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and electrophoretic patterns of protein and isoenzymes of some onion cultivars. Asian Journal of Plant Sciences 2(1724): 1220-1227

Erdoğan MK (2012) *Tanacetum balsamita L. subsp. balsamita* bitki ekstraktlarının biyolojik aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Erol Dayı Ö (2010) Hücre kültüründe oksidatif stres sonucu oluşan dna hasarları ve zeytinyağının koruyucu etkisi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Eryılmaz A, Srikant R (2007) Fair resource allocation in wireless networks using queue-length-based scheduling and congestion control. Transactions on Networking 15(6): 1333-1344

Esim N (2011) Nitrik oksitin mısırdaki (*zea mays*) düşük sıcaklık stresi toleransı üzerine etkisi. Doktora Tezi Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Evren M, Tekgüler B (2011) Elektronik mikrobiyoloji dergisi TR. Uçucu yağların antimikrobiyel özellikleri 9(3): 28-40

Fidan I, Şahin İ (1993) Alkol ve alkollü içkiler teknolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları s. 371

Frei B, Stocker R, England L, Ames BN (1990) Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Av Exp Med Biol* 264: 155-163

Fu J, Huang B (2001) Involment of antioxidants and lipid peroxidations in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 45: 105-114

Gate L, Paul J, Nguyen BG, Tew KD, Tapiero H (1999) Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomedical and Pharmacotherapy* 53: 169-180

Gechev TS, Van Breusegem, F, Stone JM, Denev I, Laloi C (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays* 28(11): 1091-1101

Geçibesler İH (2013) Bingöl ve çevresinde yetişen ve tıbbi değer taşıyan bazı bitki taksonlarının fitokimyasal ve biyolojik aktivitelerinin araştırılması. Doktora Tezi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

Golldack D, Lüking I, Yang O (2011) Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant cell reports* 30(8): 1383-1391

Gong Y, Toivonen PMA, Lau OL, Wiersma PA (2001) Antioxidant system level in 'Braeburn' apple in related to its browning disorder. *Bot. Bull. Acad. Sin* 42: 259-264

Gökpinar Ş, Koray T, Akçiçek E, Göksan T, Durmaz (2006) Algal antioksidanlar. *Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Dergisi* 23: 85-89

Gutteridge JM (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem* 41: 1819-1828

Gülçin İ, Oktay M, Kireççi E, Küfrevioğlu Öİ (2003) Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry* 83:371-382

Günay A (2005) Sebze Yetiştiriciliği. İzmir, Cilt I, ISBN 975-00725-0-2

Güneyli A, Karaçalı İ (2002) Effects of storage conditions on the quality of aniseed. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 39(3):17-24

Gürbüz DG (2008) Demir eksikliği anemisinde intravenöz demir tedavisinin total antioksidan kapasite üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi. Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Hale MG, Orcutt DM (1987) The physiology of plants under stress. John Wiley and Sons, New York s. 206

Halliwell B (2001) Food-derived antioxidants: How to evaluate their importance in food and in vivo. Handbook of Antioxidants, Los Angeles s. 690

Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? Journal of neurochemistry 97(6): 1634-1658

Halliwell B, Gutteridge JMC (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. An overview In, Methods in Enzymology 186: 1-85

Halliwell B, Gutteridge JMC (2003) Free radicals in biology and medicine, 3rd ed. Oxford University Press.

Haşimi N, Tolan V, Kızıl S, Kılınç E (2014) Anason (*pimpinella anisum* L.) ve kimyon (*cuminum cyminum* L.) tohumlarının uçucu yağ kompozisyonu ile antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi. Tarım Bilimleri Dergisi 20: 19-26

He YL, Liu YL, Cao WX, Huai MF, Xu BG, Huang BG (2005) Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in Kentucky bluegrass. Crop Sci 45: 988-995

Heimler D, Isolani L, Vignolini P, Tombelli S, Romani A (2007) Polyphenol Content and Antioxidative Activity in Some Species of Freshly Consumed Salads. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 1724-1729

Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds planta 207: 604-611

Hollman PCH, Katan MB (1999) Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. Food Chem Toxicology 37: 937-942

Huaifu F, Shirong G, Yansheng J, Runhuna Z, Juan L (2007) Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stres. *Front. Agric. China* (1):308-314

Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 53: 1841-1856

İbadova S (2006) Bazı *hypericum* türlerinin fenolik bileşimi ile antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkileri. Yüksek Lisans Tezi Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Jones HG, Jones MB (1989) Introduction: some terminology and common mechanisms, *Plants Under Stress*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-10

Kaçar B (2015) Genel Bitki Fizyolojisi, Nobel Akademik Yayıncılık, Yayın No: 1243, Ankara

Kalefetoğlu T, Ekmekçi Y (2005) The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, Ankara 18 (4): 723-740

Kalefetoğlu T (2006) Nohut (*Cicer arietinum* L.) çeşit ve hatlarının kuraklık stresine karşı dayanıklılığının karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Kaloo G, Bergh B.O (1993) Genetic improvement of vegetable crops, Pergamon Press. USA 0-08-040826-5

Kar Y (2008) Çörekotu (*nigella sativa* L.) tohumunun doğal antioksidan ve alternatif enerji kaynağı olarak incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Karakaya S, El SN (1997) Flavonoidler ve sağlık. *Beslenme ve Diyet Dergisi* 26(2): 54-60

Kaya Y (2008) Tohumlu Bitkiler. Erzurum

Kaya C, Higgs D, İkinci A (2002) An experiment to investigate ameliorative effects of potassium sulphate on salt and alkalinity stressed vegetable crops, *Journal of Plant Nutrition* 25(11): 2545-2558

Kayabaşı S (2011) Kuraklık stresinde yetiştirilen soyada (*Glycine max* L.) bazı fizyolojik parametreler ile prolin birikiminin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Keskin H, Erkmen G (1987) Besin Kimyası. Güryay Matbaacılık İstanbul 5: 25-35

Kılıç A (2008) Uçucu yağ elde etme yöntemleri. Bartın Orman Fakültesi Dergisi 10(13): 37-45

Kılıç S (2008) Küresel iklim değişikliği sürecinde su yönetimi. İstanbul Üniversitesi Siyasal Bilgiler Fakültesi Dergisi 39: 161-186

Kıralan M, Ercoşkun H, Işıksal S (2004) Gıda antioksidanları ve etki mekanizmaları. Akademik Gıda 2(7): 5-14

Koca N (2006) Havuçlarda (*Daucus carota* L.) karotenoidler ve antioksidan aktivite. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Kocaçalışkan İ (2004) Bitki Fizyolojisi, Kütahya

Krasensky J, Jonak C (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. Journal of Experimental Botany 63(4): 1593-1608

Larcher W (1995) Physiological plant ecology, published by springer. ISBN 0-387-09795-3, New York s. 506

Lee J, Spector D, Godon C, Labarre J, Toledano MB (1999) A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. Journal of Biological Chemistry 274(8): 4537-4544

Lewit J (1980) Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York (1)

Li QY, Niu HB, Yin J, Wang MB, Shao HB, Deng DZ, Chen XX, Ren JP, Li YC (2008) Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). Colloids and Surfaces B; Biointerfaces 65: 220-225

Liochev SI, Fridovich I (2007) The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ Formation. Free Radical Biology and Medicine 42(10): 1465-1469

Liu F, Stutzel H (2004) Biomass partitioning, specific leaf area and water use efficiency of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to drought stress. Scientia Horticulturae 102(1): 15-27

Liu X, Hua X, Guo J, Qi D, Wang L, Liu Z, Jin Z, Chen S, Liu G (2008) Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing VTE1 for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana*, *Biotechnol. Lett.* DOI 10.1007/s10529-008-9672-y

Liu Y, Jiang H, Zhao Z, An L (2010) Nitric oxide synthase like activity-dependent nitric oxide production protects against chilling induced oxidative damage in *Chorispora bungeana* suspension cultured cells. *Plant physiology and Biochemistry* 48: 936-944

Madhavi DL, Deshpande SS, Salunkhe DK (1996) *Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives*. Markel Dekker, New York s. 41-50

Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139-158

Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG (2000) *Biochemistry*. 3rd ed., Addison Wesley Longman, San Francisco 0-8053-3066-6

Mattila P, Hellström J (2007) Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 152-160

Mengü GP, Anaç S, Özçakal E (2011) Kuraklık yönetim stratejileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, İzmir 48(2): 175-181

Meir S, Kanner J, Akiri B, Hadas SP (1995) Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal Agricultural Food Chemistry* 43: 1813-1819

Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA (1996) Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters* 384: 240-242

Misharina TA (2001) Influence of the duration and conditions of storage on the composition of the essential oil from coriander seeds. *Applied Biochemistry and Microbiology* 37(6): 622-628

Mishra AK, Singh VP (2010) A review of drought concepts. *Journal of Hydrology* 391: 202–216

Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination, *Trends Plant Sci.* 11: 15-19

Munne-Bosch S, Penuelas J (2003) Photo-and antioxidative protection during summer leaf senescence in pistacia lentiscus l. grown under mediterranean field conditions annals of botany 92: 385-391

Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology 59: 651-681

Myrene DSR., Devaraj VR (2013) Mercury-induced changes in growth and oxidative metabolism of Field bean (Dolichos lablab). Research Journal of Chemistry and Environment. Vol. 17(9): 86-93

Naithani V, Nair S, Kakkar P (2005) Decline in antioxidant capacity of Indian herbal teas during storage and its relation to phenolic content. Food Research International 39(2006): 176–181

Ones HG, Jones M.B (1989) Introduction: some terminology and common mechanisms. Plants Under Stress, Cambridge University Press, Cambridge s. 1-10

Orav A, Raal A, Arak E (2008) Essential oil composition of pimpinella anisum l. fruits from various european countries. Natural Product Research 22(3): 227-232

Oyaizu M (1986) Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Japan Journal of Nutrition 44: 307-315

Örs S, Ekinci M (2015) Kuraklık stresi ve bitki fizyolojisi. Derim 32(2): 237-250

Özcan M, Ünver A, Uçar T, Arslan D (2007) Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction. Food Chemistry 106(2008): 1120–1127

Özcan S, Gürel E, Babaoğlu M (2001) Bitki biyoteknolojisi. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları

Öztürk NZ (2015) Bitkilerin kuraklık stresine tepkilerinde bilinenler ve yeni yaklaşımlar. Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 3(5): 307-315

Packer L (1984) Oxygen radicals in biological systems. Academic Press Inc., Orlando, Florida, 0-12-182005-X

Pan Y, Wu LJ, Yu ZL (2006) Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (Glycyrrhiza uralensis Fisch). Plant Growth Regul 49: 157–165

Pekmez M (2004) Oksidatif stres uygulanmış *Schizosaccharomyces pombe*'de moleküler çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Penninckx M (2000) A short review on the role of glutathione in response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 737-742

Pessarakli M, Szabolcs I (1999) Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors, handbook of plant crop stress. ISBN 0-8247-1948-4, New York s. 1198

Rahnama H, Ebrahimzadeh H, Ghareyazie B (2003) Antioxidant enzymes responses to NaCl stress in calli of four potato cultivars. *Pak. J. Bot.* 35(4): 579-586

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans CA (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Biology and Medicine* 26: 1231-1237

Sağlam A (2004) Ağır kuraklık stresi geçirmiş *ctenanthe setosa* bitkisinin yeni kuraklık koşullarına adaptasyon yeteneğinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Salisbury FB Ross CW (1992) *Plant physiol.* Wadsworth Publishing Company. California s. 682

Şanlı A, Karadoğan T, Daldal H (2012) Burdur'da tarımı yapılan bazı *umbelliferae* türlerinin uçucu yağ oranı ve bileşenlerinin belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 7(1): 27-31

Shan B, Cai Y, Brooks JD, Corke H (2007) The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology* 117: 112-119

Shalata A, Mittova V, Volokita Guy M, Tal M (2001) Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *lycopersicon pennelli* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system *physiologia plantarum* 112: 487-494

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158

Sipowicz MA, Chomarat P, Diwan BA, Anver MA, Awasthy YC, Ward JM (1997) Increased oxidative DNA damage and hepatocyte overexpression of specific cytochrome P450 isoforms in hepatitis of mice infected with *helicobacter hepaticus*. *American Journal of Pathology* 4: 933-941

Smirnov N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125: 27-58

Tabanca N, Demirci B, Ozek T, Kırimer N, Baser KHC, Bedir E, Khan IA, Wedge DE (2006) Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of essential oils from *pimpinella* species gathered from central and northern turkey. *Journal Of Chromatography A* 1117:194-205

Taiz and Zeiger (2006) *Plant Physiology*. Palme yayınevi, Ankara

Tanker M, Tanker N (1990) *Farmakognozi*. Cilt.2. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara No:65

Tekeli Y, Sezgin, Şanda MA (2008) Konya'da yetişen *Centaurea Pterocaula Truatv.*'in fenolik yapısı ve antioksidan aktivitesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi (E-DERGI)* 3(1): 35-41

Tekkes Y (2006) Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve e vitaminin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Turhan S, Üstün NŞ (2006) Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs, Bolu

Tuteja N (2007) Mechanisms of high salinity tolerance in plants, *Methods in Enzymology* 428: 419-438

Vaseva AV (2012) Opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell* 149(7): 1536-1548

Wei Y, Lee H (1997) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 217: 53-63

Yang R, Tsao R (2003) Optimization of a new mobile to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a tool phenolic index using high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1018: 29-40

Yaşar F (2003) Tuz stresi altındaki patlıcan genotiplerinde bazı antioksidant enzim aktiviteleri in vitro ve in vivo olarak incelenmesi. Doktora Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Yee Y, Tam NFY, Wong YS, Lu CY (2002) Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguira gymnorhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. *Environ. Exp. Bot.* 1-13

Zhou ZS, Huang SQ, Guo K, Mehta SK, Zhang PC, Yang ZM (2007) Metabolic adaptations to mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L, *J Inorganic Biochem* 101: 1-9



ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Diyarbakır'ın Dicle ilçesinde doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi Diyarbakır'da okudu. 1997 yılında İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümünü kazandı. 2002 yılında mezun olduktan sonra Bingöl'e Fen Bilgisi Öğretmeni olarak atandı. 2012 yılında Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programına yerleşti. Halen Bingöl'de öğretmen olarak görevine devam etmektedir.