

**ÇEŞİTLİ BELLIS PERENNIS POPULASYONLARININ
MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER ANALİZLERİ VE BU
POPULASYONLARIN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Neslihan KAVALCIOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ARALIK 2007
ANKARA**

Neslihan KAVALCIOĞLU tarafından hazırlanan ÇEŞİTLİ *BELLIS PERENNIS* POPULASYONLARININ MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER ANALİZLERİ VE BU POPULASYONLARIN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Leyla AÇIK
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mecit VURAL
Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Leyla AÇIK
Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ
Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Tarih : 17/12/2007

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nermin ERTAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Neslihan KAVALCIOĞLU

**ÇEŞİTLİ *BELLIS PERENNIS* POPULASYONLARININ
MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER ANALİZLERİ VE BU
POPULASYONLARIN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Neslihan KAVALCIOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kasım 2007

ÖZET

Acteraceae (Compositae) familyasına ait *Bellis pereennis* L. türü Avrupa’da geniş bir yayılış gösteren beyaz, pembe, mor ve kırmızı çiçekleriyle popüler bir süs bitkisidir. Geleneksel olarak romatizma tedavisinde, balgam ve idrar söktürücü, kas gevşetici ve iltahap önleyici olarak kullanılmaktadır. Veteriner tıpta ekimoz’a karşı ve yara iyileştirici olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada dört farklı lokaliteden (Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçer, Antalya/Alanya) toplanan *Bellis pereennis* L. örneklerinin birbirinden farklılıkları ve biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Dört farklı populasyonun polimorfizmi ve genetik uzaklığı Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) tekniği ile belirlenmiştir. Sonuçta incelenen populasyonlar arasında türlerarası bir farklılık gözlenmiştir. Ayrıca elektron mikroskobu ile *Bellis perennis* polenin ince yapısı incelenmiştir. Polen çalışması ve moleküler çalışma sonuçları populasyonlar arası farklılıklar açısından uyumlu olmuştur. Uçucu yağlar hidrodistilasyonla elde edilmiştir. Daha sonra gaz kromatografisi (GS) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GS/MS) ile analiz edilmiştir. Uçucu yağların biyolojik aktiviteleri bir grup insan patojeni bakterileri olan *Escherichia coli* (NRRL B-3008), *Staphylococcus*

aureus (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter aerogenes* (NRRL 3567), *Proteus vulgaris* (NRRL B-123), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Bacillus cereus* (NRRL B-3711) , *Candida albicans* mayası ve *Aspergillus flavus* fungusun'a karşı çalışılmıştır. Ayrıca uçucu yağların radikal süpürücü etkisi TLC-biyootografi ve mikrodilüsyon yöntemleri ile kalitatif ve kantitatif olarak araştırılmıştır. MIC değerleri uygulanan konsantrasyonlardan daha büyük olarak belirlenmiştir. Uçucu yağların analizi sonucunda hexadekanoik asit (%14-88), fitol (%4-30), ve γ -himakalen (%5-17) ana bileşikler olarak bulunmuştur. *Bellis perennis* (Rize/Sivrikaya) uçucu yağlarının ve metanolik ekstresinin radikal süpürücü aktiviteleri sırasıyla $IC_{50} = 0,113$ mg/ml ve $IC_{50} > 0.5$ mg/ml olarak belirlenmiştir.

Bilim Kodu : 203.1.104
Anahtar Kelimeler : *Bellis perennis*, RAPD-PZR, uçucu yağ, polen
Sayfa Adedi : 73
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Leyla AÇIK

MORPHOLOGIC AND MOLECULAR ANALYSES OF VARIOUS *BELLIS PERENNIS* POPULATIONS AND DETECTION OF ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF THIS POPULATIONS
(M.Sc. Thesis)

Neslihan KAVALCIOĞLU

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

November 2007

ABSTRACT

Bellis perennis L. (*Asteraceae*) is a popular ornamental plant with red, red purple, pink and white flowers widely distributed in Europe. *Bellis perennis* L. used in the treatment of rheumatism, as an expectorant, diuretic, spasmolytic and anti- inflammatory remedy. It has been employed as a vulnerary and against ecchymoses in veterinary medicine. In the present study, genetic differences of *B. perennis* collected from four different localities (Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçer, Antalya/Alanya) were determined and their biological activities were measured. Genetic distance and polymorphism of the four different populations were determined by the RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA technique). The results proved the existence of differences among the investigated populations. Furthermore, the fine structure of *Bellis perennis* pollens was examined by electron microscopy. The results of molecular analysis were in broad agreement with the results of morphological studies on pollen. Volatiles were obtained by hydrodistillation which were subsequently analyzed both by gas chromatography (GC) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Biological activity of the volatiles were subjected to a microbroth dilution assay against a group of human pathogenic bacteria *Escherichia coli* (NRRL B-3008), *Staphylococcus aureus*

(ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter aerogenes* (NRRL 3567), *Proteus vulgaris* (NRRL B-123), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Bacillus cereus* (NRRL B-3711) , the yeast *Candida albicans* and the fungus *Aspergillus flavus*. Also 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) radical scavenging activities of the *B. perennis* volatiles and methanol extracts were determined qualitatively and quantitatively by TLC-bioautography and microdilution methods. Minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined greater than used concentrations. The analysis of the volatiles showed that hexadecanoic acid (14-88%), phytol (4-30%), and γ -himachalene (5-17%) were the major constituents. The radical scavenging activities of the *B. perennis* volatiles and methanol extracts were determined as $IC_{50} = 0,113$ mg/ml and $IC_{50} > 0.5$ mg/ml, respectively.

Science Code : 203.1.104

Key Words : *Bellis perennis*, RAPD-PCR, essential oils, pollen

Page Number: 73

Adviser : Prof.Dr.Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında kıymetli bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösterici olan değerli hocam sayın Prof.Dr. Leyla AÇIK'a teşekkür ederim. Her türlü desteğiyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme teşekkür ederim.

Çalışmalarımın sonuçlanmasında bana yol gösteren ve yardımcı olan Prof. Dr. K. Hüsnü Can Başer'e, Prof.Dr. Münevver PINAR'a, Prof.Dr. Mecit VURAL'a, Prof.Dr. Nedim SULTAN'a, Doç.Dr. Fatih DEMİRCİ'ye, Doç. Dr. Betül DEMİRCİ'ye, Doç.Dr. İlhan GÜRBÜZ'e, Yrd. Doç. Dr. Doruk ENGİN'e ,Yrd. Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ'ye, Dr. Fatma ÖZTÜRK'e, Araştırma görevlisi Selcen BABAOĞLU'na, Araştırma görevlisi Bilgehan BİLGİLİ'ye, Emil Jivishov'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca dostluk ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Elif Burcu BALI, Filiz Sezen BİRCAN, Tuba YAYLA ve diğer arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tezin yapılmasında 05/2007-38 kodlu proje ile maddi destek sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Bitkinin teşhisinde kullanılan yöntemler	4
2.1.1. Polen morfolojisi	4
2.1.2. Bitki tür içi ve türler arası varyasyonlarını belirlemede kullanılan moleküler yöntemler	5
2.2. <i>Bellis perennis</i>	10
2.2.1. Bitkinin sistematik yeri	10
2.2.2. Cins özellikleri	11
2.2.3. Tür özellikleri	11
2.2.4. Yayılış alanları	11
2.2.5. Kullanım alanları	11
2.3. Uçucu Yağlar	12
2.3.1. Uçucu yağların elde edilme yöntemleri	13

Sayfa

2.3.2. Uçucu yağların kimyasal yapısı	17
2.3.3. Uçucu yağların ve bitki eksrelerinin kullanım alanları ve etkileri	18
2.3.4. Uçucu yağların etki mekanizması	24
2.3.5. Uçucu yağların radikal süpürücü etkisi	25
2.4. Ekstraksiyon Metotları	27
2.5. Antimikrobiyal Aktivite ve Test Yöntemleri.....	28
3. MATERYAL VE METOT.....	31
3.1. Materyal.....	31
3.1.1. Bitki materyali	31
3.1.2. Moleküler çalışmalar için tampon ve çözeltiler	31
3.1.3. Antimikrobiyal testler için kullanılan besiyerleri ve kimyasallar	34
3.1.4. Sterilizasyon	35
3.2. Metot	35
3.2.1. Polen analizi	35
3.2.2. Bitki yapraklarından DNA izolasyonu	35
3.2.3. DNA derişim tayini	36
3.2.4. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu ...	36
3.2.5. Agaroj jel elektroforezi	37
3.2.6. Genetik uzaklık tayini	37
3.2.7. Uçucu yağların elde edilmesi	37
3.2.8. Uçucu yağların antimikrobiyal etkileri	37
3.2.9. <i>Bellis perennis</i> uçucu yağları ve metanolik ekstresinin serbest radikal süpürücü etkisi	39

	Sayfa
3.2.10. Uçucu yağların analizi	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	42
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	73

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Aktif bileşik ekstraksiyonu için kullanılan çözücüler	27
Çizelge 2.2. Büyüklüklerine göre bir filtre kağıdının emdiği yağ miktarı.....	29
Çizelge 3.1. Çalışma örnekleri, lokaliteleri, toplama tarihleri, habitat, toplayıcı adı.....	31
Çizelge 3.2. RAPD-PZR’da kullanılan primerler.....	33
Çizelge 3.3. Biyolojik aktivite için kullanılan mikroorganizmalar ve kaynakları	38
Çizelge 4.1. Farklı lokalitelerdeki <i>Bellis perennis</i> türlerinin polen ölçümleri	43
Çizelge 4.2. Dört farklı lokaliteden toplanan <i>Bellis perennis</i> türlerinin RAPD-PZR işlemleri sonucunda elde edilen sonuçlar.....	49
Çizelge 4.3. Rize/Sivrikaya, Rize/Köhçe, Rize/Dereköy, Antalya/Alanya <i>Bellis perennis</i> örneklerinin genetik uzaklık diyagramı	51
Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan bitki kısımları ve stok çözeltiler	53
Çizelge 4.5. Antimikrobiyal Aktivite Değerleri (MIC, µg/ml)	54
Çizelge 4.6. <i>Bellis perennis</i> uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonları	55
Çizelge 4.7. Radikal Süpürücü Aktivite’ nin kantitatif değerlendirmesi.....	58

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi(RFLP)	6
Şekil 2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	8
Şekil 2.3. İzopren molekülünün kimyasal yapısı.....	17
Şekil 4.1. RAPD-PZR ürünlerine göre filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogram.....	51

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>Bellis perennis</i>	10
Resim 2.2. Soxhelet cihazı	14
Resim 2.3. Clevenger cihazı.....	16
Resim 4.1. <i>Bellis perennis</i> Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) görüntüleri	44
Resim 4.2. Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçer, Antalya/Alanya olmak üzere Türkiye'nin dört farklı lokaliteden toplanan <i>Bellis perennis</i> türlerinin OPC02, M13, OPO04 primerleri ile yapılan RAPD-PZR ürünleri	47
Resim 4.3. Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçer, Antalya/Alanya olmak üzere Türkiye'nin dört farklı lokaliteden toplanan <i>Bellis perennis</i> türlerinin OPU16, OPW10, OPR03 primerleri ile yapılan RAPD-PZR ürünleri	47
Resim 4.4. Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçer, Antalya/Alanya olmak üzere Türkiye'nin dört farklı lokaliteden toplanan <i>Bellis perennis</i> türlerinin A2, B7, OPA07 primerleri ile yapılan RAPD-PZR ürünleri	48
Resim 4.5. Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçer, Antalya/Alanya olmak üzere Türkiye'nin dört farklı lokaliteden toplanan <i>Bellis perennis</i> türlerinin OPA10, OPA17 primerleri ile yapılan RAPD-PZR ürünleri	48
Resim 4.6. Radikal süpürücü etkinin kalitatif değerlendirmesi	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

cfu	Koloni oluşturan ünite
g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

Kısaltmalar

Açıklama

AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPPH	Difenilpikrilhidrazil
E	Ekvatorial eksen
FID	Alev İyonizasyon Dedektörü
GC	Gaz Kromatografisi
GC/MS	Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrometresi
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
MIC	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
P	Polar eksen
Plg	Polar yöndeki çap
Plt	Ekvatorial yöndeki çap

Kısaltmalar**Açıklama****RAPD-PZR**

Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA
Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RFLP

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi

ROS

Reaktif oksijen türleri

SDA

Sabouraud Dekstrozu Agar

SSR

Basit Dizi Tekrarları

TE

Tris-EDTA

TLC

İnce Tabaka Kromatografisi

TTC

2,3,5-trifenil tetrazolium klorit

1.GİRİŞ

İnsanlar varlıklarını sürdürebilmek için yaşamın başlangıcından bu yana bitkilere bağımlı kalmışlardır. İhtiyaçların giderek artması ham maddeleri faydalı maddelere ve ürünlere dönüştürme ihtiyacını ortaya çıkarmıştır [Ketenöğlu, 2003].

Uzun zaman önce mikropların varlığı keşfedilmiş ve belirli bitkilerin iyileştirme potansiyeline sahip olduğu fikri kabul edilmiştir. Antik çağlardan beri insanlar bitkileri genel olarak bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanmakta ve bu geleneksel ilaçların bazıları hala çeşitli hastalıkların bilinen tedavisinin bir kısmını kapsamaktadır. Oğul otu (*Melissa officinalis*), sarımsak (*Allium sativum*) ve çay ağacı (*Melaleuca alternifolia*) gibi türlerin geniş spektrumlu antimikrobiyal etkileri tanımlanırken, ayı üzümü (*Arctostaphylos uva-ursi*) ve yaban mersini (*Vaccinium macrocarpon*) ekstrelerinin üriner bölge infeksiyonlarında kullanımı farklı tıbbi bitkilerle tedavi el kitaplarında rapor edilmiştir [Heinrich, 2004]. Aynı bitkilerin uçucu yağlarının, solunum sistemi, üriner bölge, gastrointestinal ve safra sistemi, deri üstü gibi yerlerde oluşan bulaşıcı hastalıkların tedavisinde de önemli olduğu bildirilmiştir [Vanaclocha, 2003].

Bitkiler aleminde her bitki türünde yaklaşık beş yüz binin üzerinde doğal ürünlerin üretildiği tahmin edilmektedir [Bhatt, 1995]. Epidemiyolojik ve hayvan çalışmalarında, hastalığı önlemede önemli rol oynayan gıdalardaki besin bileşenlerinin bitkiler tarafından sağlandığı belirtilmektedir [Willet, 1897]. Bazı gıda bileşenlerinin kanserin başlamasını ve ilerleyişini engellediği ya da başka bir deyişle hastalığın sonucu için potansiyel etkili olduğu saptanmıştır [Stampfer, 1997]. Bazı epidemiyolojik çalışmalar, koroner kalp hastalığı ve meme kanseri görülme hızının düşmesi ile doğal polifenolik bileşikler içeren kırmızı şarabın ölçülü tüketimi arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermiştir [Renaud, 1992; Gronbaek, 1995].

Yüksek bitkiler antiviral, antifungal ve antimikrobiyal özellikli metabolitler içermektedir. Klinik olarak kullanılan kanser ilaçlarının hemen hemen hepsi (taksol ve vinkristin gibi laboratuvar ortamında sentezi zor olan, yapısal olarak kompleks metabolitler hariç) laboratuvar ortamında kimyasal olarak sentezlenmektedir. [El-

Shemy, 2007]. Sentetik ilaçların yan etkileri ve maddi giderlerinden kaçınmak için gelişmiş ülkelerde insanlar alternatif tıbbi araştırmalara yönelmiştir [Wood, 1992]. Alternatif çalışmalar bitkilerin biyolojik olarak aktiviteleri ve doğal türevleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Uçucu yağlar ve türevleri, bitki yağları, bitki ekstraktları bunlardan bazılarıdır [Botelho, 2007]. Sentetik olarak üretilen ilaçlar, bitkilerdeki herhangi bir aktif maddenin izole edilmesi suretiyle yapılmakta ve bu nedenle hastalık etmenleri sade bir yapısı bulunan sentetik ilaçlara karşı kısa zamanda dayanıklı ırklar oluşturarak ilaçları etkisiz hale getirebilmektedir. Buna karşılık; bitkilerdeki aktif maddeler diğer maddelerle birlikte karışık bir yapı oluşturdıklarından hastalık etmenlerinin bu yapıyı çözerek dayanıklı ırklar oluşturmaları daha zor olmaktadır [Özer, 2001].

Aromatik bitkiler ve baharatlar, antimikrobiyal aktiviteye sahip uçucu yağlarca zengindir [Hunten, 1980]. Bu sebeple patojen mikroorganizmaların gelişiminin inhibe etmede ya da geciktirmede kullanılabilirler. [Conner, 1984]. Ayrıca, bazı baharatlar ve aromatik bitkiler besinlere özel tat ya da kokular vermede kullanılır. Aynı zamanda, soğan, tarçın, hindistan cevizi, karabiber, kekik, mercanköşk, adaçayı, biberiye, anason, fesleğen, kırmızıbiber, hint safranı, kakule, çin tarçını, arnavut biberi, kereviz, frenk soğanı, yonca, kişniş, dereotu, zencefil gibi bu baharatların antimikrobiyal özelliklere sahip oldukları bilinmektedir [Marino, 2001].

Bitki ekstraktlarının ve bitki yağlarının antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri, doğal terapilerin, farmasotik ve birçok gıda koruyucuların temelini oluşturmaktadır. Dolayısıyla doğal katkıları için bitki kaynaklarına yönelik araştırmalar giderek artmaktadır [Lis, 1997].

Marketlerde gıdaların patojen mikroorganizmalara karşı korunması ve uzun raf ömrünün gerekliliği için yeni ürünlere ihtiyaç duyulmuştur. Patojen mikroorganizmaların gelişimini engellemek ve besinlerin depo süresini uzatmak için çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır. Bununla beraber alternatif maddelerin özellikle doğal ürünlerin kullanımı büyük ilgi görmektedir [Marino, 2001].

Türkiye mevcut bitkisel çeşitliliği yönünden oldukça dikkate değer ve zengin bir bitki örtüsüne sahiptir. Ülkemizin mevcut bitki potansiyelinin, çeşitli endüstri sahalarında kullanımı, dünyada yapılan çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde çok önemli olabileceği görülebilmektedir. Tüm dünyada olduğu gibi, ülkemizde de son yıllarda doğal zenginliklerin yavaş yavaş tükenmesi ve ekonomik olarak girilen çıkmazlar, doğal ürünlerin çok amaçlı kullanılmalarını zorunlu kılmıştır.

Ülkemizde de çeşitli bitkiler yıllardan beri halk arasında tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bakterilerde antibiyotik dirençliliğinin artmasına karşılık antimikrobiyal özellik gösteren bitkilere ve bitkisel ürünlere karşı direnç kazandığı görülmemektedir [Toroğlu, 2006].

Bu çalışma için Türkiye'nin farklı lokalitelerinden, *Compositae* familyasına ait *Bellis perennis* türleri toplanmıştır. Teşhisleri morfolojilerine bakılarak yapılmıştır. Polen yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Farklı lokalitelerden alınan populasyonlar arası farklılıklar Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PZR) yöntemi ile belirlenmiştir. Bu bitkilerin uçucu yağları elde edilerek antimikrobiyal etkileri *Escherichia coli* (NRRL B-3008), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter aerogenes* (NRRL 3567), *Proteus vulgaris* (NRRL B-123), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Bacillus cereus* (NRRL B-3711), *Candida albicans* ve *Aspergillus flavus* (ATCC 9807)'a karşı denenmiştir. Ayrıca uçucu yağlarının kimyasal analizleri yapılmıştır. Uçucu yağ ve *Bellis perennis* metanol ekstresinin radikal süpürücü özellikleri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bitkinin Teşhisinde Kullanılan Yöntemler

Bitkiler binoküler yardımı ile morfolojilerine bakılarak teşhis edilirler. Morfolojik çalışmalardan birisi de polen analizleridir. Bitkilerde türler arası ve tür içi varyasyonlar da moleküler yöntemlerle belirlenebilir.

2.1.1. Polen morfolojisi

Çiçekli bitkilerde erkek gametofit olan polen, böcekler tarafından toplanılan ve besin rezervi olarak depo edilen yüksek enerjili bir materyaldir [Lisnken, 1997]. Bir polen tanesi bir tüp hücresi ve daha küçük olan bir generatif hücre içerir. Polen taneleri dirençli bir yapıda olan sporopolenin maddesinden oluşan dayanıklı bir dış örtü ile kaplıdır. Bu örtü aşınmaya karşı çok dirençli olduğu için polenlerin fosil oluşumu için uygundur. Bu nedenle çevrede çok sayıda polen fosili bulunabilir [Graham, 2004].

Polen tanelerinin büyüklüğü 20 µm ile 250 µm arasında değişir. Ayrıca polen tanelerinin üzerindeki deliklerin ve olukların sayıları ve düzenlenişi de farklıdır. Çiçekli bitkilerin hemen bütün familyaları, cinsleri ve birçok türü, polen tanelerinin dış yüzey desenine, deliklerin ve olukların sayısına ve düzenlenişine bakılarak teşhis edilebilir [Graham, 2004].

Polen morfolojisinde esas olarak alınan karakterler şunlardır

- a- Polen tipi
- b- Polen şekli; polar eksen uzunluğunun (P), ekvatorial eksene (E) oranı ile elde edilen sayı polen şeklini verir.
- c- Polen boyutları P ve E ölçülür.
- d- Polar (amb) şekline bakılır, çapı ölçülür ve şekli belirtilir.
- e- Ekzin kalınlığı ve ornemantasyonu belirtilir.
- f- Colpusların polar yöndeki uzunluğu (Clg) ve ekvatorial yöndeki eni (Clt), colpus şekli, kenarı ve membranının özelliği belirtilir.

- g- Porların polar yöndeki çapı (Plg) ve ekvatorial yöndeki çapı (Plt) por şekli, kenar ve membranının özelliği belirtilir.
- h- Annulus var ise çapı ve optik kesitte kalınlığı ölçülür.
- i- İntin kalınlığı ölçülür.
- j- Operkulum şekli ve ölçüsü verilir.
- k- Polar görünüşte polar alan ölçülür [Bostancı, 2001].

2.1.2. Bitki tür içi ve türler arası varyasyonlarını belirlemede kullanılan moleküler yöntemler

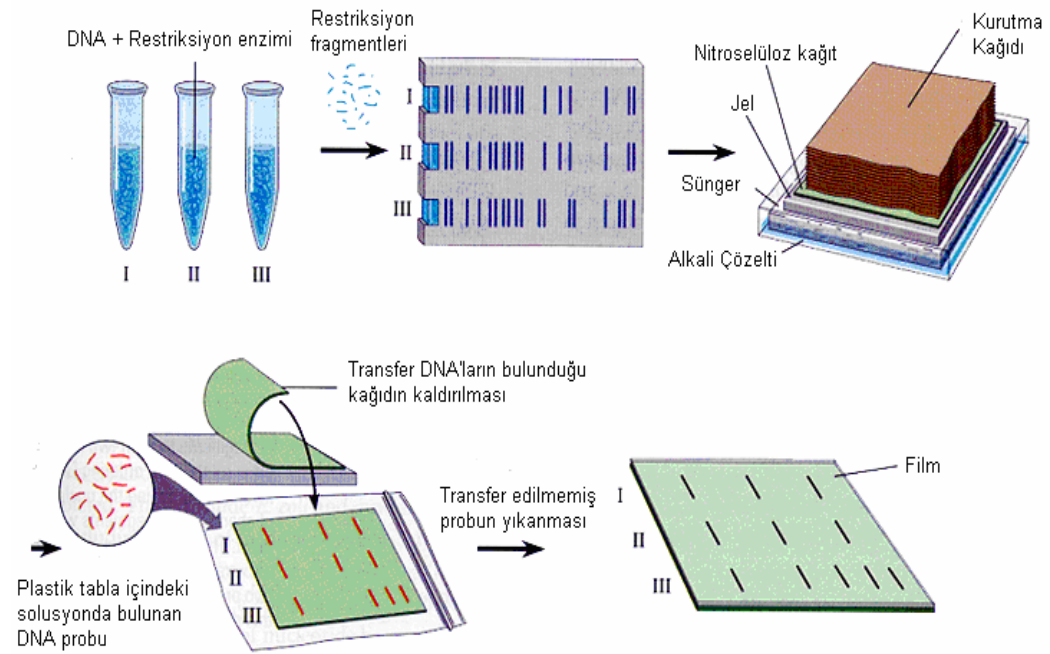
Polimorfizm, DNA'daki yer değiştirmeler, ters dönmeler, parça eksilmeleri ve parça yerleşmeleri ile meydana gelir ve genleri, onların düzenlenmelerini, biyokimyasını, gelişmeyi, morfolojiyi, davranışı etkileyeceğinden evrim sürecinde fenotipik varyasyonun da kaynağıdır. Bu varyasyonları tespit amacıyla, sitolojik veriler, izoenzimler, tohum depo proteinleri gibi biyokimyasal işaretleyiciler ve Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PZR), Basit Dizi Tekrarları (SSR), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP) gibi moleküler işaretleyiciler başarıyla kullanılmaktadır [Stuber, 1992].

Her biri ökaryotik DNA'daki özelliklere dayalı olarak tasarlanan ve kalıtsal olarak izlenebilen moleküler belirleyiciler günümüzde bitki moleküler biyolojisi alanında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Moleküler belirleyicilerin bitki moleküler biyolojisinde kullanıldığı alanlara örnek olarak bitki genom haritalanması, bir belirleyici yardımıyla ıslah (marker-assisted breeding), gen klonlama, tohum saflığı testleri verilebilir. Moleküler belirleyiciler oldukça büyük ve kompleks genom yapısına sahip bitki çeşitlerinde (yulaf ve ekmeklik buğday gibi heksaploid bitkilerde) yapılan çalışmalarda sağladıkları kolaylıklar nedeniyle yoğun bir şekilde kullanılmaktadırlar [Büyükcinal, 2003].

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) olarak adlandırılan bu yöntem, restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA parçalarının jel elektroforezi yöntemiyle yürütülerek ayrıştırılması ve bu parçaların membrana transferi sonucu prob DNA'ya hibridize işlemini içermektedir [Botstein, 1980].

Restriksiyon fragmentleri, jel elektroforezi ile uzunluklarına göre ayrılmaktadır. Ancak, çok miktardaki fragmentlerin jel üzerine yayılmasından dolayı, ökaryotik DNA'dan fragment uzunluk dağılımındaki farkları gözlemlemek mümkün olmamaktadır. Bu nedenle Southern'ın (1975) geliştirmiş olduğu teknikle, fragmentler jelden nitroselüloz membran gibi katı bir yüzeye aktarılmaktadır (Şekil 2.1) [Southern, 1975].



Şekil 2.1. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

[http://www.usask.ca/agriculture/plantsci/classes/plsc416/projects_2002/pawlin/resources/rflp.html]

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

“PZR” olarak bilinen “Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi Mullis ve ark. (1986) tarafından geliştirilmiştir [Montaldo, 1998]. Nükleik asitlerin istenilen bölgelerinin, bölgeye özel, sentetik oligonükleotid primerleri kullanılarak, *in vitro* ortamda yüksek sıcaklığa dayanıklı Taq polimeraz enzimi varlığında çok sayıda çoğaltılmasını esas alır [Hasaneen, 2003].

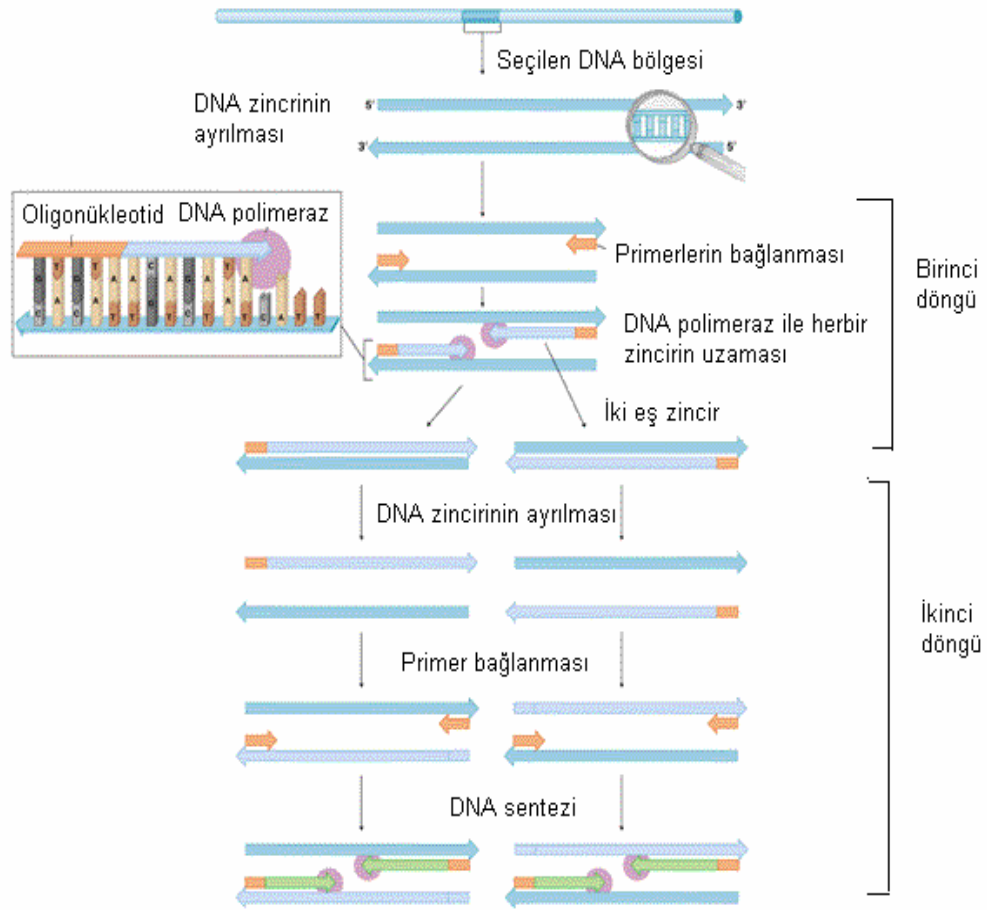
PZR’ın bir döngüsü üç basamaktan oluşur;

1-Hedef DNA’nın denatürasyonu: Bu basamakta önce çoğaltılacak DNA parçası yüksek sıcaklıklarda (94°C-96°C) ısıtılarak tek zincirlere ayrılır yani denature edilir. Bunlar yeni sentezlenecek DNA için kalıp işlevi görürler.

2- Primerlerin hedef DNA’ya bağlanması: 17-35 nüleotidden oluşan özgün sentetik oligonükleotid primerlerin hedef bölgeye uygun sıcaklıkta (37°C -65°C) bağlanması. Kullanılan primerlerin nükleotid dizisi çoğaltılması istenilen gen bölgesine tamamlayıcıdır. Isıtılarak denature edilmiş DNA soğutularak oligonükleotidler ile hibridize edilir ve bu basamağa primer bağlanması adı verilir.

3- DNA’nın polimerizasyonu: DNA polimeraz tarafından hedef bölgeye bağlanan primerlere uygun nükleotidlerin takılması yani polimerizasyon aşaması (72 °C) gerçekleşir (Şekil 2.2) [Mullis, 1986].

Bu üç basamak da 35 ve 45 kez tekrarlanarak çoğaltılır.



Şekil 2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

[<http://campus.quens.edu/faculty/jannr/bio103/helpPages/C16DNAtech.htm>]

Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD-PZR)

William ve ark.(1990) ve Welsh ve Mc Clelland (1990), rastgele primerler kullanarak polimeraz zincir reaksiyonu ile rastgele DNA dizilerinin çoğaltılmasında yeni bir teknik bulmuşlardır. RAPD nükleotid dizilimi rasgele seçilmiş primerler kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu olup, nükleotid dizi bilgisine sahip olmaksızın polimorfizmin belirlenmesini sağlar [Yu, 1993].

Bugünlerde önemli ürünlerin geniş bir çoğunluğunda, bitki türlerinin tanınması, taksonomik tartışmaların çözümü ve tür içi ve türler arası genetik farklılığın

gösterilmesinde PZR'a dayalı moleküler markırlarla gerçekleştirilir. Son yıllarda RAPD markırlarının gelişimi artırılmış, yabani ve evcilleştirilmiş populasyonlardaki genetik varyasyonları ortaya çıkarmak, bitki hücrelerindeki çalışmalarda başlangıçtaki biyoçeşitlilik taramaları için faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca son zamanlarda RAPD markırlar ile *Allium cepa* ve *Allium kermesinum*, *Ocimum spp.*, *Rosmarinus officinalis* ve *R. tomentosus*, *Thymus vulgaris*'i içeren tıbbi bitkilerin çalışmasında başarıyla kullanılmıştır [Masi, 2007].

Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP)

Genomik DNA'dan kesilen restriksiyon fragmentlerinin seçici özel primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmasına dayalı bir tekniktir. Genomik DNA endonükleazlar ile kesilir ve bu kesilen DNA fragmentlerine özel adaptörler bağlanır. Adaptör ve restriksiyon bölgelerinin tamamlayıcısı olan primerler sentezlenirken bu primerlerin 3' uçlarına seçici nükleotitler ilave edilir. Böylece PZR boyunca sadece primerlerin seçici nükleotitleriyle birleşen ve restriksiyon bölgelerinde uzanan nükleotitleri bulunduran DNA fragmentleri çoğaltılmış olur [Vos, 1995].

Basit dizi tekrarları (SSR)

Mikrosatelitler olarak da bilinen basit DNA tekrarları birbiri ardına gelen iki ile beş nükleotid ünitesi tekrarları olup tüm genomda dağılmış olarak bulunurlar. Bu gruplar (CA)_n, (AAT)_n, (GATA)_n şeklinde gösterilmekte ve n ardaşık tekrar sayısını belirtmektedir. Basit dizi tekrarlarını çevreleyen korunmuş DNA dizileri primer olarak kullanılmakta, PZR yöntemi ile tekrarların sayındaki değişiklikler belirlenmektedir. Böylece ardaşık basit dizi tekrarlarının sayısındaki farklılıklar PZR sonucu farklı uzunlukta parça çoğaltılması ile sonuçlanmaktadır [Tautz, 1984].

Ribotiplendirme

Ribozomal DNA'lar kromozomların çekirdek oluşumundan sorumlu bölgelerinde bulunan çok iyi bir şekilde korunmuş ardı ardına dizilmiş tekrar eden birimlerdir.

Tekrar eden birimlerin kopya sayısı populasyonlarda büyük değişiklikler gösterir. Çekirdek DNA'sının ribozomal genlerinin bileşenleri farklı oranlarda evrimleşmiştir. Bu nedenle evrimsel çalışmalarda tercih edilirler. Gen bölgeleri transkribe edilemeyen bölgeler (NTS), ITS1 ve ITS2 (transkribe edilebilen bölgeler) olarak birkaç bölgeye ayrılmaktadır. ITS bölgelerinin yanındaki yüksek derecede korunmuş bölgelerden düzenlenen PZR primerleri ile, rDNA tekrarlarının kopye sayısının fazla olmasından dolayı ITS bölgelerinin kolayca çoğaltılması sağlanır [Baldwin, 1995; Dubouzet, 1999].

2.2. *Bellis perennis*

2.2.1. Bitkinin sistematik yeri

Alem: Plantae

Şube: Magnoliophyta (kapalı tohumlular)

Sınıf: Magnoliopsida (dikotiledonlar)

Takım: Asterales

Familya: Asteraceae

Cins: *Bellis*

Tür: *Bellis perennis* (koyun gözü) (Resim 2.1) [Davis, 1975].



Resim 2.1. *Bellis perennis*

2.2.2. Cins özellikleri

Gelişimi yavaş olup sıklıkla toprak üstünde belirli bir gövdeye sahip olmayan ya da yalnızca toprak içinde çok kısa bir gövdesi olabilen çok yıllık ya da tek yıllık otsulardır. Yapraklar rosulat ya da yalnızca bazal kısmında alternat ya da oblanseolat. Kapitula heterogam, ışınsal, yapraksız çiçek sapı, ya da pedinkul üzerinde tektir. İnvolukrum çanak biçiminde olup, fillariler bir-iki ardaşık dizilimli, otsu, sıklıkla siyahımsı yeşil renkte ve ergindir. Çiçek tablası koni biçiminde ve çıplaktır. Işınsal çiçekler sarı olup, ligulalar beyaz ya da pembedir. Akenler obovat, basık, kenarlarda yoğunlaşmıştır. Pappus yoktur [Davis, 1975].

2.2.3. Tür özellikleri

Tek yıllık, genellikle rosulat bitkidir. Yapraklar spatulat, 2-30 x 0,5-1,5 cm, lamina tepesi obtus, ya da genişleyen akuttur. Apeksin her iki yanında beş yüzeysel diş olup erginde yüzeyde seyrek. Kapitula 1,5-10 (25) cm'lik sap üzerindedir. İnvolukrum 0,5-1 cm genişliğinde; fillariler ovat-lanseolat, 3-6 x 0,72 mm, apeks obtus ya da akuttur. 30-50 ışınsal çiçek olup ligulalar 5-7mm, beyaz ve sıklıkla pembedir. Disk korollalar 1,5-2 mm. Akenler apekte daire oluşturur, 1,3-1,5 x 0,7-0,8 mm, erginde zayıftır. Kapitulum büyüklüğü ve ligula renklenmesi çok değişiklik gösterir [Davis, 1975].

2.2.4. Yayılış Alanları

Bellis perennis L. Türkiye'de Kırklareli, Çanakkale, İstanbul, Bolu, Kastamonu, Sinop, Samsun, Gümüşhane, Rize, Konya, İzmir, Antalya, İçel, Hatay bölgelerinde geniş bir yayılış göstermektedir [Davis, 1975].

2.2.5. Kullanım alanları

Geleneksel olarak romatizma tedavisinde, balgam söktürücü, idrar söktürücü, kas gevşetici ve iltahap önleyici olarak kullanılmaktadır [Hansel, 1994; Ozarowski;

1989]. Veteriner tıpta ekimoz'a karşı ve yara iyileştirici olarak kullanılır. Ayrıca antifungal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [Desevedavy, 1989; Hiller, 1990]. Sakarya yöresinde halk tarafından taze kısımları ezilerek, kına ve sirkeyle karıştırılarak baş ağrısı için kullanılmaktadır [Uzun, 2004]. *Bellis perenis*'in (koyun gözü) toprak üstü kısımlarını hipertansiyon ve kalp hastalıklarında kullanıldığı rapor edilmiştir. Kırmızı, mor, pembe ve beyaz çiçekleriyle popüler bir süs bitkisi olup Avrupa da kültürleri yapılmaktadır [Davis, 1975; Toki, 1991].

2.3. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar bitkilerden ya da bitkisel droglardan elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde olan, uçucu, kuvvetli kokulu ve yağimsi karışımlardır. Uçucu yağlar bitki organlarının herhangi birinde (çiçek, yaprak, kabuk, kök vb.) bulunabilirler. Bazen kozalaklılarda olduğu gibi bitkinin bütün dokularında oluşabilir, bazen de sadece özel organ ve dokularda meydana gelirler. Uçucu yağ bitkinin bulunduğu familyaya göre, belli bir organda, ya salgı tüyünde, ya salgı ceplerinde, salgı kanallarında ya da salgı hücrelerinde toplanmaktadır. *Coniferae*, *Rutaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Rosaceae*, *Labiatae*, *Umbelliferae* ve *Compositae* familyaları uçucu yağ bakımından zengindir [Tanker, 1990; Baytop, 1972].

Uçucu yağın bitkide ya doğrudan doğruya protoplazmada olduğu veya hücre çeperinin özel bir tabakasında meydana geldiği ileri sürülmektedir. Uçucu yağların bitkide bir biyolojik olaya katılmak için oluşmadıkları, bitkinin yararsız metabolizma ürünlerinin atılmasında rol oynadıkları düşünülmektedir yani detoksifikasyon ürünleridir. Bazı araştırmacılara göre artık ürün olarak kabul edilen uçucu yağlar koruyucu ajan olarak kabul edilmekte ve bitkinin yaralanması sonucu meydana gelen reçinelerin çözülmesini sağladıkları düşünülmektedir. Ayrıca böcekleri kaçırmak ve çekme görevleri olduğunu savunanlarda bulunmaktadır. Böcekleri kaçırmak etkide olanlar bitkinin özellikle yaprak ve çiçeklerinin korunmasında yardım etmekte, böcekleri çekici etkide olanlar ise tozlaşmaya yardımcı olmaktadır. Uçucu yağın yüzey gerilimi ve buharlaşma üzerindeki etkilerini göz önünde tutan araştırmacılar bunların bitkilerde su kaybını önleyici bir rollerinin bulunduğunu ileri sürmektedir.

Özellikle kurak ve sıcak bölgelerde yaşayan ekseri bitkilerin uçucu yağ taşımakta olması bu fikri kuvvetlendirmektedir [Tanker, 1990; Baytop, 1972].

2.3.1. Uçucu yağların elde edilme yöntemleri

Uçucu yağların elde edilmesi bitkideki uçucu yağ miktarı ve cinsine, bitki kısmına göre değişik yöntemlerle elde edilmektedir. Bugün başlıca dört yöntem kullanılır.

- 1- Anfloranj yöntemi
- 2- Tüketme yöntemi
- 3- Mekanik yöntem
- 4- Distilasyon yöntemi

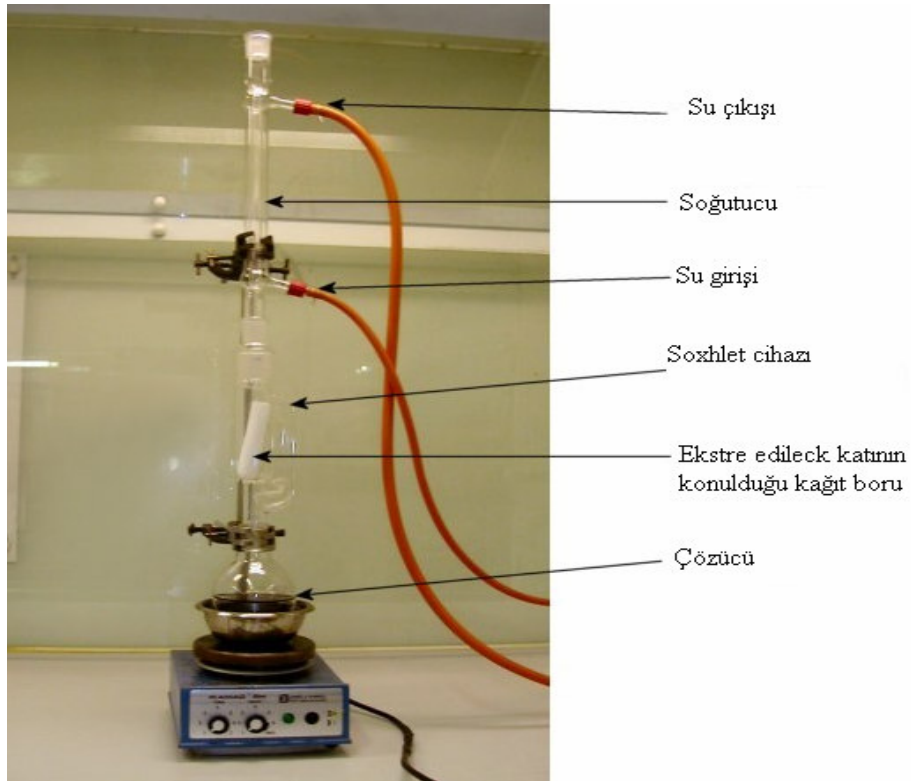
Anfloranj yöntemi (yağ ekstraksiyonu)

Bu yöntem genellikle materyaldeki uçucu yağı az olan önemli droglar için kullanılmaktadır. Taze materyaller tercih edilmektedir. Taze materyallerden özellikle çiçekler ince tabaka yağ sürülmüş cam plaklar üzerine konur, birkaç saat veya gün bekletilir. Cam plaket üzerine sürülmüş yağdan alkol ekstraksiyonu ile uçucu yağ elde edilmektedir. Bu yöntem parfümeride çok önemli olan, fakat drogtaki oranı düşük olan uçucu yağların elde edilmesinde kullanılır. Diğer bir anfloranj yöntemi ise drogun maserasyona kısa bir süre bırakılması ve daha sonra 5-80 °C'de bekletilmesi ile yapılan sıcak anfloranj yöntemidir. Günümüzde gül ve karanfilden uçucu yağların elde edilmesinde kullanılmaktadır [Ceylan, 1987].

Tüketme yöntemi

Bu yöntemde, genelde bir organik çözücü ile sokselet (Resim 2.2) prensibine dayanarak droglardan yağ elde edilmektedir. Materyal uçucu yağı kolaylıkla çözebilen bir organik çözücü (hekzan, alkol, eter) ile kısa bir süre muamele edilmektedir. Bu esnada uçucu yağ, sabit yağ, mum, boya maddeleri vs. gibi organik çözücülerde çözünmeyen maddeler organik çözücüye geçer. Süzülerek alınan organik

Çözücü Rotary Evaporatör de tamamen uçurulur. Sabit yağları ve mumlarında taşıyan bu renkli madde eğer taze materyalden elde edilmişse ‘konkret’, kurutulmuş materyalden elde edilmişse ‘rezinoit’ olarak adlandırılır. Elde edilen konkret ya da rezinoit uçucu yağ yanında kokulu olmayan maddeleri de içermektedir. Uçucu yağ, etanol ya da sulu etanol ile tüketilir. -15 °C bir süre, genellikle bir gece bekletilir, çöken kısımlar soğukta çözüldükten sonra, çözücü vakumda uçurularak uçucu yağ elde edilir. Bu yöntemle elde edilen uçucu yağa ‘absolü’ denir [Ceylan, 1987; Baytop, 1995].



Resim 2.2. Sokselet cihazı

[http://www.usask.ca/agriculture/plantsci/classes/plsc416/projects_2002/pawlin/resources/rflp.html]

Mekanik yöntem

Bazı uçucu yağların yapısı distilasyon yöntemi kullanıldığı zaman bozulmaktadır (limon esansı, bergamat esansı gibi). Bu gibi yağların elde edilmesi için sıkma yada benzeri mekanik yollar uygulanır. Turunçgiller gibi türlerinin uçucu yağlarının elde edilmesinde kullanılır. Limon esansı elde edilirken meyve üzeri yeterince keskin ve çıkıntılı bir kesenin iç çeperinde yuvarlanır, böylece uçucu yağ taşıyan salgı cepleri parçalanmış olur. Keseye düşen yağ damlaları sonradan toplanır. Bir çok narenciye esansı da bu yöntemle elde edilir. Bazen narenciye kabukları sünger arasında sıkılarak salgı ceplerinin ezilmesi ve çıkan uçucu yağların sünger tarafından emilmesi de sağlanabilir. Sonradan sünger sıkılarak akan sıvının üzerinde toplanan uçucu yağ alınır [Ceylan, 1987; Tanker, 1990; Baytop, 1995].

Distilasyon yöntemi

Su distilasyonu: Kurutulmuş olan ve kaynatılmakla bozulmayan bitkisel materyal ile çalışılıyorsa bu yöntem seçilir. Materyal distilasyon aygıtına (clevenger cihazı) (Resim 2.3) yerleştirilir ve bütün uçucu kısımlar yani uçucu yağ, su toplama kabında yoğunlaşana kadar ısıtılır ve distile edilir [Douissa, 2005].



Resim 2.3. Clevenger cihazı

Su ve buhar distilasyonu: Bu yöntemde bitki doğrudan doğruya sıcak su ile değil, buhar ile temasta bırakılır. İster kuru ister taze bitki olsun, ısı etkisi ile bozulan maddeler varsa bu yöntem uygulanır. Kuru materyalden hareket ediliyorsa drog önce toz haline getirilir, sonra su ile örtülerek maserasyona bırakılır. Bu maserattan su buharı geçirilmek suretiyle uçucu kısımlar ayrılır. Taze materyalden hareket ediliyorsa uzun süre maserasyona gerek yoktur. Su buharı genellikle başka bir yerde elde edilir ve bir boru aracılığı ile su-drog karışımı içine yöneltir. Böylece ısı ile parçalanma ihtimali ortadan kaldırılmış olur [Ceylan, 1987; Baytop, 1995].

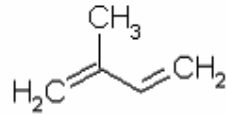
Buhar distilasyonu: Taze materyale uygulanan yöntemdir. Bitki canlı olduğunda ve yeterince su taşıdığında bu yöntemde su ile maserasyona bırakma gereği yoktur. Bitkisel materyal toplanır, kesilir, tel sepet yada benzeri kaplar içine konularak distilasyon kazanına yerleştirilir. Basınç ile taze bitki parçalarına yöneltlen buhar, yağ damlacıklarını da sürükleyerek toplama kabına gelir [Ceylan, 1987; Baytop, 1995].

2.3.2. Uçucu yağların kimyasal yapısı

Uçucu yağlar oldukça fazla sayıda bileşiğin karışımından oluşur. Bu nedenle kimyasal yapı bakımından büyük ayrıcalıklar gösterirler. Uçucu yağlarda bulunan maddeleri dört grup altında toplayabiliriz [Baytop, 1972].

- A) Terpenik maddeler
- B) Aromatik maddeler
- C) Düz zincirli hidrokarbürler
- D) Azot ve kükürt taşıyan bileşikler

Uçucu yağların büyük çoğunluğu terpenik maddelerden oluşur. Terpenler ve terpenlerin oksijenli türevleri uçucu yağların belli başlı bileşiklerini oluştururlar. Terpen adı verilen madde iki izopren (Şekil 2.3) molekülünden oluşur.



Şekil 2.3. İzopren molekülünün kimyasal yapısı
[<http://faf.vfu.cz/html/images/strs/terpeny/izopren.gif>]

İki izopren molekülünden oluşan on karbonlu terpenlere “monoterpen”, on beş karbonlu terpenik bileşikler “seskiterpen” adını alır. Uçucu yağlarda çoğu kez monoterpen yapısında olan maddelerle bazı seskiterpenlere rastlanır. Çünkü bunlar uçucu karakterde olan maddelerdir [Baytop, 1972].

Bitkiler hemen hemen sınırsız aromatik madde sentezi yapabilme kabiliyetine sahip olup birçoğu fenoller ve türevleridir [Geissman, 1963]. Birçok durumda maddeler mikroorganizmaların, böceklerin ve herbivorların saldırılarına karşı bitki savunma mekanizması olarak yardım eder. Bazıları da; terpenoidler gibi bitkilere kokularını verir, kuinon ve taninler de bitki pigmentlerinden sorumludur (kırmızı biberdeki

acılık tadı veren kapsaisin bir terpenoiddir). Bu bitkiler ve diğer bazı bitki türleri de insanlar tarafından yemeklere lezzet vermek için kullanılır [Cowan, 1999].

2.3.3. Uçucu yağların ve bitkisel ekstraktların kullanım alanları ve etkileri

Gıdalarda koruyucu madde olarak kullanılmaları

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde gıda kaynaklı hastalıklar halen önemli bir problemdir. Hastalık olaylarının 81 milyonda 6 milyonu gıda kaynaklı olup, sadece Amerika’da yılda 9000’den fazla sayıda insan gıda kaynaklı patojenlerden ölmektedir. *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ve *Campylobacter jejuni* zehirlenme olaylarından sorumlu önemli patojenlerdendir [Mead, 1999]. Gerçekte, gıda zehirlenmesi koruyucu yöntemler kullanılmasına rağmen halen hem tüketicileri ve hem de gıda endüstrisini tehdit etmektedir. Buna rağmen tüketicilerin, koruyucu içeren gıdaların güvenliği konusunda endişeleri vardır. Bu nedenle, gıda kaynaklı hastalık olaylarının azaltılması için daha yeni ve daha etkili tekniklere artan bir şekilde ilgi vardır. Bitkiler gibi doğal kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal maddelerin gıda güvenliğini yüksek oranlarda korumayı başardığı bulunmuştur [Alzoreky, 2003].

Tıbbi amaçlı olarak kullanılmaları

Helicobacter pylori, gastrik mukozada kolonize olan Gram negatif, sarmal şekilli, mikraerofilik bir bakteridir [Warren, 1983]. İnsanlarda gastroduodenal hastalıklarından sorumlu en önemli patojenlerinden birisidir. Gastroduodenal hastalıkları geliştiren *H. pylori*’nin yok edilmesinde antibiyotiklerin kullanılması, bu antibiyotiklere karşı hızlı bir şekilde dirençlilik kazanmalarına yol açmıştır. Bundan dolayı laboratuvar ortamında (*in vitro*) ve canlılar üzerinde (*in vivo*) denenen bazı uçucu yağların etkisi araştırıldığında; *in vitro* olarak yağların %1’lik konsantrasyonda kullanıldığında *H. pylori*’nin çoğalmasını tamamen inhibe ettiği bulunmuştur. Örneğin *Cymbopogon citratus* (limonotu) ve *Lippia citriodora* (mine çiçeği) uçucu yağlarının % 0.01’lik konsantrasyonda pH 4.0 ve 5.0’da *H. pylori*’ye

karşı bakterisidal etki gösterdiği bulunmuştur. Farelerde yapılan *in vivo* çalışmalarda ise, limonotu ile muamele edilen farelerin midesindeki *H. pylori*'nin yoğunluğu, muamele edilmeyenlere oranla önemli derecede düşüş göstermiştir. *H. pylori*'ye karşı dirençlilik gelişimini önlemede uçucu yağların, yeni ve güvenli bir anti-*H. pylori* ajan olabileceği ileri sürülmüştür [Ohnu, 2003].

Eddouks ve ark. (2002) Fas'ın Güneydoğu bölgesinde diyabet, hipertansiyon ve kalp rahatsızlıkları tedavisi için tıbbi bitkilerin kullanımı üzerine bir inceleme yapmışlardır. 320 diyabet ve 380 hipertansiyon ya da kalp rahatsızlığı olan toplam 700 hasta üzerinde çalışılmıştır. Fitoterapinin kullanım yüzdesi %80 olarak bildirilmiştir. Sonuçlar, hastaların diyabet, hipertansiyon ve kalp hastalıklarının tedavisinde tıbbi bitkileri kullandıkları ve bunun nedeninin modern tıptan daha ucuz (%58), daha etkili (%40) ve daha iyi olmasına bağladıklarını göstermiştir. Hastaları okuma yazma bilmeyen (%63) ve profesyonel olarak aktif olmayan kişilerin oluşturduğu bildirilmiştir. Bütün bu gruplar içinde bitki kullanıcılarının sayısının çok önemli olduğu ve cinsiyete, yaşa ya da sosyokültürel düzeye bağlı olmadığı bildirilmiştir [Eddouks, 2002].

Diyabet tedavisi için *Allium sativum*, *Olea europaea*, *Artemisia absinthum*, *Thymus vulgaris*, *Nigella sativa* ve *Rosmarinus officinalis* vb. bitkilerin aralarında bulunduğu bir çok bitki kullanılmaktadır. *A.sativum*, *N. sativa* ve *R.officinalis* gibi örnekler deneysel olarak çalışılmış ve hipoglisemik aktivitesi kanıtlanmıştır. Hipertansiyon ve kalp hastalıkları için *A. sativum*, *O. europaea*, *Artemisiaherba alba*, *Fumaria officinalis*, *Marribium vulgare*, *Origanum vulgare*'ninde aralarında bulunduğu 73 bitki bulunmuştur [Eddouks, 2002].

El-shemy ve ark. (2007) *Salix safsaf* (söğüt) yapraklarını çeşitli çözücülerdeki (petrol eter, su, kloroform, aseton, etanol, dietil eter) ekstraktlarının içerdiği antitümör ajanlarının üç farklı hücre tipine karşı etkisini araştırmıştır. Yaklaşık 300 tür içeren *Salix* geleneksel tıpta kullanılmaktadır [Eddouks, 2002]. Ağaç kabuğunun altında bolca depo edilen salisilik asidin kaynağıdır. Bazı çalışmalarda *Salix* yaprak

ekstraktlarının etkin maddesi olan salisin ve saligenin'in antilösemi ajanları olduğu bildirilmiştir [Claudia, 2003].

Laboratuar ortamında ve canlı kanser hücrelerine karşı aktivite için *Salix*'in genç yapraklarından sulu ekstre elde edilmiştir. *In vivo* da Ehrlich Ascites kanser hücreleri farenin interperitoneal boşluğuna enjekte edilmiş ve sulu ekstre mide yoluyla verilmiştir. Söğüt'ün sulu ekstresinin Ehrlich Ascites karsinoma hücrelerinin (EACC) tümör gelişimini indirdiği ve ölümü 35 gün geciktirdiği bildirilmiştir. *In vitro* da akut myeloid lösemi (AML)'li 13 ve akut lenfoblastik lösemi (ALL)'li 7 hastadan alınan primer hücrelerin arasındaki anormal hücrelerin büyük bir bölümünü (%70-80) öldürdüğü bildirilmiştir. Muamele edilen hücrelerdeki DNA parçalanması apoptozisle meydana gelen programlanmış hücre ölümünü ifade etmektedir. *Salix*'ile muamele edilen ALL mononükleer hücrelerinde 24 saat inkübasyondan sonra kontrolden (hastalıklı hücreler) daha yüksek bir verimlilikte lenfoblastiklerin yıkımı görülmüştür. AML hücrelerinde benzer tepki vermiştir. Söğüt ekstraktıyla muamele edilen hücreler kontrole (%96.9) karşılaştırıldığında ortalama yaşayan hücre sayısı %26,2 oranında bulunmuştur.

Farklı yaprak ekstrelerini içeren çeşitli fraksiyonlar AML ve ALL hücrelerine verilmiştir. Polar olmayan çözücüler (petrol eteri, eter ve kloroform) ile ekstre edilen söğüt yapraklarının fraksiyonu ile muamele edilen tümör hücrelerinde çok yüksek bir canlılık oranı (%80-90) gözlenmiştir. Yani bu çözümler ile muamele edilen ekstrelerin çok düşük bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Her bir ekstraktın etkisi %1.5 ve 2.9 arasında saptanmıştır. Fakat polar organik çözücüler (su ve %70'lik etanol) ile oluşturulan fraksiyonlar AML, ALL ve EACC hücreleri üzerinde çok büyük bir etki yapmıştır. Bu incelemelerden sonra söğüt yapraklarının antitümör aktivitesine etanol ya da sulu ekstrelerindeki bileşiklerin neden olduğu bildirilmiştir. Bu aktif parçalar sıcak suda kolaylıkla çözülebilir ve doğal bir antitümör olarak kullanılabilir [El-Shemy, 2007].

Söğüt ekstraktının etkili maddeleri olan salisin ve saligeninin olgunlaşmamış beyaz kan hücreleri ile birleşerek DNA hasarıyla alakalı olan apoptosize neden olmuştur.

Söğüt ekstraktındaki metabolitlerin apoptozis artmasında, DNA hasarında ve proteinlerin denatürasyonu ve hücre membranına etkide tümör inhibitörü gibi rol oynayabileceği bildirilmiştir [Shemy, 2007].

Fenolik bileşikler, glikozitler ve tanin tipleri de su yada etanol çözeltilerinde çözünürler. Bu nedenle bu gruptaki bileşikler lösemi ve kanser hücrelerinin yıkımı için major aktif bileşikler içerebilir [Bravo, 1988].

Tosun ve ark. (2005) bitki materyallerinden hazırlanan etanol ekstraktlarını *Mycobacterium tuberculosis* H₁₇R_v (ATCC 27294) üzerinde denemişlerdir. 107 bitkiden *Usnea barbata* (L.) Mott, *Inula helenium* L. subsp. *turcoracemosa*, *Tripleurospermum conoclinium*, *Veratrum album* L., *Picea orientalis* (L.), bitkilerinin 100 µg/ml'den daha düşük konsantrasyonlarda *M. tuberculosis*'in gelişiminde %90'dan daha yüksek seviyelerde inhibisyonları bildirilmiştir. *Veratrum album*'dan jervin, *U. barbata*'dan usnik asit, *I. helenium* L. subsp. *Turcoracemosa*'dan alantolakton elde edilmiş ve minimal inhibisyon konsantrasyonları (MIC) değerleri sırasıyla 25, 125 ve 3,125 µg/ml olduğu bildirilmiştir [Tosun, 2005].

Zingiberaceae familyasına ait *Curcuma mangga*, *Kaempferia galanga*, *Kaempferia parviflora*, *Zingiber cassumunar*, *Zingiber officinale* ve *Zingiber zerumbet* olmak üzere altı bitkinin rizomlarından elde edilen uçucu yağlarla birlikte su ve etanolik ekstraktları RBL-2H3 hücre dizisine karşı anti alerjik aktiviteleri araştırılmıştır [Tewtrakul, 2007]. Alerji ciddi bir sağlık problemi olan immün bozukluklardan biridir. Polen, gıda, toz parçacıkları, kozmetikler ve hayvan tüyleri gibi alerjen maddeler sonucu ortaya çıkar [Goldsy, 2002]. Bazofilik yada mast hücrelerinde granüllerin salınımı sırasında histamin ile beraber salınan β-heksozaminidaz fare bazofilik lösemi dizisinde degranülasyona neden olan antijen için bir biomarker olarak kullanılır [Cheong, 1998].

Kaempferia parviflora etanolik ekstresi fare RBL-2H3 hücrelerinde degranülasyonda marker olarak kullanılan β -heksozaminidaz salınımına neden olan antijen karşı IC₅₀: 10.9 μ g/ml değeriyle çok güçlü antialerjik etki gösterdiği bildirilmiştir. Bunu takiben *Zingiber cassumunar* etanol ekstresi IC₅₀: 12,9 μ g/ml, *Curcuma mangga* su ekstresi IC₅₀: 36.1 μ g/ml antialerjik etki göstermiştir [Tewtrakul, 2007].

Uçucu yağlar ve bileşim maddeleri farklı tıbbi ürünlerin bileşenleri olarak da kullanılmaktadır [Cowan, 1999].

Anti-Helminetik olarak kullanılmaları

Sindirim sisteminde bulunan parazitlerin kontrol edilmesi için genellikle antihelminetik ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaç artıklarının hayvansal ürünlerde görülmesi, tüketicileri düşündürmektedir [Jackson, 1993]. Bu yüzden, parazitlerin sayılarını ve etkilerini azaltan bitki türlerinin kullanılması, bu ilaçların kullanımını azaltmaktadır. Örneğin; *Lantana camara* (Ada çayı) sindirim sistemindeki parazit ile nematotlarının kontrolünde önemli bir bitki olduğu bilinmektedir [Chandel, 1990]. Ayrıca *Artemisia* türlerinde insanlar tarafından antihelminetik olarak kullanıldığı bildirilmektedir [Ramezani, 2004].

Anti-Fungal olarak kullanılmaları

Toprağa, suya, havaya ve canlılara olumsuz etkisi olmayan zararsız doğal bitki ekstraktlarından elde edilen maddeleri kullanarak patojen fungusa karşı etkili olan bitki türleri ve bu türlerin içerdikleri etken maddeler tespit edilmesi, dünyada tüm ülkelerin yoğun bir şekilde üzerinde çalıştığı biyolojik mücadele yöntemlerinden birisidir. Maya benzeri mantarlara karşı yapılan çalışmalarda, *Cyclamen* (*C. coum* ve *C. mirabile*) türlerinden elde edilen saponozoitlerin etkili olduğu rapor edilmiştir [Çalış, 1996].

Mullerriebau ve ark. (1995) tarafından, *Thymbra spicata*, *Satureja thymbra*'nın uçucu yağlarından başka *Salvia fruticosa*, *Laurus nobilis*, *Mentha pulegium*, *Inula*

viscosa, *Pimpinella anisum*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Origanum miniiflorum*'un *Phytophthora capsici*'ye karşı fungal toksiklik gösterdiği ve bu toksikliğin uçucu yağlardaki farklı fenolik fraksiyonlarından kaynaklandığı bildirilmiştir [Mullerriebau, 1995].

Papatya, nane, fesleğen ve kekik uçucu yağlarının bitki patojen fungusuna karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir [Edris, 2003]. Fungal miselyumlar üzerinde uçucu yağların doğrudan bir etkisinin olduğu gözlenmiştir [Inouye, 2000].

Bitki zararlılarına ve yabancı otlara karşı kullanılmaları

Kültür bitkilerinin hastalık ve zararlılardan korunması, böylece kaliteli ve artan dünya nüfusunun beslenme ihtiyacını karşılayacak düzeyde ürün elde edilmesi amacıyla hastalık etmeni olan çeşitli zararlılar ve yabancı otlara karşı mücadele yöntemleri geliştirilmiştir. Mücadele yöntemlerinden birside kimyasal yöntemdir. Bunu kültürel ve biyolojik savaş yöntemleri izlemektedir. Tarım alanlarında yoğun olarak kullanılan pestisit, gübre ve bitki büyüme hormonlarının tarımsal ürünler üzerinde bıraktıkları kalıntılardan, toprağa, suya, havaya ve diğer canlılara olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bunun yanında, bitkinin ve toprağın verimliliğini ve direncini arttırıcı ve diğer canlılar için zararsız doğal bitki ekstraktlarından elde edilen maddeleri kullanmak biyolojik savaş yöntemlerinin amaçlarından birisidir [Türküsoy, 1998].

Soylu ve ark. (2006) domateste geç yanıklık hastalığına sebep olan *Phytophthora infestans* patojeninin neden olduğu harabiyeti kontrol etmede kullanılacak bir alternatif sentetik fungusitlerin bulunmasını amaçlanmışlardır. *Origanum syriacum* var. *bevanii*, *Thymbra spicata* subsp. *spicata*, *Lavandula stoechas* subsp. *stoechas*, *Rosmarinus officinalis*, *Foeniculum vulgare* ve *Laurus nobilis* gibi aromatik bitkilerin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağların *Phytophthora infestans* patojenine karşı antifungal aktivitesi çalışılmıştır. Bütün uçucu yağların türün dozuna bağlı olarak *Phytophthora infestans*'ın gelişimini engellediği

bildirilmiştir. Ayrıca fungusun spor üretimini de engellediği bildirilmiştir. Patojen hifler üzerinde yapılan ışık ve taramalı elektron mikroskop çalışmaları hiflerde sitoplazmik koagülasyon, vakualisyon (boşluk oluşması), hif büzülmesi ve protoplast sızması gibi pek çok morfolojik değişikliklerin olduğunu göstermiştir [Soylu, 2006].

Uçucu yağlar ve bileşim maddeleri besin endüstrisinde lezzet verici olarak ve güzel koku verici olarak kozmetikte geniş bir şekilde kullanılmaktadır [Cowan, 1999].

Portakal, ökalıptus, rezene, turnagagası, ardıç, nane, gül, kekik, saflaştırılmış terebentin uçucu yağlarının ve nanenin ana bileşeni olana mentolün antiplazmit etkisi araştırılmıştır. Antiplasmit etki *E. coli* F'lac bakteri suşları üzerinde araştırılmıştır. Nane yağının *E.coli* F'lac metabolik plazmit replikasyonunu inhibe ederek %37,5'e kadar azalttığı bildirilmiştir. Nane yağının bileşenleri mantol ve türevleridir. Bu nedenle mentolün antiplazmit etkiden sorumlu olup olmadığını karar verilmesi için saf mentolün etkisi araştırılmış ve mentolün %100'e yakın önemli bir antiplazmit etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu, mentolün antiplazmit etkide önemli rol oynadığını göstermektedir [Schelz, 2006].

Knio ve ark. (2007) *Ochlerotatus caspius* sahil sivri sineğinin kontrolünde çevresel güvenlik tedbiri olarak, Lübnan da mutfakta ve medikal olarak kullanılan bitkilerden elde edilen uçucu yağların potansiyelinin araştırmıştır. Maydanoz tohumu ve yaprakları, kekik, anason, tohumu ve kişniş meyvelerinden elde edilen uçucu yağların etkileri incelenmiştir. En çok etkili uçucu yağ kekik yağı olup bunu maydanoz tohum yağı, anason yağı ve kişniş meyve yağı olmak üzere test edilen bütün yağların *Ochlerotatus caspius*'a karşı LC₅₀: 15-156 ppm değerleri arasında güçlü larval aktivite gösterebilmiştir [Knio, 2007].

2.3.4. Uçucu yağların etki mekanizması

Birçok bitkiden elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri kapsamlı bir şekilde incelenmesine rağmen antimikrobiyal mekanizmaları çok detaylı rapor

edilmemiştir. Doğadaki uçucu yağların aktif antimikrobiyal bileşiklerinin fenoller ve terpenler olması bunların hareket tarzının diğer fenolik bileşiklerle benzer olabileceğini düşündürmektedir. Fenolik bileşiklerin hücre membranı üzerinde etkilidir. Fenolik bileşikler hücre duvarı ve hücre membranına bağlanmakla kalmaz; geçirgenlik ve riboz, sodyum glutamat gibi hücreler arası bileşiklerin salınımında ortadan kaldırır, enzim aktivitesi, protein ve nükleik asit sentezi, elektron taşınması, besin alınımı gibi membran fonksiyonlarına engel olur. Yani, aktif bileşikler bakterilerin inhibisyonuna neden olabilen birkaç istilacı hedeflere sahip olabilirler. Ayrıca hücreler arası materyal sızması, birçok antibakteriyal maddelerin neden olduğu genel bir olgu olup, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakterisinden elde edilen sızma oranlarıyla fenolik bileşiklerin konsantrasyonları arasında korelasyon olduğu gözlenmiştir [Denyar, 1991; Tassou, 2000].

2.2.5. Uçucu yağların radikal süpürücü etkisi

Reaktif oksijen türleri (ROS), serbest radikal olmayan hidrojen peroksit ve serbest radikal olan süperoksit iyonları ve hidroksil radikallerini içeren aktive edilmiş çeşitli oksijen türleridir. Canlı organizmalardaki çeşitli reaktif oksijen türleri farklı yönlerde biçimlenebilir. Serbest radikaller organizma içi veya dışından kaynaklanabilir. Normal oksijenli solunum ile uyarılmış polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar ve peroksizomlar tarafından iç kaynaklı serbest radikaller üretilir. Serbest radikallerin dış kaynaklarını tütün dumanı, iyonize radyasyon, bazı kirleticiler, organik çözücüler ve pestisitler oluşturur [Yıldırım, 2000].

Serbest radikaller gıdaların bozulmasına neden olan lipit oksidasyonuna neden olabilir. Lipid oksidasyonu, besinlerin kalitesini kaybetmesinin diğer bir ifadeyle renk, koku, tat, görünüş ve besin değeri gibi önemli özelliklerinin kaybolmasının nedenidir [Shahidi, 1995]. Bunun yanında reaktif oksijen türevleri sıtma, sonradan kazanılmış bağışıklık eksiklik sendromu, kalp hastalığı, inme (felç), diyabet, kanser, damar sertliği'nin dahil olduğu yüzden çok hastalıkla ilişkilendirilir [Yıldırım, 2000].

Reaktif oksijen türleri aşırı üretildiğinde doku zedelenmesine neden olabilir. Bununla beraber zedelenmiş doku da kendi kendine reaktif oksijen türlerinin üretimine sebep olabilir [Auroma, 1998]. Başta insanlar olmak üzere bütün aerobik organizmalar oksidatif hasarlara karşı koruyucu, çoğu hasarları yok eden antioksidant koruyuculara ve hasarlı moleküllerin tamiri ya da ortadan kaldırılması için tamir enzimlerine sahiptirler. Bununla beraber bu doğal antioksidan mekanizması etkili olmayabilir. Bundan dolayı besinle alınan antioksidan bileşikler önemli hale gelmiştir. Gıdaların işlenişinde kullanılan butil hidroksitoluen (BTH) ve butil hidroksi anizol (BHA) gibi sentetik antioksidan bileşikler olmasına rağmen bu maddelerin yan etkileride rapor edilmiştir. Bu nedenle doğal antioksidanların belirlenmesi çok önem kazanmaktadır [Yıldırım, 2000]. Ayrıca besinle antioksidanca zengin gıdaların alınması ve insanların hastalığa yakalanma oranı arasında ters bir ilişkinin olduğu ileri sürülmüştür [Rice, 1997].

Yıldırım ve ark. (2000) ıhlamur (*Tilia argentea*), adaçayı (*Salvia triloba* L.) ve ticari olarak Rize çayı ve Genç Filiz çayı adı verilen iki siyah çay (*Camellia sinensis*) sulu ekstrelerinin antioksidan etkileri karşılaştırılmıştır. Bütün örnekler antioksidan etki gösterebilmiştir. Çay ekstrelerinin her ikisi diğerlerinden daha yüksek antioksidan etki gösterirken aralarında önemli bir fark görülmemiştir [Yıldırım, 2000].

Salah ve ark. (2006) *Teucrium sauvagei* Le Houerou metanol ekstresinin ve uçucu yağının antioksidan aktivitelerini değerlendirmiştir. Metanol ekstraktın serbest radikalleri süpürücü etkisinin uçucu yağdan daha iyi olduğunu fakat sentetik antioksidan olan trolox kadar iyi olmadığı saptanmıştır. Uçucu yağın, metanolik ekstrenin ve trolox'un DPPH radikali üzerindeki etkileri sırasıyla %6,3-53,3, %8,0-8,5, %24,0-99,2 olarak saptanmıştır. Serbest radikallerin %50'sini gidermek için gerekli olan antioksidan değerleri uçucu yağların IC₅₀: 1mg/ml, metanolik ekstre IC₅₀: 0.104 mg/ml, trolox IC₅₀: 0.033 mg/ml olarak belirlenmiştir [Salah, 2006].

2.4. Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon yapımında çözücü olarak aseton, metanol, kloroform, etil asetat kullanılırken, bazen de petrol eter, diklorometan, diklorometan:metanol (9:1), kullanılmaktadır [Toroğlu, 2006].

Su, ekstraktı aktivitesi hemen hemen dünya çapında kullanılan bir çözücüdür. Evde kurutulan bitkiler çay olarak, nadiren renk verici ya da bitkilerin kaynamış çözeltilerinden buhar yoluyla tenefüs etmede kullanılabilir [Branther, 1994; Thomson, 1978].

Bitki bileşiklerinin bilimsel analizi mantıklı bir yol izlemelidir. Bitkiler rastgele ya da bitkilerin bulunmuş olduğu coğrafik alanlardaki bilir kişilerin sağladığı yollar takip edilerek toplanır. Bitkilerin olası antimikrobiyal aktiviteleri için başlangıçta sulu ya da alkol ekstraksiyonları yapılır. Bitkilerden mikroorganizmalara karşı aktif olarak teşhis edilen bileşiklerin hemen hemen hepsi aromatik ya da doymuş organik bileşikler olduğundan dolayı etanol ya da metanol ekstraksiyonu içinde elde edilirler. Çizelge 2.1’de ekstraksiyon çözücüler ve çalışma sonuçlarında rapor edilen sonuçta oluşan aktif fraksiyonlar verilmiştir [Cowan, 1999].

Çizelge 2.1. Aktif bileşik ekstraksiyonu için kullanılan çözücüler ve oluşan aktif fraksiyonlar

Su	Etanol	Metanol	Kloroform	Dikloroform	Eter	Aseton
Antosiyaninler	Taninler	Antosiyaninler	Terpenoidler	Terpenoidler	Alkaloidler	Flavonoller
Nişasta	Polifenoller	Terpenoidler	Flavonoidler		Terpenoidler	
Terpenoidler	Poliasetilenler	Saponinler			Kumarinler	
Poliipeptitler	Flavonol	Taninler			Yağa asitleri	
Lektinler	Terpenoidler	Flavonlar				
	Steroller	polifenoller				
	Alkaloidler					
	Reçineler					

Bitkilerin herhangi bir parçası aktif bileşik içerebilir. Örneğin; ökaliptus yaprakları uçucu yağları ve taninleri için toplanırken, ginseng bitkisinin kökleri aktif saponinler ve uçucu yağlar içermektedir [Thomson, 1978].

Alkolik ekstraksiyonlar için bitki kısımları kurutulur ve sonra etanol yada metanolde ıslatılır. Sonra bu ekstre filtre edilir ve yıkanır, sonra alçak basınç altında kurutulabilir ve konsantrasyonu belirlenmiş alkolde tekrar tekrar çözülebilir. Ekstraksiyon için su kullanıldığı zaman bitkiler genellikle distile su içinde ıslatılır, kurutma kağıdı ile kurutulur, karıştırılarak ekstre haline getirilir ve filtre edilir. Filtrat arıtma için bir çok kere santrifüj edilmelidir. Ham ürünler sonra disk difüzyon ve broth dilisyon yöntemlerinde antifungal ve antibakteriyal özelliklerinin belirlenmesinde ve antiviral aktivitesinin taranması yöntemlerinden birinde kullanılabilir [Cowan, 1999].

Saflaştırılan materyallerin kimyasal analizleri için teknikler, kromatografi, biyootografi, radyoimmünoassay, yapı teşhisi için çeşitli yöntemler ve hızlı atom bombardımanlı kütle spektrometresi, çift kütle spektroskopisi, HPLC, kapiler bölge elektroforezi, nükleer magnetik rezonans spektroskopisi gibi araçları içerir [Rineart, 1990; Borris, 1996].

2.5. Antimikrobiyal Aktivite ve Test Yöntemleri

Dirençli bakteriyal türlerin gelişiminden dolayı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi üzerinde yayınlanmış raporların sayısında bir artış vardır [Eloff, 1998]. Bitkilerin antimikrobiyal aktivitesi, mikroorganizmalarla temas halinde yerleştirilen bitki kültürlerine veya ekstraktlarına karşı çeşitli mikroorganizmaların geliştirdiği tepkinin göz önüne alınmasıyla ortaya çıkarılabilir [Dey, 1991].

Bitki ekstraktlarındaki antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için:

1-İlk olarak ekstraktın seçilen mikroorganizmaların hücre duvarıyla temas etmesi sağlanır.

2-Antimikrobiyal ajanların olmadığı, mikroorganizmaların gelişebileceği ortamlar hazırlanır.

3- Gelişim miktarının bazı belirleyicileri olmalıdır [Skinner, 1955].

Uçucu yağların antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi ve test edilmesi uçucu olmaları, suda çözünmemeleri ve kompleks olmalarından dolayı zordur. Uçucu yağların test edilmesinde özellikle; test tekniği, gelişme ortamı, mikroorganizma ve uçucu yağ olmak üzere dört faktör önem taşır [Janssen, 1986].

Aktivitenin belirlenmesi için birçok yöntem vardır. Fakat bu yöntem eşit duyarlılıkta yada aynı prensiplere bağlı değildir. Kullanılan test tekniği genellikle, uçucu yağların suda homojen bir dağılım gerektirip gerektirmemesine göre sınıflandırılır. Ayrıca steril örneklerin gerekli olup olmamasına bağlı olarak da sınıflandırılabilir.

1- Suda homojen bir dağılıma gerektirmeyen teknik *difüzyon* yöntemidir. Bu yöntemde test edilecek bitki ekstraktını içeren bir rezervuarın inoküle edilmiş ortam ile temas etmesi sağlanır. İnkübasyondan sonra rezervuar etrafındaki şeffaf zon çapı ölçülür. Filtre kağıt diskler, ortama yerleştirilmiş porselen yada paslanmaz çelik silindirler ve ortamda açılmış kuyucuklar gibi farklı tipte rezervuarlar kullanılmaktadır. Bütün bu durumlarda yağ miktarı ve rezervuarların çapı önemli parametrelerdir. Bazı çalışmalarda bir filtre kağıdı'nın emdiği yağ miktarları hesaplanmıştır [Dey, 1991; Janssen, 1986] (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Büyüklüklerine göre bir filtre kağıdı'nın emdiği yağ miktarı

Kağıt disk çapı	Miktar
4 mm	3.3 mg
5 mm	4-10 µl
5 mm	2 mg
6 mm	2-3 µl
6 mm	2,5-5 µl
6 mm	20 µl
9.5 mm	20 µl

2- Suda homojen bir dağılma gerektiren teknikler, minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIC) yada minimal latent konsantrasyonu (MLC) değerlerini, mikroorganizmaların gelişim eğrilerini, gelişimi engelleyen özellikleri, fungal gelişimin oluşumundan önceki periyot ve antiseptik aktivitenin belirlenmesinde kullanılan *dilüsyon tekniği* olarak adlandırılır. Homojen sistemlerde çeşitli test yöntemleri uygulanmakla beraber daha çok MIC ya da MLC değerleri belirlenir. MIC inhibitörlere organizmaların duyarlılığını ölçmek için kullanılan ve kabul edilen bir kriterdir. Bununla birlikte genel olarak MIC önemli bir organizmanın gelişimini inhibe etmede gerekli olan antimikrobiyal düzeylerin kalitatif bir indikatörüdür. İnkübasyon sıcaklığı, inoküle edilen organizmanın sayısı ve büyüklüğü gibi birçok faktör elde edilen MIC değerlerinin etkilemektedir [Dey, 1991; Janssen, 1987].

Dilüsyon metoduyla çeşitli test mikroorganizmaları aynı seyreltmede test edilebilir. Bazı araştırmacılar çok noktalı bir inokülasyon sistemi kullanır. Bu yöntemle 25 kadar farklı mikroorganizma 9 cm çaplı agar levhalarına inoküle edilebilir. Ayrıca sınırlandırılmış sayıdaki mikroorganizmaların testi için miniplateler kullanılabilir. 96 kuyucuk içeren mikrotitrasyon petrilerinde aynı zamanda 12 yada 24 den daha az olmayan mikroorganizmalara karşı bir yada iki bitki ekstraksiyonunun üç dilüsyonunun testi yapılabilir [Dey, 1991].

3- Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde diğer bir yöntem *biyootografi yöntemi* dir. Bir kromatogram üzerinde lokalize antibakteriyal aktivite için bir yöntem olan biyootografi mikroorganizmalardan yeni antibiyotiklerin araştırılmasında yaygın uygulamaları bulunur. Yayınlanmış birçok yöntem agar difüzyon tekniğini dayandırılır ki bu şekilde bir difüzyon işlemi boyunca antimikrobiyal ajan ince tabaka üzerinden ya da kağıt kromatogram üzerinden inoküle edilmiş agar levhaya transfer edilir. Daha sonra inhibisyon zonları ayırt edici uygun boyalarla görülebilir hale getirilir. Bileşiklerin kromatogramdan agar levhasına farklı difüzyonlarından dolayı oluşan problemler kromatografik tabaka üzerinde doğrudan biyootografik belirleme ile kolaylaştırılabilir. Bununla beraber bu yöntem çok kompleks biyolojik ekipman gerektirir ve havada üreyen bakterilerden kontaminasyonla etkilenebilir [Dey, 1991].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Araştırmada materyal olarak kullanılan *Bellis perennis* türleri Türkiye'nin Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçer, Antalya/Alanya olmak üzere dört farklı lokalitesinden toplanmıştır. Bitki teşhisleri Gazi üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mecit VURAL tarafından yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan örneklerin lokaliteleri, toplama tarihleri, habitatları, toplayıcı adı ile birlikte Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışma örnekleri, lokaliteleri, toplama tarihleri, habitat, toplayıcı adı

	Bitki İsmi	Lokale - Tarih (T)	Habitat	Toplayıcı adı
1	<i>Bellis perennis</i>	Rize/İkizdere/Dereköy 12.08.06	Çayırılık alan	Neslihan Kavalcıoğlu
2	<i>Bellis perennis</i>	Rize/ İkizdere/ Köhçer 13.08.06	Çayırılık alan	Neslihan Kavalcıoğlu
3	<i>Bellis perennis</i>	Rize/ İkizdere/ Sivrikaya 13.08.06	Çayırılık alan	Neslihan Kavalcıoğlu
4	<i>Bellis perennis</i>	Antalya/Alanya/Değirmenözü Mah./Okul Bahçesi 08.03.06	Çayırılık alan	Bilgehan Bilgili

3.1.2. Moleküler çalışmalar için tampon ve çözeltiler

DNA izolasyonu için gerekli çözeltiler

- Stok Tris çözeltisi: 500 mM Tris (pH: 8.0)
- Stok EDTA tamponu: 500 mM EDTA (Etilendiamin-tetra asetik disodyum tuzu), 5M NaOH (pH: 8.0)

- Ekstraksiyon tamponu: 50 mM Tris (pH:8), 50 mM EDTA (pH:8), 100 mM NaCl
- Fenol-Kloroform (1:1) çözeltisi: Fenol ve Kloroform 1:1 oranında karıştırılır.
- %99.5 Etanol
- TE tamponu: 10 mM Tris (pH:8), 1mM EDTA (pH:8)

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler

- Nükleotid karışımı: 25 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
- MgCl₂: 25 mM
- Taq polimeraz tamponu 10 x: 100 mM Tris- HCL (pH:8,3), 500 mM KCl, 1mg/ml Jelatin.
- Taq polimeraz: 5u/μl
- Primerler: Kullanılan primerler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. RAPD-PZR’da kullanılan primerler ve dizileri

Primerin Adı	Primerin Dizisi (5'→ 3')
A1	CAGGCCCTTC
A2	TGCCGAGCTG
A7	GAAACGGGTG
B4	GGACTGGAGT
B6	TGCTCTGCCC
B7	GGTGACGCAG
B18	CCACAGCAGT
LA-1	GGGTAACGCC
LA-12	ACGACCCACG
LA-13	CACCACGCCT
OPA07	GAAACGGGTG
OPA17	GACCGCTTGT
OPB05	TGCGCCCTTC
OPB08	GTCCACACGG
OPB10	CTGCTGGGAC
OPC02	GTGAGGCGTC
OPO04	AAGTCCGCTC
OPO06	CCACGGGAA
OPW06	AGGCCCGAT
OPI18	TGCCCAGCCT
OPU16	CTGCGCTGGA
OPW10	TCGCATCCCT
OPR03	ACACAGAGGG
SCO23	
SCI1079	CGCCACGTTC
M13	GAGGGTGGCGTTCT

Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler

- Agaroz: % 0.8 ve % 2 (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazılanır.
- Tris asetat (TAE) tamponu: 242g Tris base, 57,1 ml Glasial asetik asit, 100 ml 0.5M EDTA (pH:8), saf su
- Yükleme tamponu: % 40 sukroz, % 0.025 bromfenol mavisi, % 0.25 ksilen siyanol

- Etidyum bromür: 10mg/ml derişimde hazırlanır. Koyu renkli şişelerde muhafaza edilir.

3.1.3. Antimikrobiyal testler için kullanılan besiyerleri ve kimyasal maddeler

Muller Hinton Broth

Et ekstresi.....2.0 gr

Kazein hidrolizatı.....17.5 gr

Nişasta.....1.5 gr

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

121 °C basınçta 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 10'ar ml steril tüplere dağıtılmıştır.

Muller Hinton agar

Et ekstresi.....5 gr

Agar.....12.0 gr

Kazein hidrolizatı.....17.5 gr

Nişasta.....1.5 gr

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır

121 °C basınçta 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 15'er ml 90 mm çapındaki steril petrilere dağıtılmıştır.

Sabouraud Dextrose Agar

Bacto pepton.....10 gr

Bacto Dekstroz.....40 gr

Bacto Agar.....15 gr

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır

121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir

TTC Tuzu

2,3,5- Triphenyltetrazolium chlorid.....250 mg

Etanol (%96).....100 ml

Madde tartılarak etanol de iyice çözülmüş ve spreylilikli cam şişede içinde buzdolabında saklanmıştır.

Mc Farland No: 0.5 bulanıklık standardı

BaCl₂ (%1.175).....0.5 ml

H₂SO₄.....99.5 ml

BaCl₂ ve H₂SO₄ karıştırılarak 15 ml'lik kapaklı tüplere dağıtılır. Kapağı parafilm ile kapatılan tüp, karanlıkta oda sıcaklığında saklanır.

3.1.4. Sterilizasyon

Steril kullanılması gereken tüm tampon ve çözeltiler 121°C basınçta 20 dakika sterilizasyona tabi tutulmuştur.

3.2. Metot

3.2.1. Polen analizi

Taramalı elektron mikroskobu için polen taneleri kurutulmuş ve çift yönlü bantla yapıştırıldıktan sonra altınla (Polaron SC502 Sputter Coater) kaplanmıştır. Genel terminoloji takip edilmiştir. SEM incelemeleri Gazi Üniversitesi taramalı elektron mikroskobunda (JEOL JSM 6060 LV) yapılmıştır.

3.2.2. Bitki yapraklarından DNA izolasyonu

CTAB yöntemi

Bu yöntemde bitki materyallerinin genomik DNA izolasyonları Clark'ın (1997) önerdiği yöntemde göre yapılmıştır. Farklı lokalitelere ait kuru yapraklar havanda dövülerek toz haline getirilmiş ve steril ependorf tüplerine alınmıştır. Her bir tüpe 1ml 1xCTAB ekstraksiyon tamponu ilave edilerek ve 65 °C de 90 dakika su

banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Üzerine kloroform:izoamilalkol (24:1) karışımından ilave edilmiştir. 5 dakika 10.000rpm de santrifüjlenerek üst faz temiz ependorf tüpüne alınmıştır. Üzerine izopropanol ilave edilerek 40 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve daha sonra 5000 rpm de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım dökülmüştür. Üzerine % 76'lık alkol ilave edilmiş ve 20 dakika buzda bekletilmiştir. 5000 rpm de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım uzaklaştırılmıştır. Pellete %70 lik alkol konularak tekrar 5000 rpm de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve tüpler kurutulmuştur. Kurutulan tüplere TE (Tris-EDTA) tamponu eklenmiş ve -20 C de saklanmıştır.

3.2.3. DNA derişim tayini

NanoDrop spektrofotometresi ile 260 nm de ölçümler yapılmıştır. Buna göre $A_{260} : 1$ olduğunda DNA miktarı 50 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. DNA saflığı $A_{260} / A_{280} =$ formülü ile hesaplanmıştır. Elde edilen değer 1,8'e eşitse saf DNA elde edildiğine karar verilmiştir [Maniatis, 1989].

3.2.4. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu

RAPD-PZR uygulamaları için Williams 'ın (1990) önerdiği yöntem kullanılmıştır. 25 mM dNTP'den 1ul (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 25 mM MgCl_2 'den 4 ul, 5u/ μl Taq polimeraz'dan 0,1 ul ,Taq polimeraz (5u/ml) tamponundan 5 ul alınmış ve Çizelge 3.2'de verilen primerlerle karışım hazırlanmıştır. Çizelge 3.2'de baz dizilimleri verilen rastgele seçilmiş primerlerin her biri ile hedef DNA'nın herhangi bir bölümü rastgele çoğaltılmıştır.

Uygulanan PZR progamı:

96 C 'da	40 saniye	45 döngü
30 C 'da	40 saniye	
72C 'da	40 saniye	

Elde edilen PCR ürünleri -20 C de saklanmış ve agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir.

3.2.5. Agaroz jel elektroforezi

% 2 (w/v) agaroz, TAE tamponu içinde kaynatılarak çözüldükten sonra 1 µl etiyum bromür çözeltisi eklenmiş ve jel tabağına dökülmüştür [Maniatis, 1989]. Jel polimerleştikten sonra 15 µl PZR ürünü ile yükleme tamponu karıştırılarak jelde oluşan kuyucuklara yüklenmiş ve 40-90 V arasında serbest akımda yürütülmüştür. Jellerin görüntülenmesi BioDoc Analyze (Biometra) görüntüleme cihazında yapılmış ve bilgisayar ortamında fotoğrafları alınmıştır.

3.2.6. Genetik uzaklık tayini

Çalışma boyunca her tür için her bir primer ile elde edilen PZR ürününün jel üzerinde oluşturduğu DNA bantları birbiriyle karşılaştırılmış ve bant varlığında 1, yokluğunda ise 0 olarak sayılmıştır. Türler arasındaki genetik uzaklıklar POPGEN bilgisayar programı kullanılarak hesaplanmış ve UPGMA ile türler arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogramlar oluşturulmuştur [Nei, 1992].

3.2.7. Uçucu yağların elde edilmesi

Bellis perennis'in herba kısımlarının uçucu yağları Clevenger cihazında elde edilmiştir. Koyu renkli şişelerde +4 °C de saklanmıştır.

3.2.8. Uçucu yağların antimikrobiyal etkileri

Mikrobroth seyreltme tekniği

Kültürler canlandırılmak üzere -80° C den çıkarılarak içinde MHA bulunan petrilere ekilerek, 37°C de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra gelişen kolonilerden alınarak 10 ml MHB bulunan tüplere aktarılmış ve 37 °C de

inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besiyerinde gelişen kültürler MHB bulunan tüplerde McFarland No: 0.5 (yaklaşık 10^8 cfu/ml) bulanıklığına göre ayarlanmıştır. Kullanılan mikroorganizmalar (Anadolu Üniversitesi Farmakognozi bakteri ve fungi koleksiyonundan temin edilmiştir) Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Denenecek uçucu yağlar steril flakonlarda tartıldıktan sonra DMSO (%25, %100), metanol ve MHB içinde çözülerek stok çözeltileri elde edilmiştir. Elde edilen stok çözeltilerden başlayarak uçucu yağların içinde MHB bulunan mikrotitrasyon petrilerinde iki katlı seri seyreltmeleri hazırlanmıştır. Seyreltilen karışımlardan her bir kuyucuğa 100’er µl aktarılmıştır. Ayrıca mikroorganizmaların kontrolü için sadece 100 µl MHB koyulmuştur. Denenecek uçucu yağların yanı sıra çözücüler ve bakteriler için standart antibiyotik olan kloramfenikol kullanılmıştır. Tüm konsantrasyonlar kuyucuklara aktarıldıktan sonra mikroorganizma kültürleri bir kuyucuk satırına bir mikroorganizma gelecek şekilde 100’er µl aktarılmıştır. Son sütün mikroorganizma kontrolüne ve son satıdra maddenin kontrolüne ayrılmıştır. Daha sonra mikrotitrasyon petrileri parafilmle kapatılarak 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Üremenin varlığının ya da yokluğunun daha iyi gözlemlenmesi için 100’er µl TTC (2,3,5-Trifeniltetrazolyum klorit) tuzu aktarılmıştır. Renklenmeyen alanlar üremenin olmadığı konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir [Beşe, 1989; Dorman, 2000; İşcan, 2000]

Çizelge 3.3. Biyolojik aktivite için kullanılan mikroorganizmalar ve kaynakları

	Mikroorganizma*	Suş No	Ortam	Sıcaklık	
1	<i>Eschericia coli</i>	NRRL B-3008	MHA	37 °C	Patojen
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	MHA	37 °C	Patojen
3	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	ATCC 27853	"	"	"
4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	NRRL 3567	"	"	"
5	<i>Proteus vulgaris</i>	NRRL B-123	"	"	"
6	<i>Salmonella tpyhimirium</i>	ATCC 13311	"	"	"
7	<i>Bacillus cereus</i>	NRRL B-3711	"	"	"
8	<i>Candida albicans</i>	NRRL, Maya	MHA	"	"
9	<i>Aspergillus flavus</i>	ATCC 9807	SGA	26-28	

* Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

MHA: Mueller Hinton Agar SGA: Sabouroud Dextrose Agar

Kağıt disk difüzyon yöntemi

Agar difüzyon tekniği *Aspergillus flavus* fungusuna karşı antimikrobiyal etkinin denenmesinde kullanılmıştır. Önce 120 mm çapındaki steril cam petrilere steril edilmiş 25 ml Sabouraud Dextrose Agar (SDA) dökülmüş ve petri düz bir zemin üzerinde donmaya bırakılmıştır. Besiyeri'nin katılaşmasından sonra önceden hazırlanmış spor çözeltisi (10^7 spor/ml) 500 µl besiyeri yüzeyine aktarılarak drigalski spatülü ile sporların besiyerine yayılması sağlanmıştır. Daha sonra steril kabin içinde kapağı yarı açık halde kurumaya bırakılmıştır. Yüzeyi kurumuş olan besiyerine önceden hazırlanmış olan, stok çözeltilerden 5µl emdirilmiş yaklaşık 6mm çapındaki steril kağıt diskler yerleştirilmiştir. Standart antifungal olan ketokonazol pozitif kontrol olarak kullanılmıştır [Demirci, 2002].

3.2.9. *Bellis perennis* uçucu yağları ve metanol ekstresinin serbest radikal süpürücü etkisi

Maddelerin muhtemel serbest radikal süpürücü etkisini belirlemek amacıyla 0.5 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan maddeler İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) plaklarına uygulanmış ve 1,1,- Difenil-2-pikril Hidraliz (DPPH) çözeltisi püskürtülerek kalitatif olarak ön tarama testleri yapılmıştır. Aktif olduğu görülen bileşiklerin UV-spektroskopik mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak kantitatif olarak inhibisyon konsantrasyonları standartlara karşı belirlenmiştir [Kumarasamy, 2002].

Kalitatif yöntem

Her bir test örneğinin stok çözeltilerden ve kontrol grubundan silika jel üzerine 1 ml uygulanmıştır ve çözücünün buharlaşmasının tamamlanması için havada kurutulmuştur. Her bir örneğin üzerine % 0.2'lik DPPH püskürtülmüştür. Kontrol olarak Vitamin C (0.5mg/ml) kullanılmıştır.

Kantitatif yöntem

Her bir test örneğinin stok çözeltilerin son konsantrasyonları 0.5 mg/ml olacak şekilde hazırlandı ve 96 kuyucuklu levhanın ilk sırasına her bir test çözeltisinden 100µl aktarılmıştır. Multikanal pipet kullanılarak eşit miktardaki metanollerde 10 kat seridilüsyonları hazırlanmıştır ve beş dakika vortekslenmiştir. Son konsantrasyonu 80 µg/ml olan bir belirleyici stok çözelti elde etmek için 25 ml metanolde 2mg DPPH çözülmüştür. Reaksiyonun başlaması için DPPH çözeltisinden her bir kuyucuğa 100µl eklenmiş ve 30 dakika karanlık ortamda bırakılmıştır. Vitamin C aynı konsantrasyonda pozitif kontrol olarak, DPPH+metanol (MeOH) negatif kontrol olarak ve yalnızca metanol (MeOH) aynı test levhası üzerinde kör olarak kullanılmıştır. Mikroplate spektrofotometre (Biotek, Poverwawe) kullanılarak 517 nm’de UV absorbansı okunmuştur. Deney birkaç kez tekrarlı yapılmıştır. İstatistiksel değerler ve hesaplamalar için Gen5 Data Analysis programı (BioTek) kullanılmıştır. %50 inhibisyon konsantrasyonu değeri (IC₅₀) aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$IC_{50}: [(A_0 - A_1)] \times 100$$

A₀: Kontrol absorbansı

A₁:Test örneğinin absorbansı [Kumarasamy ve ark. 2002].

3.2.10. Uçucu yağların analizi

Analiz koşulları

Uçucu yağlar Agilent 5975 GC-MSD cihazında kapiler eş zamanlı GC ve GC/MS sisteminde analiz edilmiştir.

Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi Analiz Şartları

Agilent 5975 GC-MSD sisteminde Innowax FSC kolon (60 m x 0.25 mm, 0.25 µm film kalınlığı) ve taşıyıcı gaz olarak helyum (0.8 ml/dk) kullanılmıştır. GC fırın sıcaklığı 60°C’de 10 dk tutulup daha sonra 4°C/dk artış ile 220°C ulaştıktan sonra aynı sıcaklıkta tekrar 10 dk sabit tutulmuştur. 240°C’ye ise 1°C/dk’lık artışı

programlanmıştır. Split oranı 40:1 olarak uygulanmıştır. Enjeksiyon port sıcaklığı ise 250°C'ye ayarlanmıştır. Kütle spektrumları 70 eV'da ve 35-450 m/z kütle aralıklarında kayıt edilmiştir

Gaz Kromatografisi Analiz Koşulları

Agilent 6890N GC sistemi kullanılmıştır. GC-MS ile aynı elüsyon sırasını sağlayabilecek koşullarda aynı kolon ve eş zamanlı enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Alev iyonlaşma detektörü (FID) 300°C'ye ayarlanmıştır.

Bileşiklerin teşhis ve tayini

Değerlendirme işlemleri "Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi"'nin yanı sıra Wiley GC/MS, Adams ve MassFinder 2.1 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılarak yapılmıştır (1-3). Relatif tutunma indislerinin (RRI) hesaplanmasında *n*-alkanlar referans olarak kullanılmıştır. Ayırımı gerçekleşmiş maddelerin relatif yüzde miktarları ise FID kromatogramından elektronik olarak hesaplanmıştır [McLafferty, 1989; Adams, 2001; Joulain, 2001].

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bitkilerin teşhisi

Türkiye Florasındaki teşhis anahtarları kullanılarak bitkiler teşhis edilmiştir. Buna göre, Rize Sivrikaya, Rize Köhçer, Rize Dereköy ve Antalya Alanya'dan toplanan örnekler *Bellis perennis* olarak isimlendirilmiştir. Aynı tür olmalarına rağmen aralarında varyasyon olup olmadığı polen morfolojileri ve RAPD-PZR tekniği kullanılarak araştırılmıştır.

Polen Morfolojisi

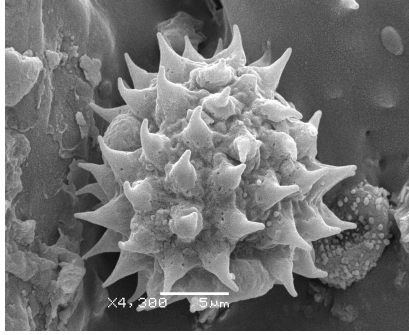
Rize/Dereköy, Rize/Sivrikaya, Rize/Köhçer ve Antalya/Alanya lokalitelerden toplanan *Bellis perennis* örneklerinin polen morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (JEOL JSM 6060 LV) ile incelenerek fotoğrafları çekilmiştir (Resim 4.1). SEM incelemeleri ışığı altında türlerin polen ölçümleri yapılmıştır (Çizelge 4.1). SEM incelemeleri sonucu Sivrikaya örneğinin polar eksen uzunluğu 21µm, ekvatorial eksen uzunluğu 22 µm, polen şekli sferoid, ornamentasyon ekinat-perforat, omurga uzunluğu 3-4 µm, perforasyon 4-5 µm², apartür tipi trikolporat olarak, Köhçer örneğinin polar eksen uzunluğu 20µm, ekvatorial eksen uzunluğu 20 µm, polen şekli sferoid, ornamentasyon ekinat-perforat, omurga uzunluğu 3-4 µm, perforasyon 2-3 µm², apartür tipi trikolporat olarak, Dereköy örneğinin polar eksen uzunluğu 22 µm, ekvatorial eksen uzunluğu 23 µm, polen şekli sferoid, ornamentasyon ekinat-rugulat-perforat, omurga uzunluğu 2.5-3, perforasyon 4-5 µm², apartür tipi trikolporat olarak, Antalya örneğinin polar eksen uzunluğu 20 µm, ekvatorial eksen uzunluğu 25 µm, polen şekli oblat, ornamentasyon ekinat-perforat, omurga uzunluğu 3-4 µm, perforasyon 7-8 µm², apartür tipi trikolporat olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, Rize/Dereköy örneğinin polen ornamentasyonunun Rize/Sivrikaya, Rize/Köhçer ve Antalya/Alanya örneklerinden farklı bulunmuştur.

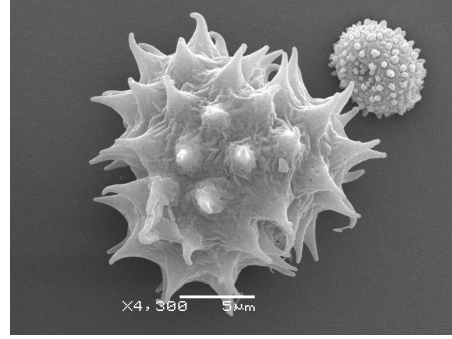
Çizelge.4.1. Farklı lokalitelerdeki *Bellis perennis* türlerinin polen ölçümleri

Lokalte	P (μm)	E (μm)	Polen şekli	Ornamentasyon	Omurga uzunluğu	Perforasyon (μm^2)	Açıklık tipi
Rize/Sivrikaya	21 μm	22 μm	Sferoid	Ekinat-perforat	3-4 μm	4-5	Trikolporat (operkulat)
Rize/Köhçer	20 μm	20 μm	Sferoid	Ekinat-perforat	3-4 μm	2-3	Trikolporat (operkulat)
Rize/Dereköy	22 μm	23 μm	Sferoid	Ekinat-Rugulat- Perforat	2.5-3 μm	4-5	Trikolporat (operkulat)
Antalya/Alanya	20 μm	25 μm	Oblat	Ekinat-perforat	3-4 μm	7-8	Trikolporat (operkulat)

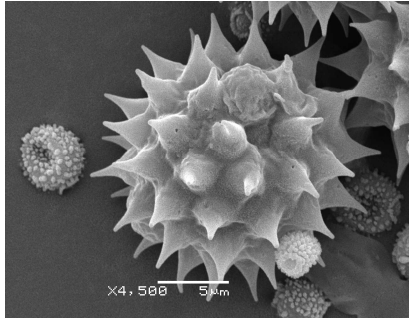
P: Polar eksen, E: Ekvatorial eksen



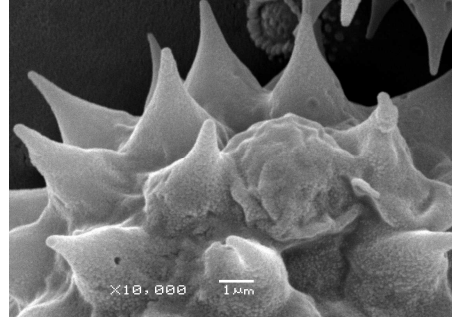
a)



b)

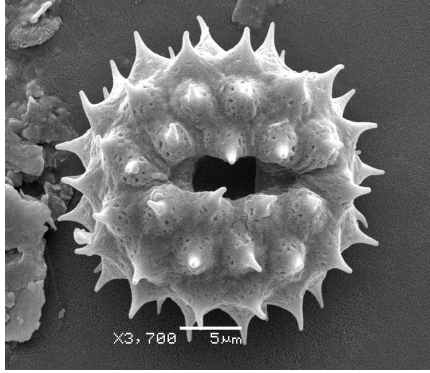


c)

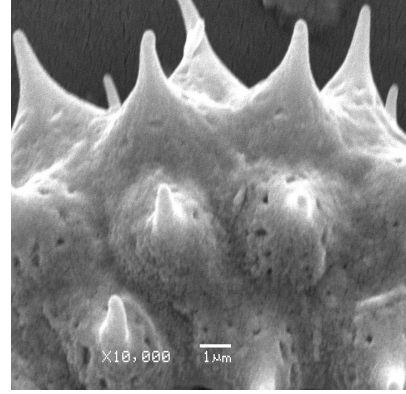


d)

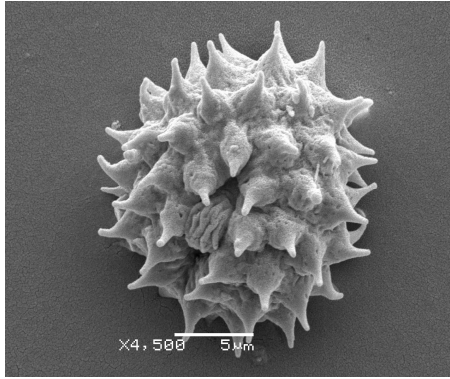
Resim 4.1. *Bellis perennis* polenlerinin SEM (Taramalı Elektron Mikroskop) görüntüleri, a) Rize/Sivrikaya, b) Rize/Sivrikaya, c) Rize/Köhçer, d) Rize/Köhçer



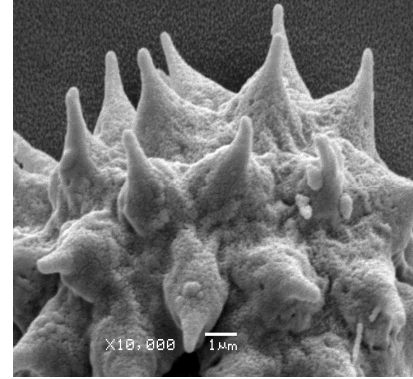
e)



f)



g)



h)

Resim 4.1 (Devam). *Bellis perennis* polenlerinin SEM (Taramalı Elektron Mikroskop) görüntüleri, e)Antalya/Alanya, f) Antalya/Alanya, g) Rize/Dereköy, h) Rize/Dereköy

Bellis perennis türlerine uygulanan RAPD-PCR analizi

Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçer, Antalya/Alanya olmak üzere Türkiye'nin dört farklı lokaliteden toplanan *Bellis perennis* türlerine ait bireylerden

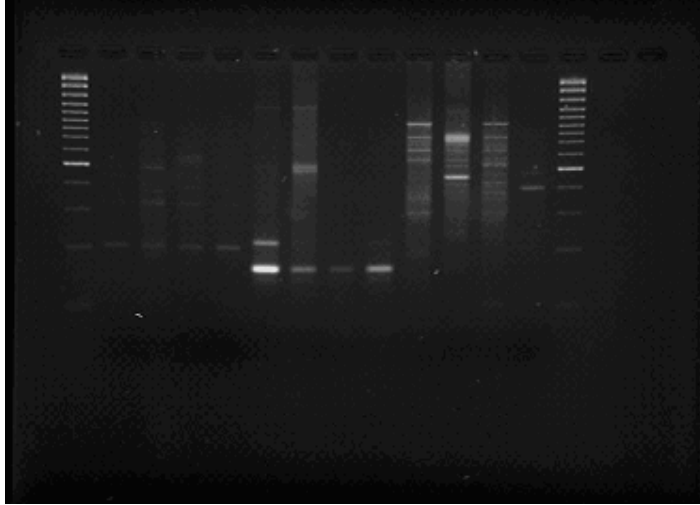
DNA izolasyonu yapılmış ve 26 ayrı rastgele primer ile DNA'ları çoğaltılmıştır. RAPD-PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek DNA görüntüleme cihazında ultraviyole ışığında bakılarak fotoğrafları çekilmiştir (Resim 4.2, Resim 4.3, Resim 4.4, Resim 4.5).

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucu A2, OPA07, OPA17, OPB10, OPC02, OPO04, OPU16, OPW10, OPR03, M13 primerlerinin polimorfik bantlar verdiği gözlenmiştir. PZR reaksiyonu sonucu primerlere göre pozitif/negatif reaksiyon gösteren örnekleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Buna göre OPW06 primerleri ile, Rize/Köhçer, Rize/Dereköy ve Antalya/Alanya örnekleri pozitif reaksiyon verirken Rize/Sivrikaya örneği pozitif reaksiyon vermemiştir. B18 primeri ile Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy ve Antalya/Alanya ile pozitif reaksiyon verirken, Rize/Köhçer örneği pozitif bir reaksiyon vermemiştir. LA-12 ve OPO06 primerleri ile Rize/Sivrikaya, Rize/Köhçer ve Antalya/Alanya örnekleri pozitif reaksiyon verirken Rize/Dereköy örneği pozitif bir reaksiyon vermemiştir. OPW06 primeri ile Rize/Köhçer Rize/Dereköy ve Antalya/Alanya örnekleri pozitif reaksiyon verirken Rize/Sivrikaya örneği pozitif reaksiyon vermemiştir. A2, OPA07, OPA17, OPB10, OPC02, OPO04, OPU16, OPW10, OPR03, M13 primerleri ile bütün örnekler pozitif reaksiyon verirken A1, A7, B4, B6, LA-1, LA-13, OPB5, OPB08, OPI18 SCO23, SC1079 primerleri ile *Bellis perennis* türünün çalışılan hiçbir türü pozitif reaksiyon göstermemiştir.

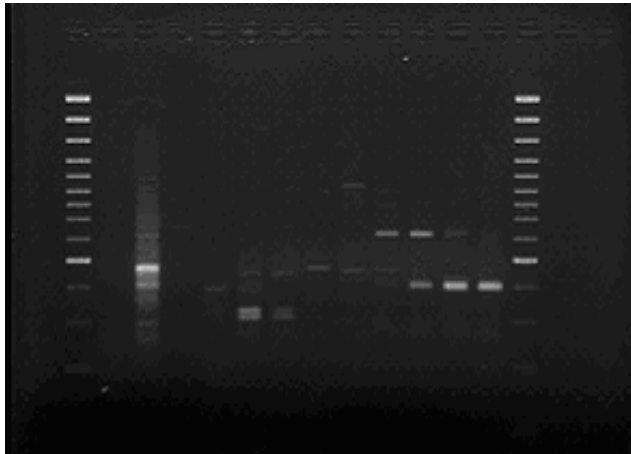
Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçer, Antalya/Alanya olmak üzere Türkiye'nin dört farklı lokalitesinden toplanan *Bellis perennis* türlerinin pozitif reaksiyon verdiği A2, B7, OPA07, OPA17, OPB10, OPC02, OPO04, OPU16, OPW10, OPR03, M13 primerleri ile yapılan RAPD-PZR sonucunda türlerin jel üzerinde oluşturduğu DNA bantları birbirleriyle karşılaştırılarak her bir bantın her tür için varlığı 1, yokluğu 0 olarak sayılmış türler arasındaki genetik uzaklık POPGEN istatistik programı kullanılarak hesaplanmış (Çizelge 4.3) ve genetik benzerliklerine göre dendogram oluşturulmuştur (Şekil 4.1).

Buna göre *Bellis perennis*/Rize/Sivrikaya örneğinin Rize/ Köhçer, Rize/Dereköy ve Antalya/Alanya örneklerine olan genetik uzaklığı sırasıyla 0,5390, 0,6931,

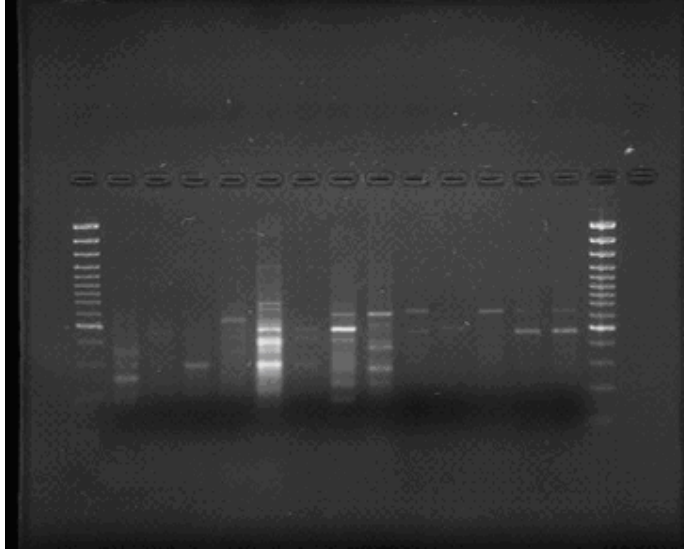
0,7621'dir. Rize/Köhçer örneğinin Rize/Dereköy ve Antalya/Alanya örneklerine olan genetik uzaklığı, 0,7985, 0,6604'dir. Rize/Dereköy örneğinin Antalya/Alanya örneğine olan genetik uzaklığı 0,7621'dir (Çizelge 4.3). Rize/Dereköy örneği diğerlerinden en uzak bulunmuştur.



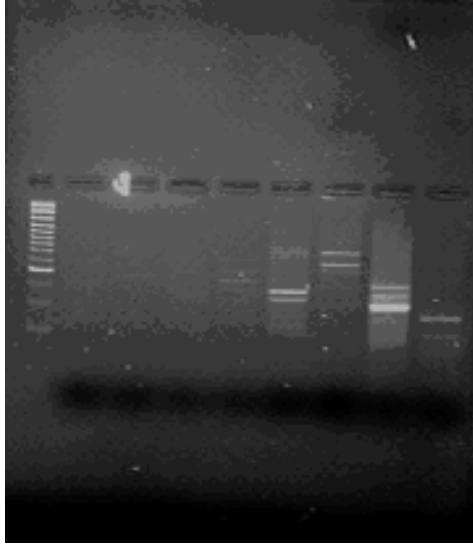
Resim 4.2. Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçer, Antalya/Alanya olmak üzere Türkiye'nin dört farklı lokaliteden toplanan *Bellis perennis* türlerinin OPC0₂, M13, OPO04 primerleri ile yapılan RAPD-PCR ürünleri



Resim 4.3. Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçer, Antalya/Alanya olmak üzere Türkiye'nin dört farklı lokaliteden toplanan *Bellis perennis* türlerinin OPU16, OPW10, OPR03 primerleri ile yapılan RAPD-PCR ürünleri



Resim 4.4. Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçer, Antalya/Alanya olmak üzere Türkiye'nin dört farklı lokaliteden toplanan *Bellis perennis* türlerinin A2, OPA07 primerleri ile yapılan RAPD-PCR ürünleri



Resim 4.5. Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçer, Antalya/Alanya olmak üzere Türkiye'nin dört farklı lokaliteden toplanan *Bellis perennis* türlerinin OPA10, OPA17 primerleri ile yapılan RAPD-PCR ürünleri

Çizelge.4.2. Dört farklı lokaliteden toplanan *Bellis perennis* türlerinin RAPD-PCR işlemleri sonucunda elde edilen sonuçlar

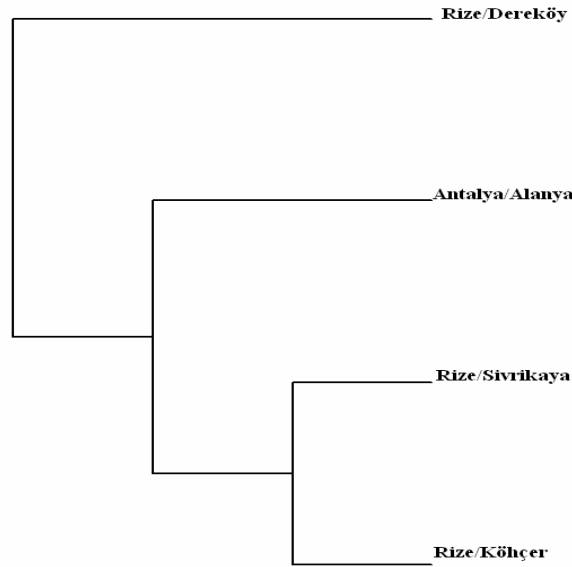
1-Tür Adı ve lokalite	A1	A2	A7	B4	B6	B7	B18	LA-1	LA -12	LA 13	OPA0 7	OPA1 7	OPB5
2- Bellis perennis/Sivrikaya	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-
3- Belis perennis/ Köhçer	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-
4- Bellis perennis/ Dereköy	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
5- Bellis perennis/Antalya	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-

Çizelge 4.2 (Devam). Dört farklı lokaliteden toplanan *Bellis perennis* türlerinin RAPD-PCR işlemleri sonucunda elde edilen sonuçlar

1-Tür Adı ve lokalite	OPB 08	OPB 10	OPC0 2	OPO0 4	OPO0 6	OPW 06	OPI 18	OPU1 6	OPW 10	OPR0 3	SC0 23	SC 1079	M13
2- Bellis perennis/Sivrikaya	–	+	+	+	+	–	–	+	+	+	–	–	+
3- Belis perennis/ Köhçer	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	–	+
4- Bellis perennis/ Dereköy	–	+	+	+	–	+	–	+	+	+	–	–	+
5- Bellis perennis/Antalya	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	–	+

Çizelge 4.3. Rize/Sivrikaya, Rize/ Köhçe, Rize/Dereköy, Antalya/Alanya *Bellis perennis* örneklerinin genetik uzaklık diyagramı

popID	Rize/Sivrikaya	Rize/ Köhçe	Rize/Dereköy	Antalya/Alanya
Rize/Sivrikaya	****			
Rize/Köhçe	0.5390	****		
Rize/Dereköy	0.6931	0.7985	****	
Antalya/Alanya	0.7621	0.6604	0.7621	****



Şekil 4.1. Türlerinin birbirlerine genetik uzaklıklarını gösteren dendrogramı

Antimikrobiyal Aktivite Testi

Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçe, Antalya/Alanya olmak üzere Türkiye'nin dört farklı lokalitesinden toplanan *Bellis perennis* bitkisinin Rize- Sivrikaya/ çiçek sapı, Rize- Sivrikaya/yaprak, Rize- Sivrikaya/çiçek, Rize-Dereköy/ toprak üstü, Rize-Köhçe/ Toprak üstü, Antalya-Alanya/toprak üstü kısımları belirlenmiş ve bu kısımların (Çizelge 4.1) uçucu yağları Clevenger cihazı ile; *Bellis perennis*

yaprağının ekstresi metanol de karıştırma yoluyla elde edilmiştir. Elde edilen uçucu yağlar steril flakonlarda tartılmış ve %25'lik Dimetil sülfoksit (DMSO) ve metanolde stok çözeltileri hazırlanmıştır (Çizelge 4.4).

Hazırlanan stok uçucu yağ ve metanol ekstresinin aktiviteleri mikrobrot seyraltme yöntemi ile çeşitli patojen bakteriler ve bir maya üzerinde; kağıt agar difüzyon yöntemi fungus üzerinde denenmiştir. Rize- Sivrikaya/ çiçek sapı, Rize- Sivrikaya/yaprak, Rize- Sivrikaya/çiçek, Rize-Dereköy/ toprak üstü, Rize-Köhçer/ toprak üstü, Antalya-Alanya/toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağlardan oluşturulan çözeltiler ve *Bellis perennis* yaprağının metanol ekstresinin *Escherichia coli* (NRRL B-3008), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter aerogenes* (NRRL 3567), *Proteus vulgaris* (NRRL B-123), *Salmonella tpyimrium* (ATCC 13311), *Bacillus cereus* (NRLL B-3711) bakterileri ve *Candida albicans* mayası üzerindeki minimal inhibisyon konsantrasyonları (MIC) ve *Aspergillus flavus* fungusuna karşı etkili olduğu konsantrasyon materyal ve yöntemde belirtildiği şekilde hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak bakteriler kloramfenikol, maya ve fungus ketokonazol antibiyotiği kullanılmıştır.

Çizelge 4.5'deki sonuçlara göre Rize- Sivrikaya/ çiçek sapı, Rize- Sivrikaya/yaprak, Rize- Sivrikaya/çiçek, Rize-Dereköy/ toprak üstü kısmı, Rize-Köhçer/ Toprak üstü kısmı, Antalya-Alanya/toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağlardan hazırlanan örnek stok çözeltilerin ve *Bellis perennis*/yaprak metanol ekstresinin *Escherichia coli* (NRRL B-3008), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter aerogenes* (NRRL 3567), *Proteus vulgaris* (NRRL B-123), *Salmonella tpyimrium* (ATCC 13311), *Bacillus cereus* (NRLL B-3711), *Candida albicans* (NRLL) suşlarına karşı MIC değerlerinin sırası ile 1,9 (µg/ml), 2,2 (µg/ml), 0,35 (µg/ml), 0,75 (µg/ml), 0,75 (µg/ml), 0,85 (µg/ml), 3 (µg/ml), 2,05 (µg/ml) konsantrasyonlarından daha büyük olduğu bulunmuştur.

Kağıt disk difüzyon yöntemi için *Aspergillus flavus* fungusunun spor çözeltisi (10^7 spor/ml) hazırlanmış ve katılmış SGA yüzeyine 500 µl aktarılmıştır. Rize-

Sivrikaya/ çiçek sapı, Rize- Sivrikaya/yaprak, Rize- Sivrikaya/çiçek, Rize-Dereköy/ toprak üstü, Rize-Köhçer/ toprak üstü, Antalya-Alanya/toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağlardan hazırlanan stok çözeltiler ve *Bellis perennis*/yaprak metanol ekstresi 6 mm çapındaki kağıt disklerle 5 µl emdirilmiş ve yüzeyi kurutulmuş besi yerine yerleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak ketakonazol antibiyotiği kullanılmıştır. Rize-Sivrikaya/çiçek sapı, Rize-Sivrikaya/yaprak, Rize-Sivrikaya/çiçek, Rize-Dereköy/toprak üstü, Rize-Köhçer/ Toprak üstü, Antalya-Alanya/toprak üstü kısımlarımdan elde edilen uçucu yağlarla hazırlanan çözeltilerin ve *Bellis perennis*/yaprak metanol ekstresinin *Aspergillus flavus* fungusuna karşı 5 µl konsantrasyondan daha yüksek bir etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan bitki kısımları ve stok çözeltiler

<i>Bellis perennis</i>	Lokaliteler	Bitki kısmı	Yağ oranı (µg/ml)
A	Rize-İkizdere-Sivrikaya	çiçek sapı	1,9
B	Rize-İkizdere-Sivrikaya	yaprak	2,2
C	Rize-İkizdere-Sivrikaya	çiçek	0,35
D	Rize-İkizdere-Dereköy	herba	0,75
E	Rize-İkizdere-Köhçer	herba	0,85
F	Antalya-Alanya	herba	3
G	<i>Bellis perennis</i> /yaprak/metanol ekstresi	yaprak	2,05

Çizelge 4.5. Antimikrobiyal aktivite değerleri (MIC, µg/ml)

Microorganisms	A	B	C	D	E	F	G	Std*
<i>Escherichia coli</i>	>1,9	>2,2µg	>0,35	>0,75	>0,85	>3	>2,05	0.016
<i>Staphylococcus aureus</i>	>1,9	>2,2µg	>0,35	>0,75	>0,85	>3	>2,05	0.031
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	>1,9	>2,2µg	>0,35	>0,75	>0,85	>3	>2,05	0.062
<i>Enterobacter aerogenes</i>	>1,9	>2,2µg	>0,35	>0,75	>0,85	>3	>2,05	0.001
<i>Proteus vulgaris</i>	>1,9	>2,2µg	>0,35	>0,75	>0,85	>3	>2,05	0.001
<i>Salmonella typhimurium</i>	>1,9	>2,2µg	>0,35	>0,75	>0,85	>3	>2,05	0.016
<i>Bacillus cereus</i>	>1,9	>2,2µg	>0,35	>0,75	>0,85	>3	>2,05	0.016
<i>Candida albicans</i>	>1,9	>2,2µg	>0,35	>0,75	>0,85	>3	>2,05	0.125**

*Kloramfenikol, ** Ketokonazol

Kimyasal Analiz

Antimikrobiyal aktivite değerleri tesbit edilen Rize-Sivrikaya/çiçek sapı, Rize-Sivrikaya/yaprak, Rize- Sivrikaya/çiçek, Rize-Dereköy/ toprak üstü, Rize-Köhçer/ toprak üstü, Antalya-Alanya/toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağlardan hazırlanan stok çözeltiler ve *Bellis perennis*/yaprak metanol ekstresinin kimyasal analizleri eş zamanlı olarak GS/MS ve GS sistemlerinde yapılmış ve kimyasal kompozisyonları belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Kimyasal analiz sonucunda major bileşikler olarak *γ-himakalen*, *fitol* ve *heksadekanoik asit* tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. *Bellis perennis* uçucu yağlarının kimyasal madde kompozisyonları

RRI	BİLEŞİK	A	B	C	D	E	F
1032	A- pinen	0,2	0,2	2	0,5	1	0,2
1093	Hekzanal		0,1	0,5		0,7	
1118	β - pinen		0,1	0,5	0,1	0,8	0,2
1174	Mirsen		e	e	0,7	3,2	0,8
1194	Heptanal		e				
1218	B-fellandren						0,8
1225	(Z)-3- hekzenal		0,1				
1244	2-pentilfuran		0,1			0,7	0,1
1246	(Z)- β -osimen			0,5			
1386	Oktenilasetat						0,04
1398	2-nonanon			0,2			
1400	Nonanal		0,2	0,3	0,1	0,3	0,1
1400	Tetradekan		e		0,2		0,1
1443	Dimetiltetradekan*		0,2				
1452	1-okten-3-ol			0,3		0,4	
1479	(E,Z)-2,4-heptadienal		0,2				
1492	Siklosativen	e	0,1				
1497	α -kopaen	e	0,1				
1507	(E,E)-2,4-heptadienal		0,3				
1500	Pentadekan						0,3
1506	Dekanal	e	e	0,7	0,2	0,8	
1516	(E)-Theaspiran		0,3				
1520	3,5-oktadien-2-one		e				
1548	(E)-2-nonenal		0,1				
1549	β -kubeben	e	0,4	1,0		0,7	
1553	Linalool						
1553	(Z)-Theaspiran		0,2				
1562	Oktanöl		e				
1571	trans-p-ment-2-en-1-ol	e				0,2	
1582	cis-krizantenilasetat		1,1	1,7	1,4	2,2	1,1
1597	(E,Z)-nonadienal		0,2				
1600	Hekzadekan		0,2		0,2		0,2
1612	β -karyofillen	0,2	0,8	2	0,5	1	0,3
1638	β -siklositral	e	0,4		0,3		
1661	α -himakalen	0,1				0,4	0,1
1663	Fenilasetaldehit		0,2			0,4	
1668	(Z)-beta-farnesen	0,1		e			
1687	α -humulen	0,1	0,2		0,7	e	
1700	Heptadekan		0,2				0,1
1711	γ-himakalen	5,2	16,2	11	17,4	16,6	5,8
1725	cis-piperiton oksit		0,2				
1726	Germakren-D	0,6	2,7	6,4	2,2	4	0,2
1733	Nerilasetat						0,2
1743	Eremofilen	0,2	0,6	0,8		0,8	0,1
1744	α -selinen		e				
1755	Bisiklogermakren		0,3	0,9			
1758	(E,E)- α -farnesen				0,2		0,1
1763	Naftalen		0,3			0,3	
1765	Geranilasetat						0,8
1773	δ -kadinen	0,1	0,3	1	0,2	0,7	e
1779	(E,Z)-2,4-dekadienal		0,1	0,6		0,5	
1786	ar-kurkumen			e			
1800	Oktadekan		e				
1838	(E)- β -damaskenon		e				
1868	(E)-geranilaseton		0,3		0,2		0,1
1830	Desilbutirat		0,2				

Çizelge 4.6 (Devam). *Bellis perennis* uçucu yağlarının kimyasal madde kompozisyonları

1900	epi-kubebol	e		0,2			
1900	Nonadekan		0,1				
1933	Tetradekanal	0,1	8,6		6,4	1,4	7,3
1957	Kubebol			0,7	0,2	1,1	
1958	(E)- β -iyonon	0,1	1,9	0,4	1,7	0,6	0,2
1969	cis-jasmone			1			
1973	1-dodekanol						0,1
1983	Piperiten oksit	0,4		0,7	0,3		
2000	Eikosan			0,5			
2008	Karyofillenoksit	0,1					
2036	2-pentadekanon			e		e	1
2041	Pentadekanal	0,3	4,4	e	3,7	0,7	1
2088	1-epi-kubenol			e		0,3	
2100	Heneikosan		0,3				
2131	Hekzahidrofarneasilaseton		1,1	1,7	1,4	2,2	1,1
2135	Hekzadekanal						e
2179	3,4-dimetil-5-pentiliden-2(5H)-furanon	e	0,8		0,6	e	e
2179	1-tetradekanol	e	0,3		0,4		e
2200	3,4-dimetil-5-pentil-5H-furan-2-one	e		e	e	e	0,2
2200	Dokosan		e				
2210	Kopaborneol	0,1	0,5	1,3	0,3	1	
2239	Karvakrol	0,4	0,4	2	e	e	
2240	metil etil hekzadekonoat	e	0,3	e		e	
2255	α -kadinol	e		e			
2296	İsophytol						e
2300	Trikosan		0,1				
	9,12-hekzadekadienoik asit metilester		1,2				
2384	1-hekzadekanol			1		e	0,3
2500	Pentakosan		e			e	e
2503	dodekanoik asit						e
2509	metil linoleat		e	0,5			
2538	etil linoleat						e
2583	Metillinolenat		e	e		e	e
2607	1-oktadekanol				1,1		
2613	Etillinolenat		e				1,1
2622	Fitol	3,5	22,8	13,4	30,4	8,9	22,2
2670	Tetradekanoikasit						8,4
2700	Heptakosan		e				
2900	Nonakosan		3,2		2		1,7
2931	hekzadekanoik asit	87,63	14	32,2	15,6	28,6	40,1
	Toplam	99,43	87,2	86	89,2	80,5	96,44

e : Eser

RRI: Bağlı tutunma indisi

*Kütle spektrumu benzerliğinden

A, *Bellis perennis*/ çiçek sapı Rize/Sivrikaya), **B**, *Bellis perennis*/ yaprak (Rize / sivrikaya), **C**, *Bellis perennis*/ çiçek (Rize / sivrikaya), **D**, *Bellis perennis* /herba (Rize / Dereköy), **E**, *Bellis perennis* /herba (Rize / Köhçer), **F**, *Bellis perennis*/ herba (Antalya/Alanya).

Antioksidan aktivite

A, *Bellis perennis*, çiçek sapı (Rize/Sivrikaya), **B**, *Bellis perennis*, yaprak (Rize / sivrikaya), **C**, *Bellis perennis*, çiçek (Turkey, Rize / sivrikaya), **D**, *Bellis perennis*, herba (Rize / Dereköy), **E**, *Bellis perennis* herba (Rize / Köhçer), **F**, *Bellis perennis* herba (Antalya/Alanya) kısımlarından elde edilen uçucu yağlarla hazırlanan çözeltiler ve **G**, *Bellis perennis* metanol ekstresi silika jel üzerine uygulanarak kalitatif olarak değerlendirmeleri yapılmıştır (Resim 4.6) Değerlendirmede kuvvetli antioksidan olan Vitamin C ile karşılaştırma yapılmıştır.

Kalitatif olarak kuvvetli antioksidan etkileri bulunan **B**, *Bellis perennis*, yaprak (Rize /sivrikaya), **G**, *Bellis perennis* metanol ekstre numunelerini DPPH'ın %50 sini süpürdüğü konsantrasyonlarının (IC₅₀) bulunması için kantitatif değerlendirmeleri yapılmıştır. Mikroplate spektrofotometre (Biotek, Poverwawe) kullanılarak 517 nm'de UV absorbansı okunmuştur.

B, *Bellis perennis*, yaprak (Rize / sivrikaya), **G**, *Bellis perennis* metanol ekstresi ve Vitamin C'nin serbest radikal süpürücü etkileri stabil bir serbest radikal olan DPPH üzerinde test edilmiştir. Serbest radikal süpürücü etki sonuçları 30 dakika içerisinde DPPH'ın %50 sini süpürdüğü konsantrasyon olarak (IC₅₀) hesaplanmıştır. **B**, *Bellis perennis*, yaprak (Rize / sivrikaya), **G**, *Bellis perennis* metanol ekstresi ve Vitamin C'nin IC₅₀ değerleri sırasıyla >0,5 (mg/ml), 0,113 (mg/ml), 0,008 (mg/ml) olarak bulunmuştur (Çizelge 4.7). Düşük IC₅₀ değeri yüksek antioksidan etkiyi göstermektedir.



Resim 4.6. Radikal süpürücü etkinin kalitatif değerlendirmesi

Çizelge 4.7. Radikal Süpürücü Aktivite'nin kantitatif değerlendirmesi

Numuneler	IC 50: mg/ml
B (<i>Bellis perennis</i> , yaprak (Rize / sivrikaya))	$> 0.5 \pm 0.001$
G (<i>Bellis perennis</i> metanol ekstresi)	$0,113 \pm 0.001$
Vit C (standart)	0.008 ± 0.002

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızın amacı Türkiye'nin dört farklı lokalitesinden (Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçer, Antalya/Alanya) toplanan *Compositae* familyasına ait *Bellis perennis* türlerinin polen morfolojileri ve populasyonlar arasındaki farklılıkların belirlenmesi, bu örneklerin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağların ve metanolik ekstraktların çeşitli insan patojen bakterilerine, *Candida albicans* mayası ve *Aspergillus flavus* fungusuna karşı antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi, ayrıca uçucu yağlarının kimyasal analizleri yapılarak ana bileşenlerin belirlenmesi, uçucu yağların ve *Bellis perennis* metanol ekstresinin radikal süpürücü özelliklerinin araştırılmasıdır.

Çiçek tozlarının morfolojik özellikleri incelenirken ele alınan kriterler bağlantı durumları, simetri eksenleri, büyüklükleri ve şekli, kutuplardan polen çevresi, açıklık (apertür) sayısı, açıklıkların polen üzerindeki yerleri, açıklıkların şekil ve yapılarıdır [Sawyer, 1978; Straka, 1975].

Thormo ve ark. (1985) *Compositae* familyası polenlerinde polar eksen uzunluğu, ekvatorial eksen uzunluğu, ekzin, spin taban uzunluğu, spin yüksekliği ve apokolpium'un ayrıştırıcı özellikler olarak önemli olduklarını belirlemişlerdir [Thormo, 1985].

Rowley ve ark. (1979) *Ambrosia*'nın dört türünün morfometrik polen analizleri sonucunda ayrıştırıcı özelliklerden biri olan ekzinin en önemli ayrıştırıcı özellik olduğu saptanmıştır [Robbinson, 1985].

Çalışmamızın birinci aşamasında Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçer, Antalya/Alanya olmak üzere Türkiye'nin dört farklı lokalitesinden toplanan *Bellis perennis* türleri'nin polen yapıları taramalı elektron mikroskobu (JEOL JSM 6060 LV) ile incelenerek fotoğrafları çekilmiştir. Bütün hesap ve ölçümler her bir örneğin on tanesi üzerinde yapılmıştır.

Bizim çalışmamızda polen ölçümlerinde ekzin süslenmesi ayırt edici faktör olup Rize/Dereköy örneğinin ornemantasyonun Rize/Sivrikaya, Rize/Köhçer ve Antalya/Alanya örneklerinden farklı olduğu görülmüştür. *B. perennis* polen morfolojileri ile ilgili bir literatüre rastlanmadığından yapılacak olan morfolojik çalışmlara için öncü bir çalışma niteliğindedir.

Masi ve ark. (2007) sekiz *Capsicum annum* ssp. (acı biber) 'nin genetik çeşitliliği üzerinde çalışmışlardır. Genetik araştırmalar RAPD-PZR ile yapılmıştır. Seçilen sekiz örnek için genetik benzerlik değerleri hesaplanmış ve genetik benzerlik dendogramı yapılmıştır. *Capsicum annum* populasyonları arasındaki genetik benzerlik bir 0-1 kalıbına dönüştürülen tek ve ortak amplifikasyon ürünlerinin her ikisine dayandırılmıştır. AN10, AX20, G02, G19, Q05, R19, S07, U4, U5, U13 ve V17 olmak üzere 12 primer kullanılmıştır. AX20 ve G02 primerleri hariç diğer on primer ile polimorfizm tespit edilmiştir [Masi, 2007].

Sarkhosh ve ark. (2006) İrandaki bazı *Punica granatum* L. (nar) genotipleri arasındaki polimorfizmi göstermeyi amaçlamıştır. Genotipler arasındaki farklılık oranının belirlenmesi için RAPD markırlar kullanılmıştır. PZR reaksiyonları için kullanılan primerler rasından 16 primerin güvenilir polimorfik olduğu gözlenmiştir. Bu primerler 102 polimorfik olmak üzere 178 bant oluşturmuştur. Genotip analizleri UPGMA (Unweighted Pair-Group method using arithmetic Averages) kümelendirme yöntemi, Jaccord benzerlik katsayısı, polimorfik RAPD analizlerinden elde edilen bilgilere dayanarak gerçekleştirilmiştir. Genotipler arasında en yüksek ve en düşük benzerlikler sırasıyla 0,89 ve 0,29 olarak belirlenmiştir [Sarhosh, 2006].

Çalışmamızın ikinci aşamasında Rize/Sivrikaya, Rize/Dereköy, Rize/Köhçer, Antalya/Alanya olmak üzere Türkiye'nin dört farklı lokalitesinden toplanan *Bellis perennis* populasyonları RAPD-PZR moleküler yöntemi kullanılarak karşılaştırılmış ve moleküler tanımlamaları yapılmıştır. Türler arasındaki genetik uzaklık POPGEN bilgisayar programı kullanılarak hesaplanmış ve filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogramlar oluşturulmuştur.

PZR reaksiyonları için kullanılan primerler rasından 16 primer polimorfik sonuçlar vermiştir. Dendrogram sonucuna göre Rize/Sivrikaya, Rize/Köhçer örnekleri kendi aralarında birinci grubu oluştururken, yine bu iki örnek ve Rize/Sivrikaya örneği ikinci grubu oluşturmuştur. Rize/Dereköy örneği bu iki gruba en uzak örnek olmuştur.

Hem polen hem de RAPD-PZR analizi sonucu ile Rize/Dereköy örneğinin diğer *B. perennis* örneklerinden farklı olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızın üçüncü basamağında Rize-Sivrikaya/çiçek sapı, Rize-Sivrikaya/yaprak, Rize- Sivrikaya/çiçek, Rize-Dereköy/ toprak üstü, Rize-Köhçer/ toprak üstü, Antalya-Alanya/toprak üstü kısımlarından Clevenger cihazında distilasyon yolu ile uçucu yağları elde edimeye çalışılmış ancak yok denecek kadar az uçucu yağ elde edilmiştir. Yağ verimi düşük olan bu örneklerden uçucu yağ eldesi hem zor hemde ekonomik açıdan elverişli olmayacağı için organik çözücüler kllanarak stok çözeltiler elde edilmiştir. Hazırlanan çözeltiler ve *Bellis perennis* metanolik ekstresinin *Escherichia coli* (NRRL B-3008), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeouginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter aerogenes* (NRRL 3567), *Proteus vulgaris* (NRRL B-123), *Salmonella tphymirium* (ATCC 13311), *Bacillus cereus* (NRRL B-3711), *Candida albicans* ve *Asergillus flavus*'a (ATCC 9807) karşı antimikrobiyal aktiviteleri Mikrobroth Dilüsyon Tekniği (MIC) ve Kağıt Disk Difüzyon tekniği ile belirlenmiştir.

MIC sonuçlarına göre elde edilen konsantrasyonlarda (Çizelge 4.2) *Escherichia coli* (NRRL B-3008), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeouginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter aerogenes* (NRRL 3567), *Proteus vulgaris* (NRRL B-123), *Salmonella tphymirium* (ATCC 13311), *Bacillus cereus* (NRRL B-3711), *Candida albicans* mikroorganizmalarına ve *Aspergillus flavus* fungusuna karşı hiçbir antimikrobiyal aktivite saptanmamıştır.

Antimikrobiyal aktivite değerleri tesbit edilen Rize- Sivrikaya/ çiçek sapı, Rize-Sivrikaya/yaprak, Rize- Sivrikaya/çiçek, Rize-Dereköy/ toprak üstü, Rize-Köhçer/

toprak üstü, Antalya-Alanya/toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağlardan hazırlanan stok çözeltiler ve *Bellis perennis*/yaprak metanol ekstresinin kimyasal analizleri eş zamanlı olarak GS/MS ve GS sistemlerinde yapılmış ve kimyasal kompozisyonları belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Kimyasal analiz sonucunda *fitol heksadekanoik asit* ve *γ -himakalen* ana bileşikler olarak bulunmuştur.

GS/MS ve GS analizleri sonucunda β -mirsen, α -pinen, β -pinen, β -felandren, geranil asetat gibi monoterpenler ve β -kubeben, β -karyofillen, α -himakalen, α -humulen, α -selinen, γ -kadinen gibi seskiterpen bileşikleri bulunmuştur. Çeşitli çalışmalarda terpenlerin bakteri, fungus, virüs ve protozoolara karşı aktif bileşikler olduğu bildirilmiştir [Cowan, 1999]. Uçucu yağların antimikrobiyal etkileri içerdikleri bileşenlerin oranlarına bağlı olarak değişmektedir [Marino, 2001]. Bu sonuçlardan yola çıkarak çalışmış olduğumuz uçucu yağların antimikrobiyal özellikte olabileceği fakat elde etmiş olduğumuz konsantrasyonlar da bu aktivitenin gözlenemediği düşünülmektedir.

Salah ve ark. (2006) *Teacrium sauvagei* uçucu yağı ve yaprak metanol ekstresinin antioksidan aktivitesinin araştırmışlardır. Antioksidan, DPPH- Radikal Süpürücü Aktivitesi yöntemi ile belirlenmiş ve sentetik bir antioksidan olan trolox ile karşılaştırılmıştır. IC₅₀ değerleri uçucu yağın 1 mg/ml, yaprak metanolik ekstresinin 0,104 mg/ml olarak bulunmuştur [Salah, 2006].

Çalışmamızın dördüncü basamağında *Bellis perennis*'in Rize- Sivrikaya/ çiçek sapı, Rize- Sivrikaya/yaprak, Rize- Sivrikaya/çiçek, Rize-Dereköy/ toprak üstü, Rize-Köhçer/ toprak üstü, Antalya-Alanya/toprak üstü (Çizelge 4.1) kısımlarından elde edilen uçucu yağların ve *Bellis perennis* metanol ekstresinin radikal süpürücü etkisi DPPH yöntemi ile çalışılmıştır. Kontrol olarak bir antioksidan olan Vitamin C kullanılmıştır.

A, *Bellis perennis*, çiçek sapı (Rize/Sivrikaya), **B**, *Bellis perennis*, yaprak (Rize / sivrikaya), **C**, *Bellis perennis*, çiçek (Türkiye, Rize/sivrikaya), **D**, *Bellis perennis*,herba (Rize / Dereköy), **E**, *Bellis perennis* herba (Rize /Köhçer), **F**, *Bellis*

perennis herba (Antalya/Alanya) kısımlarından elde edilen uçucu yağlarla hazırlanan çözeltiler ve **G**, *Bellis perennis* metanol ekstresi silika jel üzerine uygulanarak kalitatif olarak değerlendirmeleri yapılmıştır (Resim.4.1.) Değerlendirmede kuvvetli antioksidan olan Vitamin C ile karşılaştırma yapılmıştır. Kalitatif yöntem sonucunda **B**, *Bellis perennis*, yaprak (Rize / sivrikaya), **G**, *Bellis perennis* metanol ekstresi kuvvetli radikal süpürücü etki göstermiş olup **A**, *Bellis perennis*, çiçek sapı (Rize/Sivrikaya), **C**, *Bellis perennis*, çiçek (Turkey, Rize / sivrikaya), **D**, *Bellis perennis*, herba (Rize /Dereköy), **E**, *Bellis perennis* herba (Rize / Köhçer), **F**, *Bellis perennis* herba (Antalya/Alanya) örnekleri zayıf etki göstermiştir.

Kuvvetli etki gösteren **B**, *Bellis perennis*, yaprak (Rize/sivrikaya), **G**, *Bellis perennis* metanol ekstresi örneklerinin DPPH'ın %50 sini süpürdüğü konsantrasyon olan (IC₅₀) değerlerinin bulunması için kantitatif yöntem kullanılmıştır.

Bizim çalışmamızda da kantitatif yöntem sonucunda **B**, *Bellis perennis*, yaprak/ uçucu yağı (Rize / sivrikaya), **G**, *Bellis perennis* metanol ekstresi ve Vitamin C'nin IC₅₀ değerleri sırasıyla >0,5 (mg/ml), 0,113 (mg/ml), 0,008 (mg/ml) olarak bulunmuştur. Düşük IC₅₀ değeri yüksek antioksidan etkiyi göstermektedir. Bu çalışmamız diğer çalışmalar için öncü niteliğinde olup antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinen *Bellis perennis*, yaprak/ uçucu yağı (Rize / sivrikaya), **G**, *Bellis perennis* metanol ekstresindeki etken maddeler tespit edilebilir.

Hem polen hem de RAPD-PZR analizi sonucu Rize/Dereköy örneğinin diğer *B. perennis* örneklerinden farklı olmasına rağmen antioksidan ve süpürücü etkileri bakımından karşılaştırıldıkları zaman ise daha farklı sonuç bulunmuştur. En kuvvetli radikal süpürücü etki Rize/Sivrikaya uçucu yağı ve metanol ekstresinde gözlenmemiştir.

Bundan sonraki çalışmalarda örnekler arasında ITS bölgeleri çoğaltılıp dizi analizi yapılarak tür teşhisi daha güvenilir olabilir. Ayrıca hücre kültürlerinde çalışmalar yapılarak elde edilen uçucu yağ ve ekstrelerin hastalıklara etkisi belirlenebilir.

KAYNAKLAR

- Alzoreky, N.S., Nakahara, K., “Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia”, *Int. J. Food Microbiol*, 80: 223-230 (2003).
- Auroma, O.I., “Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75: 199-212 (1998).
- Adams, R.P., “Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy”, *Allured Publishing*, 135-138 (2001).
- Baldwin, B.G., Sanderson, M. J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S., Donoghue, M.J., “ The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phyogeny”, *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 82: 247-277 (1995).
- Baytop, T., Başer, K.H.C., “On essential oils and aromatic waters used as medicine in İstanbul between 17 th. and 19 th.centuries”, K.H.C. Başer (ed.): *Flavours Fragrances and Essential Oils, Proceedings of the 13 th. International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils*, İstanbul, 96-99 (1995).
- Baytop, T., “Farmakognozi”, *İst. Üniv. Yayınları*, İstanbul, 1810: 191-192 (1972).
- Beşe, M., “Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri”, *Kardeşler Basımevi*, İstanbul, 150-154 (1989).
- Bhatt, K.K.S., “FAO-Food and Organisation of the United Nations”, *Medicinal Plant Information Databases*, Italy, 435-438 (1995).
- Branther, A., Grein, E., “Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine”, *J. Ethnopharmacol*, 44: 35-40 (1994).
- Borris, R.P., “Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company”, *J. Ethnopharmacol*, 51: 29-38 (1996).
- Bravo, L., “Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance”, *Nutr.Rev.*, 56: 317-333 (1988).
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., “ Construction of a genetic linkage map in human using Restriction Fragment Length Polymorphism”, *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331 (1980).
- Botelho1, M.A., Nogueira, N.A.P., Bastos, G.M., Fonseca, S.G.C., Lemos, T.L.G., Matos, F.J.A., Montenegro, D., Heukelbach, J., Rao, V.S., Brito, G.A.C., “Pathogens Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral Pathogen”, *Braz J Med Biol Res*, 40 (3) 349-356 (2007).

Büyüğünal, E.B., “Arpa Mikrosatelitlerinin Ekmeklik Buğdaydaki Genetik Çalışmalar İçin Kullanım Olanaklarının Araştırılması”, *Fen ve Mühendislik Dergisi*, 6: 2 (2003).

Bostancı, S.E., “*Compositae (Asteraceae)* familyasında bazı polenlerin morfometrik analizi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü*, 8-9 (2001).

Claudia, O., “Aspirin protects against cancer of the upper aerodigestive tract”, *Lancet Oncol.*, 4:200 (2003).

Chandel, Y.S., Metha, P.K., “Nematicidal properties of leaf extract of wild sage”, *Indian Journal of Agricultural Science*, 60(11): 781-790 (1990).

Ceylan, A., “Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ İçerenler)”, *Ege Üniversitesi Yay.*, İzmir, 481:188 (1987).

Cheong, H., Choi, E.J., Yoo, G.S., Kim, K.M., Ryu, S.Y., “Desacetylmatricarin, an anti-allergic compound from *Taraxacum platycarpum*”, *Planta Medica*, 577-578 (1998).

Conner, D.E., Beuchat, L.R., “Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts”, *J. Food. Sci.*, 49: 429-434 (1984).

Clark, M.S., “Extraction of Whole Genomic DNA by the CTAB Method”, Plant Molecular Biology, *A Laboratory Manual, Springer Lab Manual*, 5-8 (1997).

Cowan, M.M., “Plant Products as Antimicrobial Agents”, *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4) : 564-582 (1999).

Çalış, İ., Yürüker, A., Şatana, M.E., Tanker, N., Alaçam, R., Demirdamar, R., Sticher, O., “*Cyclamen coum* ve *C. mirabile*’den elde edilen saponozitler ve antimikrobiyal, uterokontraktif etkileri”, *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, A.Ü. Eczacılık Fakültesi, Ankara, 73-79 (1996).

Desevedavy, C., Amoros, M., Girre, L., Lavaud, C., Massiot, G., “Antifungal agents: in vitro and in vivo antifungal extract from the common daisy, *Bellis perennis*”, *J. Nat. Prod.*, 52 (1) : 184-185 (1989).

Davis, P.H., “Flora of Turkey and East Aegean Islands”, *Edinburg University*, Edinburgh, 135-137 (1975).

Douissa, F.B., Hayder, N., Chekir, G., Hammami, M., Ghedira, K., Mariotte, A.M., Dijoux, M.G., “The chemical composition of essential oils of *Silphium perfoliatum* L.” *Flavour and Fragrance Journal*, 21 (3) : 573-578 (2005).

Denyar, S.P., Hugo, W.B., “Mechanisms of Action of Chemical Biocides; their study and Exploitation, The Society for Applied Bacteriology, Technical Series”, **Oxford Blackwell Scientific Publication**, 27:171-188 (1991).

Dubouzet, J.G., Shinoda, K., “ Relationships among old and New world *Alliums* according to ITS DNA sequence analysis”, **Theor. Appl. Genet.**, 98:422-433 (1999).

Dorman, H.J.D., Deans, S.G., “Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils”, **J. Appl. Microbiol.**, 88 : 308-316 (2000).

Demirci, F., Başer, K.H.C., Kürkçüoğlu, M., Krimer, N., İşcan, G., “Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils”, **J.Agric. Food Chem.**, 50 : 3943-3946 (2002).

Dey, P.M., Harborne, J.B., “Assay for Bioactivity”, **Methods in Plant Biochemistry**, 6: 68-72 (1984).

Demirci, B., Başer, K.H., Özek, T., Demirci, F., “Betulenols from *Betula* Species”, **Planta Med** ., 66: 490-493 (2000).

Eloff, J.N., “A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extract for Bacteria”, **Planta Medica**, 64 : 711-713 (1988).

Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M.L., Jovad, H., “Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the South-east region of Morocco (Tafilalet)”, **Journal of Ethnopharmacology**, 82 : 97-103 (2002).

El- Shemy, H.A., Aboul-Enein, A.M., Aboul- Enein, K.M., Fujita, K., “Willow Leaves`Extracts Contain Anti-Tumor Agents Effective against Three cell Type”, **Plos One**, 2(1): 265-269 (2007).

Edris, A.E., Farrag, E.S., “Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapour phase”, **Food**, 47: 117-121 (2003).

Graham, L.E., Graham, J.M., Wilcox, L.W., “Bitki Biyolojisi”, Akdeniz Üniv., **Palme Yayıncılık**, Ankara, 35-40 (2004).

Goldsy, R.A., Kint, T.J., Osborne, B.A., Kuby, J., “Clinical medicine”, **Immunology**, 361-370 (2002).

Gronbaek, M., Deis, A., Sorensen, T., Becker, U., Schonhr, P., “Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits”, **Br. Med.J.**, 310: 1165-1169 (1995).

- Geissman, T.A., "Favonoid compounds, tanins, lignins and related compounds", *Pyrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents*, 9:265 (1963).
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M., "Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy", *Churchill Livingstone*, Edinburgh, 245-252 (2004).
- Huntanen, C. N., "Inhibition of Clostridium botulinum by spice extracts and aliphatic alcohols", *J. Food. Prot.*, 43 : 195-196 (1980).
- Hansel, R., Keller, K., Rimpler, H., Schneider, G., "Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*", *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxi*, Springer, Berlin, 269-287 (1994).
- Hiller, K., Bader, G., Schöpke, T., "Acetylenes and terpenoids of *Bellis perennis*" *Planta Med.*, 56: 644 –649 (1995).
- Hasaneen, N.A., Zaki, M.E., Shalaby, H.M., El-Morsi, A.S., "Polymerase chain reaction of pleural biopsy is a rapid and sensitive method for the diagnosis of tuberculous pleural effusion", *Chest*, 124(6): 2105-11 (2003).
- Inouye, S., Tsuruoka, T., Watanabe, N., Takeo, K., Akao, M., Nishiyama, Y., Yamaguchi, H., "Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact", *Mycoses*, 43: 17-23 (2000).
- İscan, G., Demirci, F., Kırimer, N., Kürkçüoğlu, M., Baser K.H.C., "Antimicrobial Screening: Mentha piperita Essential Oil", *J. Agric. Food Chem.*, 50:3943-3946 (2002).
- Internet:"Polymerase chain reaction", <http://campus.queens.edu/faculty/janr/bio103/helPages/C16DNAtech.htm> (2005).
- Jackson, F., "Antihelminthic resistance - the state of play", *British Veterinary Journal*, 149(2): 123-138 (1993).
- Joulain, D., König, W.A., Hochmuth, D.H., "Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils", *Library of MassFinder 2.1*, Hamburg, Germany, 241-245 (2001).
- Janssen, A.M., Scheffer, J.J.C., Svendsen, A.B., "Antimicrobial Activity of Essential Oils: A 1976- 1986, Literature Review", *Aspects of the Test Methods*, 875- 888 (1985).
- Ketenoglu, O., Obalı, O., Güney, K., Geven, K., "Giriş", *Ekonomik Bitkiler*, 1-3 (2003).

- Knio, K.M., Usta, J., Dagher, S., Zournajian, H., Krediyed, S., "Larvicidal activity of essential oils extracted from commonly used herbs in Lebanon against the seaside mosquito, *Ochlerotatus caspius*", **Bioreources technology**, 86-92 (2007).
- Kumarasamy, Y., Fergusson, M.E., Nahar, L., Sarker, S.D., "Bioactivity of Moschamindole from *Centaurea moschata*", **Pharmaceutical Biology**, 4 (4) : 307-310 (2002).
- Linskens, H.F., Jorde, W., "Polen as food and medicine- A Review", **Economic Botany**, 51(1) : 78-87 (1997).
- Lis- Balchin, M., Deans, S.G., "Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*", **J. Appl. Bacteriol.**, 82: 759-762 (1997).
- McLafferty, F.W., "The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data", **J. Wiley and Sons**, New York, 79-85 (1989).
- Marino, M., Bersani, C., Comi, G., "Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*", **International Journal of Food Microbiology**, 67 : 187-195 (2001).
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Breese, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., " Food related illness and death in the United States", **Emerg. Infect. Dis.**, 5: 607-625 (1999).
- Mulleriebau, F., Berger, B., Yegen, O., "Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43(8): 2262-2266 (1995).
- Montaldo, H.H., Herrera, C.A.M., "Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock", **Electronic Journal of Biotechnology**, 1(2) : 65-71 (1998).
- Masi, L.D., Siviero, P., Castaldo, D., Cautela, D., Esposito, C., Laratta, B., "Agronomic chemical and genetic profiles of hot peppers (*Capsicum annuum* ssp.)", **Mol. Nutr. Food. Res.**, 51:1053-1062 (2007).
- Maniatis, T., Fritsh, E.F., Sambrook, J., "In Molecular Cloning: A Laboratory Manual", **Cold Spring Harbor**, New York, 95-98 (1989).
- Mullis, K., Falo, F., Scharf, S.R., Horn, G., Erlich, H., "Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction", **Cold Spring Harbor Simp. Qliant. Biol.**, 51 : 263-273 (1986).

- Nei, M., "Genetic distance between populations", *The American Naturalist*, 949 : 283-292 (1972).
- Nilsson, S., Praglowski, J., "Glossary of Pollen and Spore Terminology", 2nd Edition, Munksgaard, Copenhagen, 580-585 (1958).
- Nelson, D.L., "Applications of pilymearse chain reaction methods in genome mapping", *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1:62-68 (1991).
- Ozarowski, A., Jaroniewski, W., "Rosliny Lecznice i ich praktyczne zastosowanie", Warszawa, *IWZZ*, 47-46 (1989).
- Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S., Kodama, T., Kashima, K., Imanishi, J., "Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Helicobacter pylori*", *Helicobacter*, 8 (3) : 207 (2003).
- Özer, Z., Tursun, N., Önen, H., "Yabancı Otlarla Sağlıklı Yaşam (Gıda ve Tedavi)", *Renk Yayınları*, Ankara, 133-134 (2001).
- Pinar, N.M., Adıguzel, N., "Pollen morphology of some Turkish *Artemisia* L.(*Compositae*) species", *Ot Sistematiği Botanik Dergisi*, 5(2) : 87-92 (1998).
- Renaud, S., Lorgetil, M., "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease", *Lancet*, 339: 1523-1526 (1992).
- Ramezani, M., Fazli-Bazzaz, B.S., Saghafi-Khadem, F., Dabaghian, A., "Antimicrobial activity of four *Artemisia* species of Iran", *Fitoterapia*, 75: 201-203 (2004).
- Rice – Evans, C.A., Sampson, J., Bramley, P.M., Hollowa, D.E., "Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo", *Free Rad. Res.*, 26 : 381-398 (1997).
- Rineart, K. L., Holt, T.G., Fregeau, N.L., Keifer, P.A., Wilson, G.R., Perun, T.J., Sakai, J., Thompson, A.G., Stroh, J.G., Shield, L.S., Seigler, D.S., "Bioactive compounds from aquatic and terrestrial sources", *J. Nat. Prod.*, 53: 771-792 (1990).
- Robbins, I.R., Dahl, A.O., Rowley, J.S., "Substructivw in Exines of *Artemisia* (*Acteraceae*)", *Rewiev of Paleobotany and Palnnology*, 35: 1-38 (1981).
- Straka, H., "Polen Und Sporenkunde Gustav", *Fischer Verlag Bond*, 13 (23):555 (1975).
- Sawyer, R., "Honey Identification", (ed.R.S.Pickard), *Cardiff Academic press*, 109-111 (1978).

- Sarhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R., Ebadi, A., "RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes", ***Scientia Horticulturae***, 111 : 24-29 (2006).
- Stampfer, M.J., Manson, J.E., Rimm, E., Colditz, G.A., "Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women", ***N. Engl. J. Med.***, 337: 1491-1499 (1997).
- Southern, E.M., "Detection of specific sequences among DNA fragments separated gel electrophoresis", ***J. Mol. Biol.***, 98: 503-517 (1975).
- Stubber, W.C., "Biochemical and molecular markers in plant breeding.", ***Plant Breeding News***, 9: 36-61 (1992).
- Skinner, F.A., "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", ***Springer- Verlag***, Berlin III : 626-725 (1955).
- Salah, K.B.H., Mahjoub, M.A., Chaumant, J.P., Michel, L., Clerc, J.M., Chraelf, I., Ammar, S., Mighri, Z., Aouni, M., "Chemical composition and in vitro antifungal and antioxidant activity of the essential oil and methanolic extract of *Teucrium sauvagei* Le Houerou", ***Natural Product Research***, 20 (12) : 1089-1097 (2006).
- Shahidi, F., Naczki, M., "Food Phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Applications", ***Technomic Publication***, USA, 235 (1995).
- Schelz, Z., Molnar, J., Hohmann, J., "Antimicrobial and antiplasmodic activities of essential oils", ***Fitoterapia*** , 77 : 279-285 (2006).
- Soylu, E.M., Soylu, S., Kurt, S., "Antimicrobial activities of the essential oils of various against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*", ***Mycopathologia***, 161: 119-128 (2006).
- Tanker, M., Tanker, N., "Farmokognozi", ***Ank. Üniv. Eczacık Fak. Yayınları***, Ankara, 35: 55-58 (1990).
- Toki, K., Saito, N., Honda, T., "Three Cyanidin 3- Glucuronylglucosides from red flowers of *Bellis perenis*", ***Phytochemistry***, 30 (11) : 3769-3771 (1991).
- Tormo, R., Ubert, J.L., Dominguez, E., Poras, A., "Application of Palynology to the Study of Problems of Tribal Classification in the Subfamily Tubiflorae: *Compositae*", ***Polen et spores***, 25: 52-65 (1986).
- Tosun, F., Kızılay, A., Şener, B., Vural, M., "The Evaluation of Plants from Turkey for: *in vitro* Antimycobacterial Activity", ***Pharmaceutical Biology***, 43(1) : 58-63 (2005).
- Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S., "Anti-allergic activity of some selected plants in the Zingiberaceae family", ***Journal of Ethnopharmacology***, 109(3): 535-538 (2007).

Türküsay, H., Onoğur, E., “Bazı bitki ekstraktlarının in vitro antifungal etkileri üzerine araştırmalar”, *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 22: 267-271 (1998).

Tassou, C., Koutsoumanis, K., Nychas, G.J.E., “Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient by mint essential oil”, *Food Research International*, 3 : 273-280 (2000).

Toroğlu, S., Çenet, M., “Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar”, *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(2) : 75-80 (2006).

Thomson, W.A.R., “Medicines from the Earth”, *McGraw-Hill Book Co.*, Maidenhead, United Kingdom, 95-99 (1978).

Tautz, D., Renz, M., “Simple sequence are ubiquitous repetitive components of eucaryotic genomes”, *Nucleic Acids Research*, 112: 4127-4138 (1984).

Uzun, E., Sariyar, G., Adersen, S., Karakoc, B., Ötük, G., Oktayoğlu, E., Pirildar, S., “Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species”, *Journal of Ethnopharmacology*, 95 : 287- 296 (2004).

Vezey, E.L., Shah, V.P., Skvarla, J.J., “A numerical approach to pollen sculpture terminology”, *Plant Systematics and Evolution*, 181: 245-254 (1992).

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., van de Lee, T., Horners, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kupier, M., Zabeau, M., “ AFLP: a new technique for DNA fingerprinting”, *Nucleic Acids Research*, 23 : 4407-4414 (1995).

Vanaclocha, B., Cañigüeral, S., “Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extract in venous leg ulceration treatment”, *Fitoterapia*, 354-355 (2003).

Yıldırım, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A.A., Algur, F.Ö., Bilaloğlu, V., “Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tilia (*Tilia Argentea Desf Ex DC*), Sage (*Salvia Triloba L.*) and Black Tea (*Camellia Sinensis*) Extracts”, *J. Agric. Food Chem.*, 48 : 5030-5034 (2000).

Yu, K.F., Deynze, A.V., Pauls, P., “Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis”, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, 287-301 (1993).

Warren, J.R., “Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis”, *Lancet*, 1:1273-1275 (1983).

Welsh, J., McClelland, M., “Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers”, *Nucl. Acids. Res.*, 18 : 7213-7218 (1990).

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, R.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers", *Nucl. Acids. Res.*, 18 : 6531-6535 (1990).

Wood, M., "The book of herbal wisdom: Using plants as medicine", *Nore Atlantic Books pres*, California, 374 -379 (1992).

Willett, W.C., "Diet and healt: What should we eat? ", *Science*, 264: 532-537 (1987).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KAVALCIOĞLU, Neslihan
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 17.03.1982 RİZE
 Medeni Hali : Bekar
 Telefon : 0536 472 41 31
 e- posta : nesliyimben@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Orta Öğretim Biyoloji Öğretmenliği Bölümü	2007
Lisans	Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2005

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

- Intraspecific variations among Turkish *Bellis perennis* L. populations by rapid and pollen analyses, Eskişehir, 2007.
- Characterization of *Bellis perennis* L. volatiles and bioactivity, UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO, ITALIA, 2007

Hobiler

Yüzmek, kitap okumak, müzik dinlemek