İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ammi visnaga ve *Ammi majus* (*Umbelliferae*)'un BİYOKİMYASAL ANALİZİ ve RAPD-PCR YÖNTEMİ İLE POLİMORFİZM ve FİLOGENETİK İLİŞKİSİ

Itır ERKAN
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Prof.Dr. Keriman GÜNAYDIN

Ocak, 2008

İSTANBUL

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, *Ammi visnaga* ve *Ammi majus* bitkilerinin kimyasal bileşiklerinin antioksidan aktiviteleri, antifungal aktiviteleri ve sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi ve RAPD-PCR yöntemi kullanılarak polimorfizmi saptamaya yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım başta Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Güler Temizkan olmak üzere tüm değerli öğretim üyelerine, çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Gülruh Albayrak'a ve desteğinden dolayı Araş. Gör. Ömer Ateş'e, İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Odun Koruma Bölümü ve Teknolojisi Bölümünde görevli, değerli fikirleriyle bana yol gösteren Araş. Gör. Coşkun KÖSE'ye, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Genel Kimya Bölümünde görevli Araş. Gör. Mehmet BOĞA'ya, çalışmamın her aşamasında destek aldığım tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bütün hayatım boyunca olduğu gibi tez çalışmam sırasında göstermiş oldukları anlayış, sabır ve tüm maddi-manevi desteklerinden dolayı, ANNEME ve BABAMA sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ocak, 2008 **Itır ERKAN**

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ i

İÇİNDEKİLER ii

ŞEKİL LİSTESİ v

TABLO LİSTESİ vii

SEMBOL LİSTESİ viii

ÖZET ix

SUMMARY x

1. GİRİŞ 1

2. GENEL KISIMLAR 2

2. 1. UMBELLIFERAE FAMİLYASININ GENEL ÖZELLİKLERİ……2

2. 1. 1. *Ammi visnaga*'nın Yetiştiği Bölgeler ve Yöresel İsimleri……3

2. 1. 2. *Ammi majus*'un Yetiştiği Bölgeler ve Yöresel İsimleri……4

2. 2. KUMARİNLER……5

2. 3. KROMONLAR……10

2. 4. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE……13

2. 4. 1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ……13

2. 4. 2. Reaktif Azot Türleri (RNS) …… 14

2. 4. 3. Oksidatif Stres……15

2. 4. 4. Serbest Radikallerin Etkileri……15

2. 4. 5. Antioksidan Aktivite Ölçüm Yöntemleri……15

2. 5. ANTİFUNGAL AKTİVİTE……17

2. 6. SİTOTOKSİK AKTİVİTE……19

2. 7. MOLEKÜLER MARKIRLAR……20

2. 7. 1. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)……21

2. 8. TIBBİ KULLANIMLARI……23

3. MALZEME VE YÖNTEM …… 25

3. 1. BİTKİ MATERYALİ……25

3. 2. EKSTRAKSİYON İŞLEMLERİ……25

3. 3. ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİN BELİRLENMESİ……....27

3. 3. 1. Ekstrelerin Hazırlanması ……27

3. 3. 2. Çözeltilerin Hazırlanması…….....27

3. 3. 3. Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Flavonoit İçeriklerinin Belirlenmesi……...28

3. 3. 4. Antioksidan Tayin Yöntemleri……30

3. 4. ANTİFUNGAL AKTİVİTE TAYİNİ……..32

3. 4. 1. Mikroorganizmanın Sağlanması……..32

3. 4. 2. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması……32

3. 4. 3. Malt "Extract" Agar Besi Ortamı Hazırlama……...…...…….....33

3. 4. 4. Besiyerine Ekim ve İnkübasyon…….. 33

3. 5. SİTOTOKSİK AKTİVİTE……...34

3. 5. 1. Hücre Kültürü……34

3. 5. 2. Hücre Canlılık Oranının Belirlenmesi……34

3. 6. GENOMİK DNA İZOLASYONU……35

3. 6. 1. Primerler……35

3. 6. 2. Enzim……..36

3. 6. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Koşulları……..36

3. 6. 4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde İncelenmesi……37

3. 6. 5. Polimorfizm Değerlerinin Hesaplanması……..……..38

4. BULGULAR 39

4. 1. KİMYASAL ANALİZ SONUÇLARI.....39

4. 2. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE SONUÇLARI……...39

4. 2. 1. Toplam Fenolik ve Flavonoit İçerikleri……..39

4. 2. 2. Toplam Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi…….…….…….……40

4. 3. ANTİFUNGAL AKTİVİTE SONUÇLARI……43

4. 4. SİTOTOKSİK AKTİVİTE SONUÇLARI……43

4. 5. RAPD YÖNTEMİ İLE BİTKİLERİN ANALİZİ……...46

4. 5. 1. Örnekler Arasındaki Polimorfizm……..…..…...48

5. TARTIŞMA VE SONUÇ …….52

KAYNAKLAR ……..57

ÖZGEÇMİŞ ……..66

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 : Bileşik umbellanın kısımları……...…….....3

Şekil 2.2 : a) Hatay, Reyhanlı-Selam çiftliğinden *A. visnaga*'ya ait bir görünüm
b) Balıkesir-Ayvalıktan *A. majus*' a ait bir görünüm…….....4

Şekil 2.3 : Kumarin'in yapısı……...……....5

Şekil 2.4 : Kromon'un yapısı……10

Şekil 2.5 : Aspergillus niger'in SEM görüntüsü…….....17

Şekil 3.1 : Soxhlet cihazı……26

Şekil 3.2 : Pirokatekolün ölçü grafiği…….29

Şekil 3.3 : Kersetinin ölçü grafiği……...30

Şekil 4.1 : *A. majus* ve *A. visnaga*'nın β - karoten linoleik asit sistemindeki antioksidan aktivitesi……...40

Şekil 4.2 : *A. majus* ve *A. visnaga*'nın DPPH serbest radikal giderim aktivitesi…….....…….....…….41

Şekil 4.3 : *A. majus* ve *A. visnaga*'nın metal bağlama etkisi……..42

Şekil 4.4 : *A. majus* (Ayvalık), *A. visnaga* (Selam) örneklerinin 1,2,3 ve 4 numaralı primerler ile gerçekleştirilen RAPD analizi sonucu elde edilen RAPD markırlarının % 1.5'lik agaroz jeldeki görünümü…….....46

Şekil 4.5 : *A. majus* (Ayvalık), *A. visnaga* (Selam) örneklerinin 5,6 ve 7 numaralı primerler ile gerçekleştirilen RAPD analizi sonucu elde edilen RAPD markırlarının % 1.5'lik agaroz jeldeki görünümü……..46

Şekil 4.6 : *A. majus* (Ayvalık), *A. visnaga* (Selam) örneklerinin 8,9 ve 10 numaralı primerler ile gerçekleştirilen RAPD analizi sonucu elde edilen RAPD markırlarının % 1.5'lik agaroz jeldeki görünümü…….....……...47

Şekil 4.7 : *A. majus* (Ayvalık), *A. visnaga* (Belen) örneklerinin 1-10 numaralı primerler ile gerçekleştirilen RAPD analizi sonucu elde edilen RAPD markırlarının % 1.5'lik agaroz jeldeki görünümü……..47

Şekil 4.8 : *A. majus* (Ayvalık), *A. visnaga* (Belen) örneklerinin 11-20 numaralı primerler ile gerçekleştirilen RAPD analizi sonucu elde edilen RAPD markırlarının % 1.5'lik agaroz jeldeki görünümü…….....48

Şekil 4.9. : Örnekler arasındaki genetik uzaklıklara ait dendrogram……...……51

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 : Reaktif oksijen türleri……**14**

Tablo 2.2 : Reaktif azot türleri…….....**14**

Tablo 3.1 : RAPD analizinde kullanılan 10 nükleotid uzunluğundaki primerler ve baz dizileri……..…….....**36**

Tablo 3.2 : Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler……..**38**

Tablo 4.1 : *A. majus* ve *A. visnaga* bitkilerinin metanol ekstrelerinin toplam fenolik ve toplam flavonoit içerikleri……..**39**

Tablo 4.2 : *A. majus* ve *A. visnaga* bitkilerinin metanol ekstrelerinin β- karoten linoleik asit yöntemine göre antioksidan aktivitesi…….**40**

Tablo 4.3 : *A. majus* ve *A. visnaga* bitkilerinin metanol ekstrelerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi…….**41**

Tablo 4.4 : *A. majus* ve *A. visnaga* bitkilerinin metanol ekstrelerinin metal bağlama etkisi…….**42**

Tablo 4.5 : Bitki ekstrelerinin sitotoksik etkisi……...…….**43**

Tablo 4.6 : Örneklerin açıklamaları……..**44**

Tablo 4.7 : GA17 primeri kullanılarak elde edilen RAPD markırlarının örneklerdeki dağılımı…….....**49**

Tablo 4.8 : GA 11 primeri kullanılarak elde edilen RAPD markırlarının örneklerdeki dağılımı……...……...……..**49**

Tablo 4.9 : GA 05 primeri kullanılarak elde edilen RAPD markırlarının örneklerdeki dağılımı……..……..**50**

Tablo 4.10 : OPA 022 primeri kullanılarak elde edilen RAPD markırlarının örneklerdeki dağılımı…….…..**50**

Tablo 4.11 : Örnekler arasında hesaplanan benzerlik değerleri.....**50**

SEMBOL LİSTESİ

AFLP : "Amplified Fragment Length Polymorphism"
α- Toc : "α- Tocoferol"
ATP : Adenin trifosfat
bç : Baz çifti
bp : "Base pair"
^{o}C : Santigrad derece
DNA : Deoksiribonükleik asit
dNTP : Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA : Etilendiamintetraasetikasit
g : Gram
GC-MS : "Gas Chromatography – Mass Spectrometry"
GTP : Guanin trifosfat
HPLC : "High Performance Liquid Chromatography"
kb : Kilobaz
LC-MS : "Liquid Chromatography – Mass Spectrometry"
M : Molar
mg : Miligram
ml : Mililitre
mM : Milimolar
ng : Nanogram
nm : Nanometre
OD : Optik densite
PCR : "Polimerase Chain Reaction"
RAPD : "Random Amplified Polymorphic DNA"
RFLP : "Restriction Fragment Length Polymorphism"
SEM : "Scanning Electron Microscopy"
SSR : Basit Dizi Tekrarları
Taq : *Thermus aquaticus*
TAE : Tris-asetat EDTA
TBARS : "Thiobarbituric acid reactive substance"
U : Ünite
UV : Ultraviyole
w/v : Ağırlık/hacim
µg : Mikrogram
µl : Mikrolitre
µM : Mikromolar

ÖZET

Ammi visnaga ve *Ammi majus* (*Umbelliferae*)'un BİYOKİMYASAL ANALİZİ ve RAPD-PCR YÖNTEMİ İLE POLİMORFİZM ve FİLOGENETİK İLİŞKİSİ

Bu çalışmada, *Ammi visnaga* ve *Ammi majus*'un çeşitli ekstraktlarının antioksidan, antifungal ve sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi ve RAPD-PCR yöntemiyle filogenetik olarak karşılaştırılması hedeflenmiştir. Bitkilerin metanol ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri beta-karoten-linoleik asit yöntemi, DPPH radikal giderme aktivitesi ve metal bağlama yöntemleri ile belirlenmiştir. Ayrıca bu ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit içerikleri de belirlenmiştir. Bitkilerin antioksidan aktiviteleri karşılaştırıldığında *A. majus*'un toplam fenolik ve flavonoit içeriklerinin *A. visnaga*'ya göre daha yüksek olduğu saptanmasına rağmen β-karoten linoleik asit yönteminde, *A. visnaga*'nın antioksidan aktivitesinin *A. majus*'a göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. DPPH yöntemi sonuçları her iki bitkinin de antioksidan aktivitelerinin yakın olduğunu gösterirken, *A. majus*'un metal bağlama etkisinin *A. visnaga*'ya göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. *A. majus* ve *A. visnaga*'nın metanol, hekzan ve kloroform ekstrelerinin *Aspergillus niger* üzerine antifungal etkileri incelenmiştir ve bu ekstreler, *A. niger*'in gelişimini engelleyememiştir. *A. visnaga* (kök) metanol ekstresi ve *A. visnaga* (tohum) metanol ekstresi, tümör hücrelerin %50 ve/veya üstü oranında, khellin ise DU-145 ve PC-3 hücreleri hariç diğer hücrelerin %50 ve/veya üstü oranında gelişimini engellemiştir. *A. majus*'tan elde edilen uçucu yağ, sadece MCF-7 hücresinde etki göstererek, hücrelerin %88'inin gelişimini engellemiştir. *A. majus* (kök) metanol ekstresi test edilen 4 hücre tipinde de etki göstermemiştir. Ancak *A. visnaga*'nın *A. majus*'a göre fenolik ve flavonoit içeriklerinin düşük olduğu görülmektedir. Bu sonuç, sitotoksik aktivite'den fenolik ve flavonoit bileşiklerin sorumlu olmadığını göstermektedir. Bitkiler moleküler düzeyde RAPD yöntemi ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. *A. visnaga* (Selam) ve *A. majus* arasındaki polimorfizm değeri % 0.041, *A. visnaga* (Selam) ve *A. majus* arasındaki polimorfizm değeri % 0.178, *A. visnaga* (Belen) ve *A. majus* arasındaki polimorfizm değeri ise % 0.65 bulundu. Buna göre *A. visnaga* (Belen) ve *A. visnaga* (Selam) örnekleri arasında %91, *A. majus* ve *A. visnaga* (Selam) örnekleri arasında %89, *A. majus* ve *A. visnaga* (Belen) arasında %81 benzerlik bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan 20 primerin, örneklerde oluşturduğu polimorfik bantlar dikkate alınarak Sorensen indeksine göre filogenetik ilişkinin belirlendiği dendrogram hazırlanmıştır. 20 primerden sadece 4 primerin değerlendirilmesiyle ortaya çıkan bu sonuçların, polimorfik bantlar meydana getirecek daha fazla sayıda primer ile tekrarlanması gerekmektedir. Elde edilen verilerin, ileride yapılacak çalışmalara temel oluşturacağı düşünülmektedir.

SUMMARY

BIOCHEMICAL ANALYSIS and POLYMORPHISM and PHYLOGENETIC RELATIONS AS DETERMINED BY RAPD-PCR OF *Ammi visnaga* and *Ammi majus* (*Umbelliferae*)

In this study, it is targeted that determination of antioxidant, antifungal and cytotoxic activities of *Ammi majus* and *Ammi visnaga* various extracts and phylogenetic relationship of the species by RAPD-PCR method. Methanol extracts of *A. visnaga* and *A. majus* were investigated for their antioxidant capacity by three different assays, namely, the β-carotene linoleic acid systems, DPPH radical scavenging and metal chelating activities. In addition, total phenolics and total flavonoid contents of these methanol extracts were determined. Total phenolics and flavonoid content of *A. majus* was found to be higher than *A. visnaga*. However, antioxidant activity of *A. visnaga* was higher than *A. majus* in β-carotene linoleic acid systems. The DPPH test system results of *A. majus* and *A. visnaga* was found to be similar. Metal chelating potential of *A. majus* is higher than *A. visnaga*. Methanol, hexane and chloroform extracts of *A. majus* and *A. visnaga* were assayed for antifungal activity against *Aspergillus niger* and these extracts did not inhibit *A. niger*. Methanol extract of *A. visnaga* (root) and *A. visnaga* (seed) inhibited 50% or over of tumor cells, khellin inhibited other cells 50% or over of tumor cells except DU- 145 and PC-3 cells. Essential oil of *A. majus* affected only on MCF-7 cell by inhibiting 88% of tumor cells while *A. majus* (root) methanol extract did not inhibit four tested cells type. But *A. visnaga*'s phenolic and flavonoid contents are found to be lower in comparison with to those of *A. majus*. According to this result, phenolic and flovonoid compounds are not responsible for the cytotoxic activity. Plants were comparatively investigated at the molecular level by RAPD technique. Between *A. visnaga* (Selam) and *A. visnaga* (Belen) polymorphism value was determined to be 0.041%, between *A. visnaga* (Selam) and *A. majus* polymorphism value was determined to be 0.178%, between *A. visnaga* (Belen) and *A. majus* polymorphism value was determined to be 0.65%. According to these results, the similarity rate was found as 91% between the samples of *A. visnaga* (Belen) and *A. visnaga* (Selam); 89% between the samples of *A. majus* and *A. visnaga* (Selam); while it was found as 81% between the samples of *A. majus* and *A. visnaga* (Belen). In this study, a dendrogram which shows pylogenetic relationship based on Sorensen index, was prepared regarding to the polymorphic bands, formed by used 20 primers on the samples. These results consisting of 4 primers' evaluation out of 20 primers, are considered to be repeated with more primers which will form polymorphic bands. Data obtained here are expected to constitute a base for the further studies.

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO)'nın 91 ülkenin farmakopelerine ve tıbbi bitkileri üzerinde yapılmış olan bazı çalışmalara dayanarak yaptığı bir araştırmaya göre tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarının 20.000 kadar olduğu belirtilmiştir [Mahindru, 1992]. Bundan dolayı son yıllarda tıbbi bitkiler içermiş oldukları çeşitli aktif maddelerden dolayı ülkemizde de bir çok bilim adamının ilgisini çekmiştir. Umbelliferae ailesi bitkileri içerdikleri aktif maddeler ve uçucu yağlar nedeniyle tıp ve kozmetik alanında oldukça önemli bir yere sahiptir.

Tıbbi önemi olan iki bitki türünden; *Ammi visnaga*'da bulunan furanokromonlar ve *Ammi majus*'ta bulunan furanokumarinler oldukça araştırılmasına rağmen, RAPD-PCR yöntemi ile filogenetik olarak karşılaştırılmasına literatürlerde rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında *Ammi visnaga* ve *Ammi majus* bitkilerinin ekstreleri farklı polariteye sahip çözücüler ile fraksiyonlandırılmış, *Aspergillus niger* mantarına karşı antifungal etkileri belirlenmiş, DPPH **(**Difenilpikrilhidrazil), metal bağlama kapasitesi, β- karoten linoleik asit yöntemleri ile antioksidan aktivitelerinin ölçümü yapılmış, MCF-7 (insan meme adenokarsinoma), PC-3 (insan prostat adenokarsinoma), DU-145 (insan prostat karsinoma), LNCAP (insan prostat karsinoma) kullanılarak, bitki ekstrelerinin bu hücreler üzerindeki sitotoksik aktiviteleri belirlenmiş ve her iki bitki RAPD-PCR yöntemi ile filogenetik açıdan karşılaştırılmıştır.

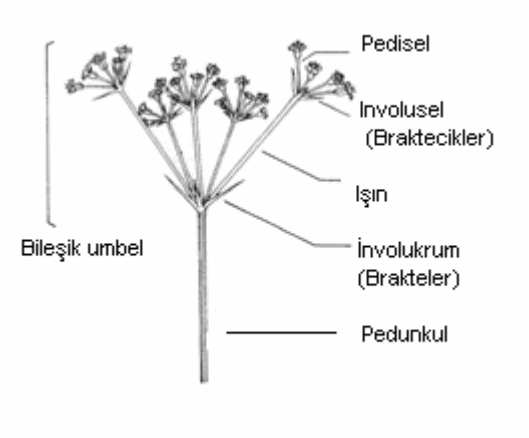
2. GENEL KISIMLAR

2. 1. UMBELLIFERAE FAMİLYASININ GENEL ÖZELLİKLERİ

Apiales ordosuna ait olan Umbelliferae (Apiaceae) familyası, 3 alt familya'ya sahip, yaklaşık 300 cins ve 2500-3000 türü ile oldukça geniş bir familyadır [Heywood, 1979].

Umbelliferae (şemsiyeçiçekliler) üyeleri genellikle aromatik, bir kısmı zehirli, tek, iki ve çok yıllık otsu bitkilerdir. Karakteristik çiçek durumu, meyve yapısı ve kimyasal maddeleri ile Umbelliferae, çiçekli bitkilerin en iyi bilinen familyalarından biridir. Bu familya üyelerinde çiçekler çoğunlukla bileşik umbella şeklindedir (Şekil 2. 1). Türlerinden birçoğu, insan besini, havyan yemi, baharat olarak ve parfümeride kullanılır. *Daucus carota* (havuç), *Apium graveolens* (kereviz), *Foeniculum vulgare* (rezene, arap saçı), *Petroselinum crispum* (maydanoz), *Anethum graveolens* (dere otu), *Coriandrum sativum* (kişniş), *Carum carvi* (karaman kimyonu), *Pimpinella anisum* (anason), *Cuminum cyminum* (kimyon) ve ülkemizde tanınmayan pek çok türün kültürü yapılmaktadır [Yıldız ve Aktoklu, 1987].

Umbelliferae familyası üzerinde dünyanın çeşitli bölgelerinde bir çok laboratuvarda, morfoloji ve anatomi çalışmalarından, sitoloji ve bitki kimyası alanlarına kadar çok geniş bir yelpazede araştırmalar sürmektedir. Bu familya sekonder metabolitler bakımından oldukça zengindir. Familyanın bir çok cinsinden, kumarin, flavanoit, asetilenik bileşikler, seskiterpenik laktonlar ve uçucu yağlar elde edilmekte ve bu bileşiklerden tıbbi ve ekonomik açıdan büyük ölçüde yararlanılmaktadır. Türkiye'de Umbelliferae bitkileriyle yapılmış kimyasal çalışmalar Türkiye Florası'nın 11. cildinde özetlenmiştir [Güner ve diğ., 2000].



Şekil 2. 1. Bileşik umbellanın kısımları (Teillier, 2006)

Takım : Apiales
Familya : Apiaceae (Umbelliferae)
Cins : *Ammi*
Tür : 1. *Ammi visnaga*
2. *Ammi majus*

Bu çalışmada *Ammi visnaga* L. (Lam.) ve *Ammi majus* (L.) bitkileri incelenmiştir.

2. 1. 1. *Ammi visnaga*'nın Yetiştiği Bölgeler ve Yöresel İsimleri

A. visnaga, bir yıllık bir Akdeniz bitkisi olup, Güneyanadolu, Yakındoğu, Afrika'nın kuzeyi ve özellikle Mısır'da yetişmektedir [Tanker ve Tanker, 1998]. Türkiye'de ise, Tekirdağ, İstanbul, Zonguldak, Amasya, Samsun, Trabzon, İzmir, Aydın, Muğla, Antalya, Adana, Gaziantep, Urfa ve Diyarbakır'da yetişmektedir [Davis, 1969]. Flora of Turkey'de belirtilmediği halde Hatay (Reyhanlı civarı)'da bol miktarda yabani olarak yetişmektedir [Beyazıt, 2001].

Çiçek durumu bitki çiçekli iken açık bir şemsiye biçiminde olduğu halde, meyve olgunlaşmasını tamamlarken çiçek sapları birbirine yaklaşır, sertleşir ve şemsiye kapanır. Böylece çiçek durumu 3-6 cm boyunda, elipsoit bir şekil alır (Şekil 2. 2. a).

Sertleşen saplar halk arasında kürdan olarak kullanıldığından bitki Anadolu'da "dişotu", "kürdanotu", "kılır" ya da "hıltan" gibi isimlerle tanınır [Tanker ve Tanker, 1998].

Bitki Mısırda "*Khilla*", "*Chellah*" ya da "*Khella*", Avrupada ise daha çok "*Toothpick herb*" veya "*Bishop's weed*" gibi isimlerle bilinmektedir [El-Fiky ve diğ., 1989].

2. 1. 2. *Ammi majus*'un Yetiştiği Bölgeler ve Yöresel İsimleri

A. majus bir yıllık bir bitki olup, Güney Avrupa, Kuzey Afrika, Kıbrıs, Irak, İran, Suriye'de yetişmektedir. Türkiye'de ise Edirne, İstanbul, Balıkesir, Manisa, Denizli, Antalya, Mersin, Hatay ve Diyarbakır'da yetişmektedir [Davis, 1969]. Bitki ülkemizde "büyük kürdan otu", "büyük dişotu" veya "yalancı dişotu" olarak, Avrupa'da ise "Bishop's Flower" veya "False Queen Anne's Lace" gibi isimlerle bilinmektedir (Şekil 2. 2. b).

A. visnaga'nın yaprak lopları iplik şeklinde olup, genişliği 1 mm.'yi geçmemektedir Meyva zamanında, ışın kısımları kalınlaşmaktadır. *A. majus*'un bazal ve sap üzerindeki yaprakları 4-20 mm. genişlikte olup, yapraklar çentikli görünümdedir ve meyva zamanında bile ışın kısımlarının kalınlaşmaması ile *A. visnaga* türünden farklılık gösterir [Davis, 1969].



a



b

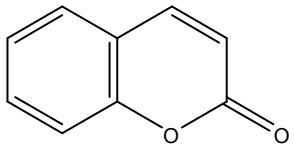
Şekil 2. 2. a) Hatay, Reyhanlı- Selam çiftliğinden *A. visnaga*'ya ait bir görünüm

b) Balıkesir, Ayvalık'tan *A. majus*'a ait bir görünüm

2.2. KUMARİNLER

Kumarinler ilk defa 1820 yılında Fabaceae familyasına ait olan *Dipteryx odorata* bitkisinden izole edilmiştir [Bruneton, 1999]. Kumarinler, benzen halkasına piron katılmasıyla oluşan benzo-α- piron grubuna aittir (Şekil 2. 3). Kumarinler serbest halde ya da glikoz ile kombine halde bulunabilirler [Keating ve O'Kennedy, 1997].

Kumarinler, Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Moraceae, Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae ve Solanaceae familyalarında bulunur [Weinmann, 1997; Matern ve diğ., 1999].



Şekil 2. 3. Kumarin'in yapısı

Kumarinler, kokulu bileşiklerdir ve bu nedenle eczacılıkta, parfümeride, sabun, deterjan, plastik endüstrisinde koku verici olarak kullanılır. Ancak kumarinlerin bazı toksik özellikleri olduğu hatta bazı hayvan testleriyle karaciğer bozukluklarına yol açtığı anlaşıldığından koku verici olarak kullanımı azaltılmış hatta bazı ülkelerde yasaklanmıştır. Kumarinlerin sağlık açısından oldukça yararlı olanları da vardır. Bazı kumarinler damar genişletici, antispazmodik, antiseptik, solunum analeptiği olarak etki gösterirken bazılarının da P vitamini aktivitesini, safra ifrazını arttırıcı etkileri vardır [Tanker ve Tanker, 1998]. Kumarinler, bitki dokularındaki sekonder metabolitlerin çok önemli bir sınıfını oluşturmaktadırlar. Bazı kumarinler, pıhtılaşmayı önlemekte, Parkinson sendromu tedavisinde kullanılmaktadırlar, ayrıca antibakteriyal, antitümör ve antifungal aktivitelere sahiptirler [Mabry ve Ulubelen, 1980]. Furokumarinler de derinin ışığa karşı hassasiyetini arttırdığı için bazı deri rahatsızlıklarında tedavi amaçlı olarak kullanılır. Ancak toksik etkileri nedeniyle kullanım dozları ve şekilleri önemlidir.

Işık altında mavi-yeşil fluoresans gösteren kumarinlerin bu özelliklerinden yararlanılarak kromatografide teşhis etmek, buna bağlı olarak miktar tayini yapmak mümkündür. Ayrıca fenolik hidroksil gruplarının tepkimelerine dayanarak geliştirilen miktar tayini yöntemleri de vardır [Tanker ve Tanker, 1998].

Kumarinler grubuna ait olan furanokumarinlerden özellikle psoralen, bergapten ve ksantotoksin fotosensibilizasyon özelliği gösterir. Son yıllarda 8-metoksi-psoralen (ksantotoksin) psoriasis tedavisinde kullanılmaktadır. Piranokumarinler ise, visnadin, samidin, dihidrosamidin ve dihidroseselin türevi bileşiklerdir [Sakar ve Tanker, 1991].

A. majus linear kumarin ve furanokumarinler açısından zengindir : umbelliferon, psoralen, ksantotoksin, bergapten ve imperatorin. Schoberg ve Sina (1948)'nın çalışmalarından beri *A. majus*'un farmakolojik aktivitesi bilinmektedir [Schoberg ve Sina, 1948].

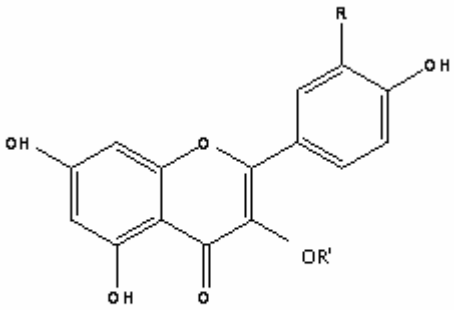
Kuznetsova ve diğ. (1967), *A. majus*'ta bulunan ksantotoksin ve bergapten maddelerinin kolorimetrik metodla tayin edilebildiğini belirtmişlerdir.

Genkina (1981), *A. majus*'ta bulunan ksantotoksin, imperatorin ve bergapten maddelerini ince tabaka kromatografisi ile saflaştırdıktan sonra, kolorimetrik yöntemle tayin edilebildiğini belirtmiştir.

Gromakova (1982), *A. majus* meyvelerinin etanol ekstresinin GC ile tayinini yapmış ve tayin edilen ksantotoksin maddesinin WRS "working reference sample" ile karşılaştırmasını yapmıştır.

Önceki çalışmalarda, bitki ekstraktlarındaki kumarin ve furanokumarinler normal ve ters faz HPLC [Kaminski ve diğ., 2003], kapiller elektrokromatografi [Ganzera ve diğ., 1997], kapiller elektroforez [Ochocka ve diğ., 1995], kütle spektrometri ile gaz kromatografi [Krolicka ve diğ., 2001] ve ince tabaka kromatografisi [Hawryl ve diğ., 2000] gibi çeşitli metotlarla tespit edilmiştir.

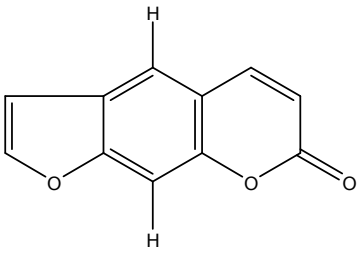
Nasser ve Singab (1998), *A. majus* bitkisinin gövde üstü kısmının metanol ekstresinden kamferol glukozit (1) ve isorhamnetin glukozit (2) izole etmişlerdir.



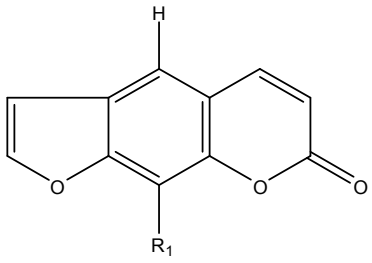
1 R = H

2 R = OCH_3

Ekiert ve diğ. (2000), *A. majus* kallus kültürleri, meyve, yaprak ve kök kısımları etanol ile ekstrakte etmiş, kallus kültürlerinde ve meyvelerinde psoralen, bergapten, ksantotoksin, isopimpinellin, imperatorin ve umbelliferon tespit ederken, yaprak ekstresinde bu 6 maddeden bergapten ve isopimpinellin'e rastlamamışlar, kökte ise isopimpinellin dışındaki diğer maddeler tespit etmişlerdir.



psoralen

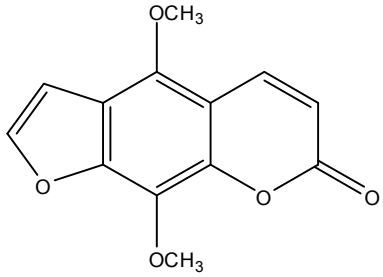


imperatorin

[R_1: $OCH_2 – CH = C (CH_3)_2$]

Krolicka ve diğ. (2001), *Agrobacterium rhizogenes*'in Ri plasmidinin T-DNA'sını *A. majus* bitkisine aktarmış, T-DNA bölgesinin bitki dokusunda anlatım yapması ile *A. majus*'ta saçak kök oluşmuştur. Böylece *in vitro* koşullarda *A. majus*'un saçak kök ve kalluslarında umbelliferon biriktiğini tespit etmişlerdir.

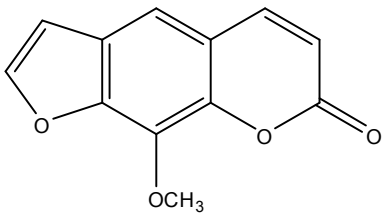
Krolicka ve diğ. (2001), *A. majus* bitkisine *Agrobacterium rhizogenes* bakterisini aktarmış ve sekonder metabolitlerini araştırmışlardır. *A. majus*'un petrol eteri, kloroform ve metanol ekstraksiyonları yapılmış tohum, kallus, hücre süspansiyonu ve saçak köklerinin analizinde umbelliferon tespit edilirken, bergapten, ksantotoksin ve isopimpinellin maddelerinin sadece tohumda bulunduğunu, diğer organlarda saptanmadığını belirtmişlerdir.



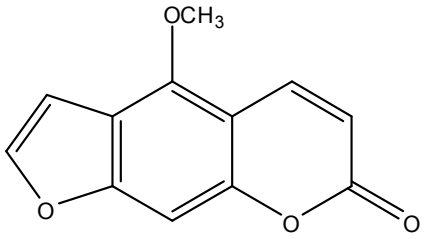
isopimpinellin

Pande ve diğ. (2002), *A. majus*'un in vitro kültürlerinin kloroform ekstresinden ksantotoksin izole etmişlerdir.

Sidwa-Gorycka ve diğ. (2003), *A. majus* bitkisinin saçak kök kültürünün kloroform ekstresini HPLC yöntemini kullanarak incelediklerinde ksantotoksin ve bergapten maddelerini tespit etmişlerdir.

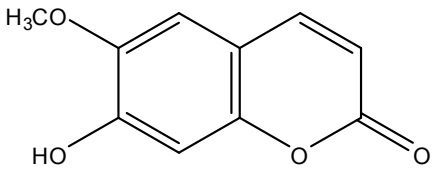


ksantotoksin



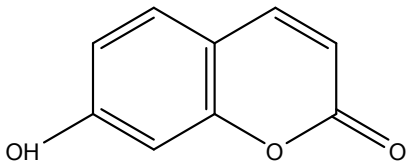
bergapten

Staniszewska ve diğ. (2003), *A. majus*'a *Agrobacterium rhizogenes* baktesi aktarılarak saçak kök kültürü elde etmiştir. *Enterobacter sakazaki* bakterisinin kültürü belirleyici olarak kullanılarak, *A. majus*'un saçak kök, kallus kültürleri ve hücre süspansiyonuna geçen bileşenlerini araştırmışlardır. *A. majus* saçak kök kültürlerinin kallus kültürlerine göre 70, hücre süspansiyonu kültürlerine göre 50 kat daha yüksek gelişim gösterdiğini gözlemlemişlerdir. *A. majus* kloroform ekstresindeki bileşenlerin *E. sakazaki* ile tespitinde bitki kallusunda skopoletin, hücre süspansiyonunda ve saçak kök kültüründe ise umbelliferon tespit etmişlerdir.



skopoletin

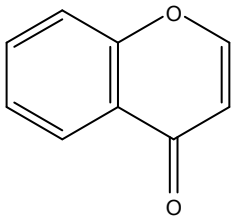
Krolicka ve diğ. (2006), *A. majus*'a *Agrobacterium rhizogenes* bakterisini aktarmışlar ve bitkinin saçak kök kısmında soxhlet ekstraksiyonu ve ASE "accelerated solvent extraction" yöntemleriyle sekonder metabolitlerini araştırmışlardır. Saçak kök kültürlerinin kloroform ekstresinde soxhlet yöntemiyle bergapten izole edilirken, bu yöntemle umbelliferon izole edilememiştir. Yine aynı yöntem kullanılarak bitkinin metanol ekstresinden hem umbelliferon hem de bergapten izole edilmiştir. ASE yöntemiyle bitkinin metanol ekstresinden hem umbelliferon hem de bergapten maddelerini izole etmişlerdir.



umbelliferon

2.3. KROMONLAR

Kromonlar, benzo-γ-piron ya da benzo-4-piron adlarıyla bilinen halka sistemi içeren bileşiklerdir (Şekil 2. 4). Bugüne kadar doğal kaynaklardan elde edilmemiş olmasına rağmen birkaç hidroksi türevi belirli bazı bitkilerde bulunmaktadır [Beyazıt, 2001].



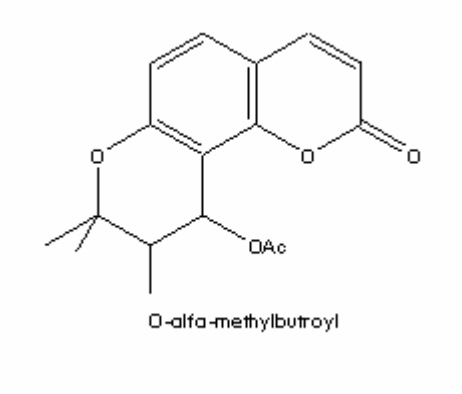
Şekil 2. 4 Kromon'un yapısı

Georgievskii ve diğ. (1990), *A. visnaga*'da bulunan khellin'in fluorimetrik metod ile analizini yapmışlardır.

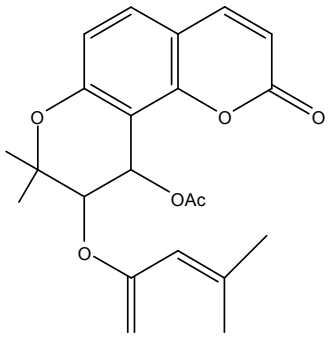
Ganzera ve diğ. (1997), *A. visnaga* bitkisinin metanol ekstraksiyonu sonucunda bileşenlerin HPLC-MS ve LC-MS yöntemleriyle tayinini yapmışlardır. HPLC-MS yöntemiyle khellin, visnagin ve visnadin LC-MS yöntemiyle khellin, visnagin, visnadin, samidin, khellol, khellinol ve khellinin maddelerini saptamışlardır.

Kursinszki ve diğ. (1998), *A. visnaga* bitkisini *Agrobacterium rhizogenes* bakterisi ile enfekte ederek bitkide saçak kök oluşturmuşlar ve saçak kök kültürlerinin kloroform:metanol (1:1) ekstraksiyonu sonucunda HPLC metodunu kullanarak bitkiden khellin ve visnagin izole etmişlerdir.

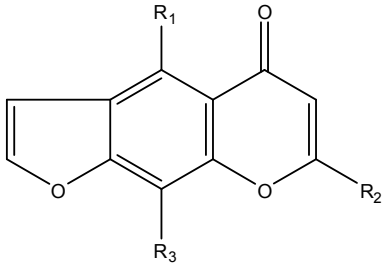
Zgorka ve diğ. (1998), furanokromonların kolorimetrik ve spektrofotometrik, polarografik veya florometrik, HPLC metodları ile belirlenebildiğini ancak *A. visnaga* bitkisinde bulunan piranokumarinlerin bu yöntemlerle kantitatif analizinin sonuç vermeyeceğini belitmişlerdir. Yaptıkları çalışmaya göre, sıvı-faz ekstraksiyon metodu ile HPLC metodunu birleştirdiklerinde saflaştırmanın daha hızlı ve güvenilir sonuç verdiğini gözlemlemişlerdir.



visnadin



samidin



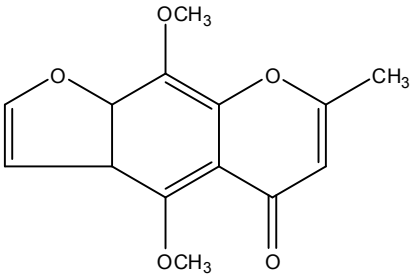
$R_1 = OCH_3$, $R_2 = CH_2OH$, $R_3 = H$ (khellol)

$R_1 = OH$, $R_2 = CH_3$, $R_3 = OCH_3$ (khellinol)

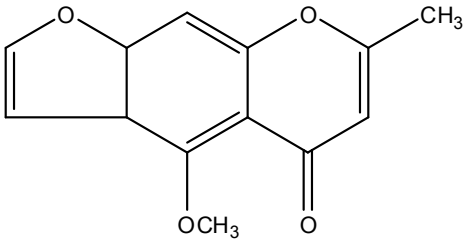
$R_1 = OCH_3$, $R_2 = CH_2O$-Gluc $R_3 = H$ (khellinin)

Ammi visnaga meyvelerinin özünde khellin, visnagin ve visnadin bulunmaktadır. Bunlardan khellin ve visnagin furanokromon türevi, visnadin ise piranokumarin türevidir [Zgorka ve diğ., 1998]. *Ammi visnaga*'da bulunan khellin, başka hiçbir bitkide bulunmamaktadır. Drogun kullanılmasına neden olan etken maddenin khellin olduğu kabul edilmektedir ve drogda %1-2 oranında bulunmaktadır. Beyaz kristalize bir madde olan khellin, suda güç, eter'de kısmen çözünür, derişik H_2SO_4 ile turuncu renk verir [Tanker ve Tanker, 1998].

Günaydın ve Erim (2002), kapiller elektroforez yöntemini kullanarak *A. visnaga* meyvelerinin metanol ekstraktından khellin ve visnagin izole etmişlerdir. Kapiller elektroforezin basit ve hızlı bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

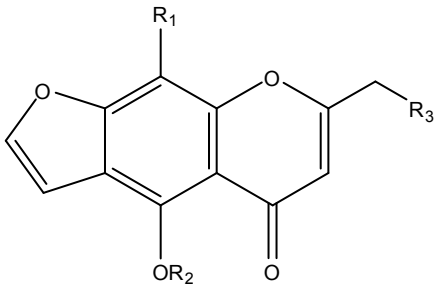


khellin



visnagin

Günaydın ve Beyazıt (2004), UV spektrofotometre ve gaz kromatografi yöntemlerini kullanarak *A. visnaga* meyvelerinin kloroform ekstraktından furanokromon türevleri olan khellin (1) ve visnagin (2), metanol ekstraktından khellol glikozid (3) maddelerini izole etmişlerdir.



1 $R_1 = OCH_3$ $R_2 = CH_3$ $R_3 = H$

2 $R_1 = R_3 = H$ $R_2 = CH_3$

3 $R_1 = H$ $R_2 = CH_3$ R_3 = O-glukoz

Günaydın ve Beyazıt, yayınlanmamış bir çalışmasında *A. visnaga*'nın hekzan ekstresini preparatif TLC ile incelemişler, C-NMR ve H-NMR ile piranokumarin türevlerinden visnadin ve samidin maddelerini tespit etmişlerdir.

2. 4. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE

Oksijen, aerobik organizmalar için gerekli olduğu gibi, bazen de bu organizmalar için tehlikeli olabilmektedir. Oksijeni keşfeden Priestley ve Scheele (1774) ile oksidasyon olayını keşfeden Lavoisier (1781) de oksijenin bu tehlikeli durumundan söz etmişlerdir. Oksijenin hem hayatın kendisi olduğu, hem de hayatın yine oksijen tarafından yok edildiği görüşünü savunmuşlardır [Gilbert ve Colton, 1999]. Havadaki oksijen, mitokondrilerde bulunan elektron taşıma sistemlerinde bir takım enzimsel olaylar ve indirgenme reaksiyonları ile suya çevrilmekte ve zararsız hale gelmektedir [Cadenas ve Davies, 2000]. Bazı durumlarda oksijen, suya kadar indirgenemeden ortamdan uzaklaşır ve henüz reaksiyonunu tam olarak gerçekleştirememiş olan oksijen yarım bıraktığı bu reaksiyonu her türlü hücresel materyalle tamamlama eğilimine girerek çok tehlikeli bir hal alan reaktif türleri oluşturur [Eberhardt, 2001]. Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren moleküllerdir ve oldukça reaktiftirler [Esterbauer ve diğ., 1989]. Reaktif türler, oksidatif saldırılara uğrama eğilimleri yüksek olan lipitler, proteinler, DNA ve karbonhidratlar ile reaksiyona girerler [Bachmayer, 2004].

2. 4. 1. Reaktif Oksijen Türleri “ROS”

Reaktif oksijen türleri ve radikaller, mutasyon, karsinogenez, yaşlılık, gelişim ve çeşitli hastalıklarla yakından ilişkilidir. ROS, hem yararlı, hem de zararlı olmak üzere 2 türlü rol oynamaktadır. Serbest radikaller, kimya biliminde 20. yy’ın başından beri bilinmektedir. Daniel Gilbert ve Rebecca Gersham 1954 yılında yayınladıkları bir çalışmada, serbest radikallerin biyolojik çevrede ve hücre içinde önemli rol oynadıklarını belirtmişlerdir [Gilbert, 1981]. 1956 yılında Herman Denham [Denham, 1956], serbest radikallerin fizyolojik olaylarda ve yaşlanma sürecinde rol oynadığını belirtmiştir [Denham 1981]. Reaktif oksijen türlerinde radikal olanlar türler olduğu gibi radikal olmayanlar da bulunmaktadır (Tablo 2. 1).

Tablo 2. 1. Reaktif oksijen türleri (Halliwell ve Gutteridge, 1999)

Reaktif Oksijen Türleri	Formül
Süperoksit anyon	$^{\cdot}O_2^-$
Hidroperoksil radikali	$HO^{\cdot}_2$
Peroksil radikali	$RO^{\cdot}_2$
Alkoksil radikali	$RO^{\cdot}$
Hidroksil radikali	$^{\cdot}OH$
Hidrojen peroksit	H_2O_2
Ozon	O_3
Singlet oksijen	$^1\Delta gO_2$

2. 4. 2. Reaktif Azot Türleri "RNS"

Reaktif azot türlerinde de reaktif oksijen türlerinde olduğu gibi radikal olanlar ve radikal olmayanlar bulunmaktadır (Tablo 2. 2).

Tablo 2. 2. Reaktif azot türleri (Halliwell ve Gutteridge, 1999)

Reaktif Azot Türleri	Formül
Nitrik oksit	$^{\cdot}NO$
Azot dioksit	$^{\cdot}NO_2$
Peroksinitrit	$ONOO^-$
Peroksinitrik asit	ONOOH
Diazot trioksit	N_2O_3

2. 4. 3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, serbest radikallerin ve oksidanların üretimi ile antioksidan savunma arasındaki dengesizlik için kullanılan bir terimdir [Sies, 1985]. Sigara, alkol kullanımı ve hava kirliliği gibi nedenlerle oluşabilmektedir. Oksidatif stres, Alzheimer, kanser, kalp-damar hastalıkları, şeker hastalığı, Parkinson, romatoid artrit, bağışıklık sistemi bozukluğu gibi hastalıklara ve yaşlanmaya neden olmaktadır [Agarwal ve Prabakaran, 2005].

2. 4. 4. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikallerin hücre içinde proteinler, lipitler, karbonhidratlar, enzimler ve DNA üzerinde önemli etkileri vardır. Reaktif oksijen türleri, deoksiriboz, fosfat omurgasına saldırarak DNA zincirlerine zarar vermekte, pürin ve pirimidin bazlarında da modifikasyonlar oluşturabilmektedir. DNA molekülüne saldırması sonucu yaşlanma ve kanser gibi çeşitli sonuçlar meydana getirebilir. Serbest radikaller, proteinlerin peptit bağlarını koparabilir. Hücre membranındaki proteinleri yıkarak, hücrenin ölümüne sebep olabilir. Lipitler üzerindeki etkisi "lipit peroksidasyonu" olarak adlandırılır. Lipit peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılır, membrandaki fosfolipitlerin oksidasyonuna neden olmaktadır. Lipitlerin peroksidasyonu karbonil ve alkenler gibi hücreye zararlı birçok bileşiğin oluşmasına neden olur [Loeckie, 1999].

2. 4. 5. Antioksidan Aktivite Ölçüm Yöntemleri

Peroksit sayısı yöntemi : Potasyum iyodürden serbest hale geçen iyodun tiyosülfat ile titrasyonu sonucu ortaya çıkan peroksit miktarının ölçülmesi esasına dayanır [Shahidi, 1997].

TBARS yöntemi : Lipit oksidasyonunu ortaya çıkarmak için yaklaşık 40 seneden beri kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde MDA (malondialdehit) ve TBA (tiobarbitürik asit) reaksiyona girerek verdikleri pembe rengin 532-535 nm'de spektrofotometrede ölçümü esasına dayanır [Guillensans ve Guzmanchozas, 1998].

Ransimat yöntemi : Antioksidan maddelerin antioksidatif potansiyellerini belirlemek için kullanılır. Bu yöntemde, doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan bozunma ürünlerinin, su içine absorbe edilerek suyun iletkenliğinin değişmesi prensibine göre çalışan Ransimat cihazı kullanılır [Kowalski ve diğ., 2004].

DPPH (Difenilpikrilhidrazil) yöntemi : Antioksidanlar, $DPPH^{\cdot}$ ile reaksiyona girerek, DPPH radikalini kararlı ve indirgenmiş olan DPPH-H formuna getirebilirler [Benabadji ve diğ., 2004], 517 nm'de absorbans ölçülmesi esasına dayanır [Ohnishi ve diğ., 1994]. Antioksidanlar radikallere proton vererek absorbsiyonu azaltır, reaksiyon karışımının düşük absorbsiyon göstermesi serbest radikal giderim aktivitesinin yüksek olduğunu belirtir [Gülçin ve diğ., 2004].

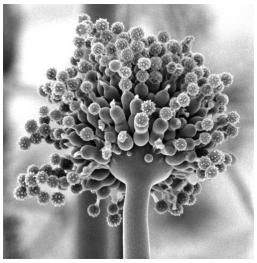
β-karoten linoleik asit yöntemi : β-karoten'in linoleik asit ile reaksiyonu sonucu, oksidatif bozunmanın 450-470 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenir [Amarowicz ve diğ., 2000; Fukumoto ve Mazza, 2000]. Reaksiyon genellikle 50^{o}C'de başlar, basit, duyarlı ve hızlı bir yöntemdir [Koleva ve diğ., 2002].

Metal bağlama yöntemi : Metal iyonları arasında Fe^{2+} iyonları en önemli prooksidan iyonlardandır [Miller ve diğ., 1996]. Ferrozin, Fe^{2+} ile nicel olarak kırmızı renkli kompleksler oluşturur. Analiz örneği antioksidan etkiye sahipse Ferrozin- Fe^{2+} kompleksi bozulur ve kırmızı renk açılır [Gülçin ve diğ., 2004].

2. 5. ANTİFUNGAL AKTİVİTE

Bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli olan özellikleri 1926 yılından beri laboratuvarlarda araştırılmaktadır [Vonderbank, 1949]. Doğada bazı bitkilerin çeşitli bitkilere olduğu kadar, fungus, bakteri ve omurgalılara karşı da zararlı yönde etkileri olduğu bilinmektedir. Bu olay ilk kez 1937 yılında Molish tarafından "allelopati" olarak adlandırılmış ve tanımı; yüksek bir bitkinin, diğer bitkilerin çimlenme, büyüme veya gelişmesi üzerine zararlı etkileri şeklinde yapılmıştır [Molish, 1937]. Fungal enfeksiyonlar, tıpta önemli sorunlardan biridir. Enfeksiyon hastalıkları, kemoterapi, yaş ve bitki patojenleri ile hastaların bağışıklık sistemi baskılanmaktadır. Bağışıklık sistemi zayıf hastalarda genellikle *Aspergillus* türleri enfeksiyona neden olmaktadır [Yamada ve diğ., 1993]. Yıllardan beri pek çok antifungal ajan hazırlanmaktadır ve fungal enfeksiyonlara karşı kullanımı değerlendirilmektedir [Cumningham, 1988]. Tıbbi ve aromatik bitkiler, farmakolojik etkileri açısından çalışmaların odak noktası olmuştur [Locher ve diğ., 1995]. Antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleri sebebiyle uçucu yağlar ilaç yapımında kullanılmaktadır [Sokovic ve diğ., 2002]. Çeşitli bitki ekstraktları ve uçucu yağların bazı bakteri ve mantar türleri üzerine antimikrobiyal özellikleri olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir [Kıvanç ve Akgül, 1986].

Aspergillus niger, Fungi alemi, Ascomycota bölümü, Eurotiomycetes sınıfı, Eurotiales takımı, Trichocomaceae familyasına aittir (Şekil 2. 5).



Şekil 2. 5. *Aspergillus niger*'in SEM görüntüsü (Read, 1991)

A. niger, organik maddeler üzerinde, aerobik koşullar altında gelişir. Doğada toprak, çöp ve çürüyen bitki materyalleri üzerinde bulunur. Geniş bir sıcaklık aralığında (6-47^{o}C) büyüyebilir, optimum sıcaklığı ise 35-37^{o}C'dir. 1,4-9,8 pH aralığında gelişebilir [Schuster ve diğ., 2002].

Bitki ekstrelerinin antifungal etkilerinin yanısıra aflatoksinler (mantar zehiri) de en çok araştırılan konulardan birisidir. Aflatoksinler, insanlarda ve hayvanlarda kronik ve akut zehirlenmelere neden olan mantar zehirlerinden en çok bilinenidir [Smith ve Moss, 1985; Stoloff, 1977]. Japonya, Hindistan ve Rusya gibi ülkelerde bitkilerden elde edilen doğal bileşikler, yiyecek konservelerine konmaktadır. Böylece, bu bitki özütleri aflatoksin gelişimini baskılayabilmektedirler [Thanaboripat ve diğ., 1989; Thanaboripat ve diğ., 1997; Thanaboripat ve diğ., 2000].
Bazı doğal ürünlerin örneğin; tarçın ve karanfil yağı, fenoller [Singh 1983], bazı baharatlar ve bir çok uçucu yağın, mantar gelişimi ve aflatoksin üretimini engelleyici etkisi bildirilmiştir [Mahmoud, 1999].

Jawad ve diğ. (1988), *A. visnaga* etanol ekstresinden alkoloit ve sesquiterpene lakton fraksiyonları izole etmiş ve antimikrobiyal aktivitelerini araştırmıştır. *A. visnaga*'nın *Staphylococcus aureus*, *Bacillus substilis*, *Candida psudotropicalis* ve *Candida albicans* bakterileri üzerinde antimikrobial aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Lamiri ve diğ. (2002), *A. visnaga* bitkisinden su buharı damıtması yöntemiyle elde edilen uçucu yağın *Mayetiola destructor* üzerine antimikrobial aktivitesini araştırmıştır. *A. visnaga* bitkisinin uçucu yağ analizinde linalol ve 3-pentylmethybutanoate bileşenleri tespit edilmiş ve uçucu yağın *Mayetiola destructor* üzerine antimikrobial aktivitesinin çok yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Mahmoud (1999), *Lupinus albus* (Leguminosae), *Ammi visnaga* (Umbelliferae) ve *Xanthium pungens* (Compositae)'in sulu ekstrelerini 5 farklı konsantrasyonda (0.2 %, 0.4 %, 0.6 %, 0.8 %, 1.0 %) hazırlamış ve bu ekstrelerin *Aspergillus flavus*'un miselyum gelişimini ve aflatoksin üretimini engellediğini gözlemiştir.

2. 6. SİTOTOKSİK AKTİVİTE

Sitotoksik deneyler *in vitro* çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Nötral kırmızı (neutral red) ve MTT (3-(4,5-Dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid) deneyleri sitotoksisite tespitinde veya toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde sık kullanılan yöntemlerdir. Nötral kırmızı analizi, hücre canlılığını ölçmek için kullanılan bir yöntem olup ilk kez 1984 yılında Borenfreund ve Puerner tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntemde, nötral kırmızı boyası canlı, zarar görmemiş hücrelerin lizozomlarında birikir. MTT analizi ilk kez 1983 yılında Mosmann tarafından tanımlanmıştır [Fotakis ve Timbrell, 2006]. MTT, canlı mitokondri hücrelerinde süksinat-dehidrojenaz enzimine bağlandığında suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerini oluşturur, kristallerin çözülüp, spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanır [Garn ve diğ., 1994; Thom ve diğ., 1993; Fotakis ve Timbrell, 2006].

2. 7. MOLEKÜLER MARKIRLAR

Moleküler markırlar, filogeni, taksonomi, ekoloji, genetik gibi çeşitli bilim dallarının ve bitki ve hayvan türlerini ıslahı araştırmalarını kolaylaştırmıştır. Genellikle bir moleküler markırda olması istenen özellikler şunlardır; yüksek derecede polimorfik özellik, kodominant kalıtım, genomda sıkça bulunma, genomda düzgün dağılım, kolay erişim (satın alma veya hızlı işlemler gibi), kolay ve hızlı analiz etme, yüksek tekrarlanabilirlik, laboratuvarlar arası kolay veri alışverişi, geliştirilmesinin ve analizinin düşük maliyetli olması. Sayılan bütün özellikler bir moleküler markırda bulunmaz, en azından birkaçının birarada olması istenir [Weising ve diğ., 2005].
Moleküler markır belirleme yöntemleri 2 grupta incelenirler: 1-RFLP gibi hibridizasyona dayalı teknikler, 2- PCR yöntemine dayalı teknikler.

Hibridizasyona dayalı moleküler markırlar arasında en yaygın olarak Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) kullanılmaktadır. İlk kez 1975 yılında Adeno-virüs serotiplerinin sıcaklığa duyarlı mutasyonlarının genetik haritalanmasında kullanılmıştır [Grodzicker ve diğ., 1975]. Daha sonra insan genomu haritalamasında [Botstein, 1980], bitki genomu çalışmalarında kullanılmıştır [Helentjaris ve diğ., 1986]. İzole edilen DNA, bir veya daha çok restriksiyon enzimi ile kesilir. Elde edilen DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezi kullanılarak ayrıştırılır. DNA fragmentleri agaroz jelden Southern blotting membranına aktarılır. Daha sonra problar ile hibridize edilir. Son aşamada hibridizasyon ürünlerinin X- ray filmi üzerine otoradyogramı alınır [Semagn ve diğ., 2006]. RFLP, yüksek tekrarlanabilinirliğe sahip olması, bütün türlerde uygulanabilir olması, DNA dizi bilgisi gerektirmemesi ve güvenli olması gibi üstünlüklerine karşın, yüksek kalite ve miktarda DNA gerektirmesi ve radyoaktif etiketleme gerektirmesi gibi nedenlerden dolayı zordur [Budak ve diğ., 2004].
En yaygın olarak kullanılan PCR markır belirleme yöntemleri : Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi (AFLP), Basit Dizi Tekrarları (SSR) ve Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)'dır. AFLP, RFLP markırları ile PCR temelli markırların kombinasyonu şeklindedir [Lynch ve Walsh, 1998]. Az sayıda bazdan oluşan adaptör oligonükleotidler ve spesifik restriksiyon enzimleriyle meydana gelen genomik restriksiyon fragmentlerinin PCR ile çoğaltılması esasına dayanır [Vos ve diğ., 1995].

AFLP, yüksek polimorfizm sağlaması, bütün türlerde uygulanabilir olması, DNA dizi bilgisi gerektirmemesi, küçük RFLP parçaları ile çalışabilmesi gibi üstünlüklere sahipken, çok hassas olması ile bant görünüşlerinin değişikliğine sebep olması ve iyi seçilmiş primerlere gerek duyulması gibi olumsuzluklara sahiptir [Budak ve diğ., 2004]. SSR, ilk kez 1983 yılında Delseny ve ark. tarafından kanıtlanmıştır [Delseny ve diğ., 1983]. SSR, 2-6 ardışık tekrarlı nükleotidleri ifade etmektedir [Caldeira ve diğ., 2002]. Bu yöntem, genomda tekrarlanan dizilerin iki yanına primerler bağlanarak, o bölgenin PCR'da çoğaltılması esasına daynır. PCR ürünleri poliakrilamid jelde gümüş boyama ile görünür hale getirilir veya etidyum bromür içeren agaroz jelde ayrıştırılır [Semagn ve diğ., 2006]. Bu yöntem, insan [Santos ve diğ., 1993], memeli [Ishibashi ve diğ., 1997], kuş [Gibbs ve diğ., 1997], salyangoz [Mavarez ve diğ., 2000], mantarların [Groppe ve diğ., 1995] genetik yapı çalışmalarında kullanılmıştır. SSR, yüksek tekrarlanbilirlik, yüksek polimorfizm, radyoaktif işaretleme gerektirmeme gibi üstünlüklere sahipken, DNA dizi bilgisi gerektirmesi, çok güvenli olmayışı ve bütün türlerde uygulanamayışı gibi olumsuzluklara sahiptir [Budak ve diğ., 2004].

2. 7. 1. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

RAPD markırı, 1990 yılında geliştirilmiş olup, rastgele seçilmiş kısa oligonükleotid primerler kullanılarak çoğaltımının yapılması ve çoğaltım ürünlerinin jel elektroforezi ile ayrılması esasına dayanır [Welsh ve Mc Clelland, 1990; Williams ve diğ., 1990]. Çeşitli organizmalardaki benzerliği ve genetik çeşitliliği belirlemede kullanılan basit ve hızlı bir yöntemdir [Fischer ve diğ., 2000]. Bu yöntemde kullanılan primerler en az % 50 guanin ve sitozin içeriğine sahiptirler. Ayrıca primerlerin çok değişik DNA bölgelerine bağlanma olasılığını arttırmak için daha düşük sıcaklık dereceleri (34-36^{o}C) kullanılmaktadır [Williams ve diğ., 1990]. Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları agaroz jelde gözlenen farklı sayı ve uzunluktaki bantların oluşumuna neden olur. RAPD, DNA dizi bilgisi gerektirmemesi, az miktar ve orta kalitede DNA gerektirmesi, radyoaktif işaretleme gerektirmemesi ve göreceli olarak kolay olması gibi üstünlükleri olmasına karşın, düşük tekrarlanabilirlik göstermesi ve bütün türlerde uygulanamaması gibi olumsuzluklara sahiptir [Budak ve diğ., 2004].

RAPD yöntemi; genetik haritalama, genotipik tanımlama, tür içi ve türler arası genetik çeşitliliğin tespiti, filogenetik ilişkilerin belirlenmesi, genetik markırların geliştirilmesi gibi alanlarda kullanılmaktadır.

RAPD yöntemi pek çok bitki türünde kullanılmıştır [Heinze ve Schmidt, 1955; Kubota ve diğ., 1993; Hallden ve diğ., 1994; Poulsen ve diğ., 1995; Doldi ve diğ., 1997; Golembievski ve diğ., 1997; Samec ve diğ., 1998; Singh ve diğ., 2006].

Demeke ve ark. (1996), 28 patates genotipinin RAPD yöntemi ile genetik farklılığını araştırmışlardır. Çalışmada 12 primer kullanmış, çoğaltım sonrasında toplam 158 bant gözlemiş ve 30 polimorfik bant tespit etmişlerdir.

Raghunathachari ve ark. (2000), *Oryza sativa* ve 18 varyasyonu ile yaptıkları RAPD analizi sonucunda, toplam 144 adet bant'tan %95.1'inin polimorfik olduğunu gözlerken bu yöntemin hızlı ve güvenilir olduğunu belirtmişlerdir.

Fu ve ark. (2003), Doğu Çin'de tıbbi ve endemik bir bitki olan *Changium smyrnioides* (Apiaceae)'in populasyonlarının RAPD analizi için 13 primer kullanmış ve çoğaltım sonrasında toplam 92 bant gözlemiştir. Genetik çeşitliliğin populasyonlar arası %51.2, populasyon içi ise % 48.8 olduğu, sonuçların daha önce yapılan alloenzim analizleriyle uyumlu olduğunu belirtmişlerdir.

2. 8. TIBBİ KULLANIMLARI

A. majus ve *A. visnaga*, angina pectoris, psoriasis (sedef) ve vitiligo hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır.

A. visnaga'da bulunan visnagin, khellin ve khellol-glukozid; kalp, akciğer ve üriner damarlar üzerinde antispazmodik etkiye sahiptir. Piranokumarin ise kalp damarlarını genişletme özelliği açısından, khellin'e göre 5-10 kez daha etkilidir. Piranokumarin, angina pectoris'in tedavisinde ve hastalıktan korunmada, kalp kası düzensizliğinin tedavisinde kullanılır [Greinwald ve Stobernack, 1990].

Nedeni tam olarak aydınlatılamayan psoriasis hastalığı, hastalığın bulunduğu deri bölgesinin kızarık bir hal alması ve üzerinde kalın, gümüş rengi kabuklar oluşması ile kendini göstermektedir [Disepio ve diğ., 1999]. *A. majus* meyveleri psoriasis tedavisinde kullanılmaktadır [Hamerski ve diğ., 1990; Koul ve Koul, 1993].

Vitiligo, bulaşıcı olmayan, sonradan kazanılmış, melanositlerin tahribatı sonucu meydana gelen, zamanla sayısında ve büyüklüğünde artış gösteren beyaz lekelerle karakterize olmuş, pigmentasyon bozukluğudur [Ogg ve diğ., 1998; Nordlund ve Ortonne, 1998]. Bu hastalık M.Ö 1500'lü yıllardan beri bilinmektedir [Zhang ve diğ., 2004]. Vitiligo, ırk ve sosyoekonomik durum gözetmeksizin dünya populasyonunun %1-2'sinde görülmektedir [Lerner, 1959]. Genetik çalışmalar, vitiligonun mendelyen geçişe uymayan multifaktöryel, poligenik bir hastalık olduğunu desteklemektedir [Majumdar ve diğ., 1988]. Kromozom 1p31'de bulunan AIS 1 lokusu ile bağlantılı olduğu rapor edilmiştir. Kromozom 2p16'da Katalaz gen VIT1 üzerinde ve 1,7,8,11,19 ve 22. kromozomlarda da tanımlanmıştır [Fain ve diğ., 2003].

Vitiligo tedavisinde, en yaygın olarak ağızdan ya da bölgesel olarak psoralen fotokemoterapisi (PUVA) uygulanmaktadır. Psoralen, furokumarin yapısında bir maddedir ve 5-metoksi psoralen veya 8-metoksi psoralen şeklinde ağızdan ilaç olarak alınıp ya da çeşitli biçimde pomat olarak cilde uygulanmakta ve daha sonra vitiligolu bölgeler UVA ışığına maruz bırakılmaktadır.

Ancak, psoralen çok toksik bir maddedir, karaciğerde hasara neden olabilmekte, deride irritasyona, erken deri yaşlanmasına, hiperpigmentasyona, fotohassaslığa ve deri kanserine yol açabilmektedir [Günaydın ve Ünal, 1996]. Son çalışmalar, khellin ve UV-A ile yapılan tedavinin, psoralen sonuçlarıyla mukayese edilebilir (KUVA %44, PUVA %53) bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir [Valkova ve diğ., 2004].

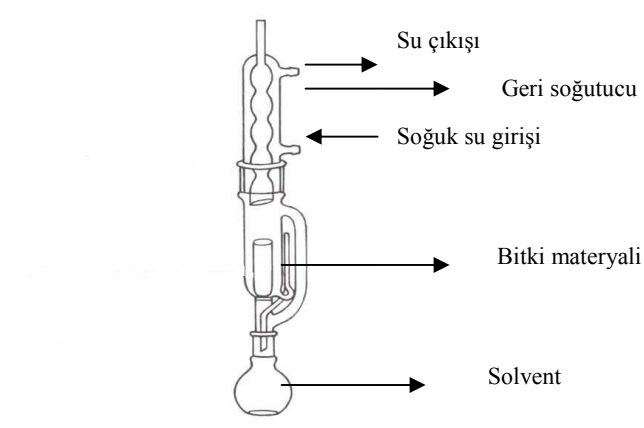
3. MALZEME VE YÖNTEM

3. 1. BİTKİ MATERYALİ

Bu çalışmada *Ammi majus* ve *Ammi visnaga* bitkileri kullanılmıştır. *Ammi majus*, Türkiye Florası'nda belirtildiği gibi Ayvalık'ın (Balıkesir) 9 km. kuzeyinden, *Ammi visnaga* ise Belen (Hatay) ve Reyhanlı-Selam çiftliği (Hatay) olmak üzere 2 farklı bölgeden toplanmıştır. Selam çiftliği'nden sağlanan bitki örneği, sadece RAPD-PCR çalışmalarında kullanılmıştır. Bitkiler İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasotik Botanik Anabilimdalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Emine Akalın tarafından teşhis edilmiştir. *A. majus* (Herbaryum No: 83915) ve *A. visnaga* (Herbaryum No: 83916) bitkilerinin birer örneği, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi herbaryumunda saklanmaktadır.

3. 2. EKSTRAKSİYON İŞLEMLERİ

A. majus tohumlarından 260 g ve *A. visnaga* tohumlarından 350 g tartılarak ayrı soxhlet cihazlarında (Şekil 3. 1) paralel olarak aynı işlemlerle ekstrakte edildi. Tartılan tohum süzgeç kağıdı ile hazırlanan bir kartuşa konularak Soxhlet cihazına yerleştirildi ve 2000 ml'lik bir balona 1000 ml hekzan konularak ısıtıcı üzerinde 10 saat ekstrakte edildi. Rotary evaporatörde hekzan ekstresi 50-60 ml'ye kadar derişiklendirildi, kullanılıncaya kadar buzdolabında saklandı. Yine aynı soxhlet cihazına çözücü olarak 1000 ml kloroform konularak ısıtıcı üzerinde 10 saat ekstrakte edildi. Rotary evaporatörde kloroform ekstresi 50-60 ml'ye kadar derişiklendirildi, kullanılıncaya kadar buzdolabında saklandı. Son olarak soxhlete 1000 ml metanol konularak, 10 saat ekstraksiyon yapıldı. Rotary evaporatörde metanol ekstresi 50-60 ml'ye kadar derişiklendirildi, kullanılıncaya kadar buzdolabında saklandı.



Şekil 3. 1. Soxhlet Cihazı

Elde edilen metanol ekstraktı, 500 ml'lik bir ayırma hunisinde 50'şer ml hekzanla 3 kez ekstrakte edildi. Hekzanlı fazlar birleştirildikten sonra rotary evaporatörde çözücü uçuruldu, hekzan ekstresi erlene aktarıldı (1). Hekzanla tüketilmiş olan metanol ekstraktı, yine 500 ml'lik bir ayırma hunisinde 50'şer ml kloroform ile 3 kez ekstrakte edildi. Kloroformlu fazlar birleştirildikten sonra rotary evaporatörde çözücü uçuruldu, kloroform ekstresi erlene aktarıldı (2). Hekzan ve kloroform ile tüketilmiş olan metanol ekstraktı 500 ml'lik bir ayırma hunisinde 50'şer ml eter ile 3 kez ekstrakte edildi. Eterli fazlar birleştirildikten sonra rotary evaporatörde çözücü uçuruldu, eter ekstresi erlene aktarıldı (3). Geriye kalan metanol fazları birleştirildi, erlene aktarıldı (4). Elde edilen bu ekstreler, antioksidan, sitotoksik ve antifungal aktivite çalışmalarında kullanılıncaya kadar saklandı.

A. visnaga'dan khellin'i saflaştırmak için, 55 g. *A. visnaga* tohumu 300 ml. distile su ile ısıtıcının üzerinde kaynatıldı, süzüldü. İçerisine Al_2O_3 konularak hazırlanmış bir kromatografi kolonundan süzüntü geçirildi. Daha sonra süzüntü, kloroform ile ekstrakte edildi. Kloroform ekstresine Na_2SO_4 eklendi ve çözücü rotary evaporatörde yoğunlaştırıldı. Elde edilen maddenin tespiti ise çözücü olarak etil asetat kullanılarak, ince tabaka kromatografisi yöntemiyle yapıldı.

A. visnaga tohumlarının hekzan ekstresi ince tabaka kromatografisi yöntemi ile incelendi, laboratuvarda standart olarak bulunan visnadin ve samidin maddelerinin Rf değerleri ile karşılaştırıldı.

3. 3. ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİN BELİRLENMESİ

3. 3. 1. EKSTRELERİN HAZIRLANMASI

A. majus (50 g.) ve *A. visnaga* (50 g.) tohumları 1000 ml'lik balonlara konularak üzerine 500'er ml. metanol ilave edildikten sonra geri soğutucu altında 2 kez (24 saat) ekstrakte olmaları sağlandı. Süzme işlemi yapıldıktan sonra, rotary evaporatörde çözücüleri uçuruldu ve tartıldı (*A. majus* 220 mg, *A. visnaga* 130 mg.). *A. majus*, 220 ml. metanolde, *A. visnaga* ise 130 ml. metanolde çözülerek, ekstrelerin 1000 ppm konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı.

Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

β-karoten, linoleik asit, kersetin, pirokatekol, DPPH, BHT, Folin-Ciocalteu reaktifi ve α-tokoferol Sigma firmasından; demir (II) klorür tetrahidrat, ferrozin, Tween-40, kloroform, diklorometan, metanol, etanol, alüminyum nitrat, potasyum asetat Merck firmasından temin edildi.

3. 3. 2. Çözeltilerin Hazırlanması

0,1 mM DPPH Çözeltisi

4 mg DPPH 100 ml etanolde çözülerek hazırlandı.

2 mM $FeCl_2$ Çözeltisi

0,0096 g $FeCl_2$ 25 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

β-karoten-Linoleik Çözeltisi

β-karoten çözeltisi, 0,2 mg β-karoten 1 ml kloroformda çözülerek hazırlandı. Bu çözeltiye 20 µg linoleik asit ve 200 mg Tween 40 ilave edildi. Kloroform rotary evaporatörde uçurulduktan sonra 50 ml oksijen gazı ile doyurulmuş distile su ilave edildi ve 20 dakika karıştırıldı.

5 mM Ferrozin 3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-fenilsülfonikasit)-1,2,4-triazin mono sodyum tuzu Çözeltisi

0,06156 g Ferrozin 25 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

%2'lik Na_2CO_3 Çözeltisi

2 g Na_2CO_3 tartılarak 100 ml'lik balon joje içine alındı ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

%10'luk Alüminyum Nitrat Çözeltisi

1,76 g $Al(NO_3)_3.9H_2O$ bileşiği distile su ile 10 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

1 M Potasyum Asetat Çözeltisi

0,9615 g potasyum asetat 10 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Kersetin Çözeltisi

25,8 mg kersetin 25 ml etil alkolde çözülerek 1000 ppm'lik konsantrasyonda kersetin çözeltisi hazırlandı.

Pirokatekol Çözeltisi

10 mg pirokatekol 100 ml distile suda çözülerek 100 ppm'lik konsantrasyonda pirokatekol çözeltisi hazırlandı.

BHT (2,6-di-t-bütil-1-hidroksitoluen) Çözeltisi

10 mg BHT 10 ml etanol içerisinde çözülerek 1000 ppm'lik BHT çözeltisi hazırlandı.

EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) Çözeltisi

10 mg EDTA 10 ml etanolde çözülerek 1000 ppm'lik EDTA çözeltisi hazırlandı.

α-tokoferol Çözeltisi

%97'lik 10,31 mg α-tokoferol 10 ml etanolde çözülerek 1000 ppm'lik α-tokoferol çözeltisi hazırlandı.

3. 3. 3. EKSTRELERİN TOPLAM FENOLİK VE FLAVONOİT İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ

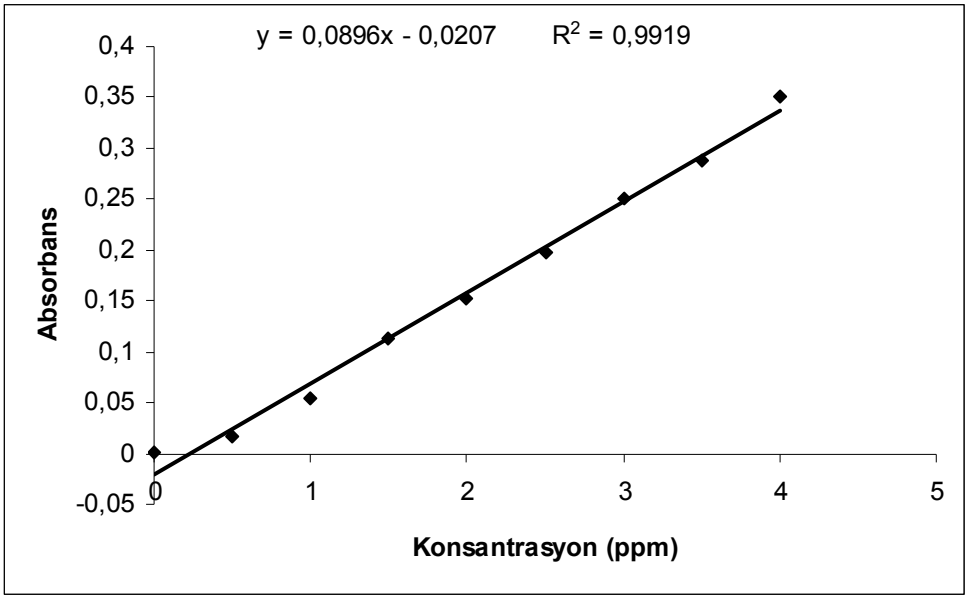
TOPLAM FENOLİK İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi [Öztürk ve diğ., 2007]. *A. majus* ve *A. visnaga*'nın metanol ekstrelerinin 1000 ppm konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. 1 mg ekstre içeren örnek çözeltileri 46 ml'ye tamamlandı. Bu karışıma 1 ml Folin –Ciocalteu Reaktifi (FCR) ve 3 dakika sonra %2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 3 ml ilave edildi. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında bekletildi ve örneklerin absorbansları 760 nm'de okundu.

Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden (Şekil 3. 2) elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi [Öztürk ve diğ., 2007].

Absorbans = 0,0896(µg) – 0,0207 (R^2 : 0,9919)

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı.



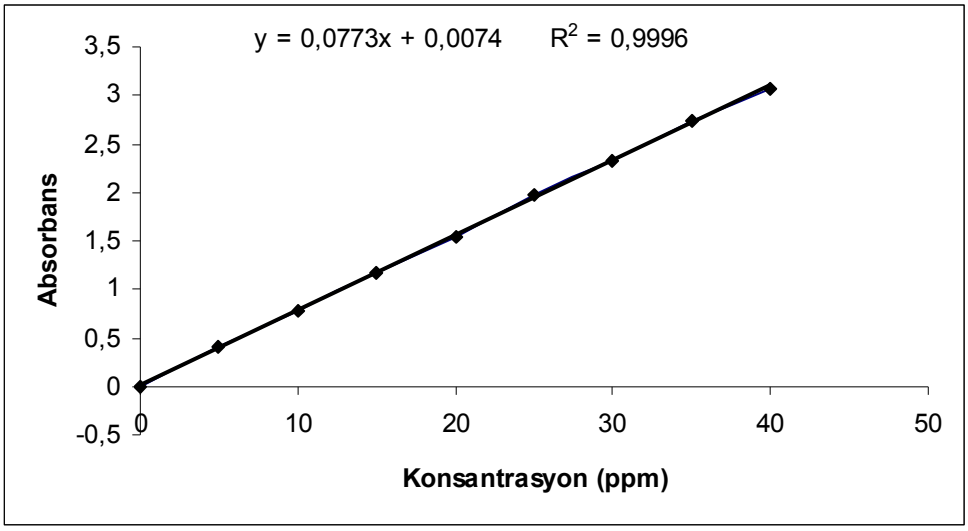
Şekil 3. 2. Pirokatekolün ölçü grafiği

Toplam Flavonoit İçeriklerinin Belirlenmesi

Hazırlanan ekstrelerin toplam flavonoit içerikleri kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat metodu ile belirlendi [Topçu ve diğ., 2007]. 1000 ppm'lik kersetin çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 ve 200 µl alınarak hacimleri %80'lik etanol ile 4,8 ml'ye tamamlandı. 0,1 ml 1 M potasyum asetat eklendi ve bir dakika sonra 0,1 ml %10'luk alüminyum nitrat ilave edildi. 40 dakika inkübasyon süresinden sonra 415 nm'de kontrole karşı UV spektrofotometresinde absorbansları okundu. Aynı şekilde *A. majus* ve *A. visnaga*'nın metanol ekstrelerinin tek konsantrasyonda (100 ppm) hazırlanan çözeltilerinin de absorbans değerleri okundu. Ekstrelerin toplam flavonoit içerikleri, standart kersetin grafiğinden (Şekil 3. 3) elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi [Topçu ve diğ., 2007].

Absorbans = 0,0773 (µg) + 0,0074 (R^2 : 0,9996)

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı.



Şekil 3. 3. Kersetinin ölçü grafiği

3. 3. 4. Antioksidan Tayin Yöntemleri

Antioksidan aktivite tayini için *A. majus* ve *A. visnaga*'nın metanol ekstrelerinde DPPH serbest radikal giderim aktivitesi, metal bağlama aktivitesi ve β-karoten-linoleik asit test sistemi ile toplam antioksidan aktivitesi tayin edildi.

DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Giderim Yöntemi

A. majus ve *A. visnaga* metanol ekstrelerinin serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil serbest radikali (DPPH) kullanılarak belirlendi. Bitkilerin 10 mg metanol ekstreleri 10 ml etanolde çözerek stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 50, 125, 250 ve 500 µl alınarak etanol ile hacimleri 1 ml'ye tamamlandı ve üzerlerine 0,1 mM DPPH çözeltisinden 4 ml ilave edildi. Hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 30 dakika inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Elde edilen bu absorbans değerlerinden % inhibisyon değerleri hesaplandı. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi [Kabouche ve diğ., 2007]. Serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

% İnhibisyon = ($A_{kontrol}$ - $A_{örnek}$) / A kontrol x 100

A : Absorbans

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak BHT ve α-tokoferol kullanıldı.

Metal Bağlama Yöntemi

Metal Bağlama Aktivitesi Fe(II)- Ferrozin metoduna göre belirlendi. *A. majus* ve *A. visnaga*'nın 10 mg metanol ekstreleri 10 ml etanolde çözerek stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 125, 250, 500 µl alınarak distile su ile hacimleri 4700 µl'ye tamamlandı ve üzerlerine sırasıyla 100 µl 2 mM'lık Fe(II) ve 200 µl 5 mM'lık ferrozin reaktifleri eklendi. 10 dakika inkübasyondan sonra 562 nm'de absorbansları okundu [Gülçin ve diğ., 2003]. Metal bağlama aktivitesi (% İnhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

% İnhibisyon = ($A_{kontrol}$- $A_{örnek}$) / $A_{kontrol}$ x 100

A: Absorbans

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak kersetin ve EDTA kullanıldı.

β-Karoten-Linoleik Asit Yöntemi

A. majus ve *A. visnaga* metanol ekstreleri (10 mg) 10 ml etanolde çözerek stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 50, 125, 250 ve 500 µl alınarak distile su ile hacimleri 1 ml'ye tamamlandı ve üzerilerine β-karoten-linoleik asit çözeltisinden her bir örneğe 4 ml ilave edilir edilmez ultraviyole spektrofotometresi kullanılarak başlangıç absorbansları 470 nm'de ölçüldü. Hazırlanan çözeltiler 50 ºC'de 120 dakika bekletildi. Bu süre sonunda absorbanslar tekrar ölçüldü. β-Karotenin renk açılım oranı aşağıdaki formül ile hesaplandı [Cheung ve diğ., 2003].

R = In (a/b)/t

In = doğal logaritma

a = başlangıç absorbansı

b = t zaman (dakika) inkübasyonundan sonraki absorbans

Toplam Antioksidan Aktivite (% İnhibisyon) = [($R_{kontrol}$-$R_{örnek}$)/ $R_{kontrol}$] x 100

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak BHT ve α-tokoferol kullanıldı.

3. 4. ANTİFUNGAL AKTİVİTE TAYİNİ

3. 4. 1. MIKROORGANIZMANIN SAĞLANMASI

Çalışmada kullanılan *Aspergillus niger* (ASN 5131) küf mantarı, İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi, Orman Biyolojisi ve Odun Koruma Teknolojisi Anabilim Dalı, Mikoloji Laboratuvarlarından sağlanmıştır.

3. 4. 2. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

A. majus kökleri (27,4 g), 1000 ml'lik balonun içerisine konuldu, üzerine 500 ml metanol ilave edilerek, ısıtıcının üzerinde ekstrakte edildi. Süzüldü ve rotary evaporatorde çözücüsü uçurularak, yoğunlaştırıldı (0,4 g tartıldı). *A. visnaga* kökleri (27,4 g) 1000 ml'lik balonun içerisine konuldu, üzerine 500 ml metanol ilave edilerek, ısıtıcının üzerinde ekstrakte edildi. Süzüldü ve rotary evaporatorde çözücüsü uçurularak, yoğunlaştırıldı (1,1 g tartıldı).

A. majus metanol ekstresi 500 ml'lik bir ayırma hunisinde 200 ml hekzan ile 2 kez ekstrakte edildi. Hekzanlı fazlar birleştirildikten sonra rotary evaporatorde çözücü uçuruldu (0,1 g tartıldı). *A. visnaga* metanol ekstresi 500 ml'lik bir ayırma hunisinde 200 ml hekzan ile 2 kez ekstrakte edildi. Hekzanlı fazlar birleştirildikten sonra rotary evaporatorde çözücü uçuruldu (0,1 g tartıldı). *A. majus* metanol ekstresi 500 ml'lik bir ayırma hunisinde 200 ml kloroform ile 2 kez ekstrakta edildi. Kloroformlu fazlar birleştirildikten sonra rotary evaporatorde çözücü uçuruldu (0,1 g tartıldı). *A. visnaga* metanol ekstresi 500 ml'lik bir ayırma hunisinde 200 ml kloroform ile 2 kez ekstrakte edildi. Kloroformlu fazlar birleştirildikten sonra rotary evaporatorde çözücü uçuruldu (0,1 g tartıldı).

Bitki ekstrelerinin %2'lik konsantrasyonda hazırlanması için, ekstrelerin üzerine çözücüleri ilave edildi.

3. 4. 3. Malt "Extract" Agar Besi Ortamı Hazırlama

35 g. malt "extract" agar, bir erlene konularak üzerine 1 litre distile su ilave edildi. Ağzı kalaycı pamuğuyla kapatılarak, otoklavda 121^{o}C'de 1,1 atm basınçta 15 dakika sterilize edildi.

3. 4. 4. Besiyerine Ekim ve İnkübasyon

Besiyeri otoklavdan çıkartıldıktan sonra 10 dakika steril kabinde soğumaya bırakıldı. 6 petri için 20'şer ml besiyeri hazırlandı ve besiyerlerine % 2'lik konsantrasyonda hazırlanmış bitki ekstreleri sırasıyla ilave edildi; *A. majus* kloroform ekstresi, *A. majus* hekzan ekstresi, *A. visnaga* kloroform ekstresi, *A. visnaga* hekzan ekstresi. 2 petri ise kontrol olarak kullanılacağından bitki ekstresi yerine sadece çözücüleri ilave edilerek hazırlandı. Besiyeri ve bitki ekstreleri karıştırıldıktan sonra petrilere döküldü. Sonuçta her petrideki bitki ekstresi konsantrasyonu 0,005 g/ml olarak hesaplandı. Petriler içindeki besiyerleri katılaştıktan sonra, mantar kültüründen bir parça alınarak petrinin tam ortasına bırakılarak ekim işlemi yapıldı. 6 petri için de aynı işlemler yapıldıktan sonra, petrilerin kapakları kapatılıp, parafilm ile sarıldı.

Antifungal aktivitenin tayini için bir başka yöntem daha denendi. Bu yöntemde; kültürü yapılmış *Aspergillus niger* (ASN 5131), bir petriden öze yardımıyla alınarak erlene aktarıldı, üzerine 120 ml distile su ilave edildi. Erlen karıştırıldıktan sonra 6 petriye herbirinde 20'şer ml olmak üzere döküldü. Petrilerin katılaşması beklendi. Daha önceden süzgeç kağıdından 1'er cm çapta kesildi ve steril edilmiş kağıtlara sırasıyla bitki ekstreleri emdirilip, petrilere bırakıldı. Petrilerin kapakları kapatılıp, parafilm ile sarıldıktan sonra, petriler 26^{o}C'de %70 bağıl nem odasında 1 hafta inkübasyona bırakıldı.

3. 5. SİTOTOKSİK AKTİVİTE

A. majus ve *A. visnaga* bitkilerinin sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, bitki ekstreleri Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü tarafından çeşitli kanser hücreleri üzerindeki aktivitesi araştırıldı.

3. 5. 1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

4 çeşit kanser hücresi; MCF-7 (insan meme adenokarsinoma), PC-3 (insan prostat adenokarsinoma), DU-145 (insan prostat karsinoma), LNCAP (insan prostat karsinoma) kullanılarak, *A. majus* ve *A. visnaga*'nın tohum ve kök kısımlarının metanol, etanol ekstreleri ve uçucu yağlarının sitotoksik etkileri incelenmiştir.
Hücreler, % 5 fötal dana serumu (Sigma, USA), 100 IU/ml penisilin ve lµg/ml streptomisin içeren RPMI-1640 (Invitrogen, USA) veya DMEM-Ham's/F12 (Invitrogen, USA) besi ortamlarında, 37^0C'de %5 CO_2'li ortamlarda çoğaltılmıştır. Hücreler testlerde kullanılıncaya kadar %5 DMSO içeren üretme ortamında -86^0C ve/veya –196^0C'de sıvı azot içerisinde dondurularak saklanmıştır.

3. 5. 2. HÜCRE CANLILIK ORANININ BELİRLENMESİ

Bu amaçla, kolorimetrik bir yöntem olan MTT (3-(4,5-Dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi kullanılarak formazan oluşumu ölçülmüştür. Hücre çoğalması, steril olarak Dulbecco's-fosfat tamponunda (Gibco, USA) hazırlanan 5mg/ml MTT stok solüsyonun, kullanımdan önce 1:10 oranında üretme ortamı ile dilüe edilip, 0,5mg/ml oranında eklenmiştir. 0,25 µg/ml konsantrasyonundaki bitki ekstrelerinden ise her kuyucuğa 100 µl ilave edilmiştir. MTT içeren ortam, 4 saat sonra atılıp, mavi formazan kristalleri 200µl %100 DMSO içinde çözülmüştür. Oluşan mavi formazan miktarı 570-690 nm absorbanslarda mikropleyt okuyucu (VersaMaxTM Tunable Microplate Reader/Molecular Devices Corporation, USA) kullanılarak ölçülmüştür. Test maddelerinin hücreler üzerindeki etkisi % canlılık hesaplanarak incelenmiştir.

3. 6. GENOMİK DNA İZOLASYONU

A. majus yaprakları, Balıkesir (Ayvalık) ve *A. visnaga* yaprakları Hatay ilinin Belen ve Selam çiftliği olmak üzere iki bölgesinden toplandı ve örnekler analizleri yapılana kadar – 70^{o}C'de saklandı. DNA izolasyonu için 0.1 g yaprak dokusu kullanıldı.
DNA izolasyonu, "Biospin Plant Genomic DNA Extraction Kit" kullanılarak yapıldı.

İzole edilen DNA'nın miktarının belirlenmesi ve PCR'da kullanılacak sulandırım oranlarının hesaplanması için spektrofotometrede (μQuant BIO-TEK) ölçüm yapıldı. Steril distile su ile 1/200 oranında sulandırılan genomik DNA örneklerinin 260 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldükten sonra, çift zincirli DNA molekülünün konsantrasyonu aşağıdaki formül [Sambrook ve diğ., 1989] kullanılarak hesaplandı.

$$\text{DNA miktarı (ng/μl)} = OD_{260} \times 50 \times \text{sulandırım kat sayısı (200)}$$

Moleküler çalışmalarda kullanılacak genomik DNA örnekleri gerekli sulandırmalar yapılarak -20^{o}C'de saklandı.

3. 6. 1. Primerler

Çalışmada "The Midland Certified Reagent Company, Inc" firması tarafından sentezlenen primerler "Multigen Moleküler Biyolojik ürünler San ve Tic A.Ş." tarafından sağlandı. 10 nükleotid uzunluğundaki 20 adet primer kullanıldı. Bu kullanılan primerlerin nükleotid dizileri rastgele seçilmiş olup Guanin/ Sitozin bazları oranı en az % 50'dir. Primerlerin isimleri ve dizileri Tablo 3. 1' de verildi.

Tablo 3. 1. RAPD analizinde kullanılan 10 nükleotid uzunluğundaki primerler ve nükleotid dizileri

No	Primerin kodu	Dizisi	No	Primerin kodu	Dizisi
1	GB9	5'-TGGGGGACTC-3'	11	OPC13	5'-AAGCCTCGTC-3'
2	GB8	5'-GTCCACACGG-3'	12	OPC12	5'-TGTCATCCCC-3'
3	OPC05	5'-GATGACCGCC-3'	13	OPC08	5'-TGGACCGGTG-3'
4	OPC03	5'-GGGGGTCTTT-3'	14	GB07	5'-GGTGACGCAG-3'
5	GA17	5'-GACCGCTTGT-3'	15	GA18	5'-AGGTGACCGT-3'
6	GA11	5'-CAATCGCCGT-3'	16	OPB12	5'-CCTTGACGCA-3'
7	GA09	5'-GGGTAACGCC-3'	17	OPA022	5'-TGCCGAGCTG-3'
8	GA05	5'-AGGGGTCTTG-3'	18	OPA19	5'-CAAACGTCGG-3'
9	OPC20	5'-ACTTCGCCAC-3'	19	OPB022	5'-TGATCCCTGG-3'
10	OPC18	5'-TGAGTGGGTG-3'	20	OPA011	5'-CAGGCCCTTC-3'

3. 6. 2. Enzim

Yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonlarında, termofilik bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan izole edilen, yaklaşık 75^{o}C sıcaklık ve pH 9'da en yüksek aktiviteyi gösteren Taq DNA polimeraz enzimi (BioFlux) kullanıldı.

3. 6. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Koşulları

Genomik DNA'daki rastgele bölgeleri çoğaltmak ve farklı olan DNA bantlarını belirlemek için kullanılan PCR yöntemi, aşağıda belirtilen bileşenlerin 0.5 ml'lik mikrotüplere sırasıyla konularak Techne TC-412 PCR makinasında gerçekleştirildi.

Sırasıyla tüplere eklenen bileşenler

* 18 µl distile su
* 2,5 µl Taq polimeraz inkübasyon tamponu 10x (100 mM Tris HCL, 500 mM KCL, 1 mg/ ml gelatin , pH 8,3)
* 2 µl $MgCl_2$ (2.0 mM)
* 0,3 µl dNTP karışımı (25 mM dATP, 25 mM dTTP, 25 mM dGTP, 25 mM dCTP)
* 0,2 µl Taq DNA polimeraz enzimi (0.5 ünite)
* 1 µl primer (15 ng)
* 1 µl genomik DNA (25 ng)

Tüpler, çift iplikli DNA molekülünde denatürasyonun sağlanması için 95^{o}C'de 5 dakika süresince gerçekleştirildi, sonraki 35 döngü 95 ^{o}C'de 1 dakika, primer molekülün genomda rastgele bölgelere bağlanması için 40^{o}C'de 1 dakika, polimeraz enziminin reaksiyonunu kataliz etmesi için 72^{o}C'de 1 dakika tutulmak suretiyle gerçekleştirildi. Final uzama 72^{o}C'de 5 dakikada tamamlandı ve reaksiyon 10^{o}C'de durduruldu. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ürünleri, analizleri yapılana kadar -20^{o}C'de saklandı.

3. 6. 4 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde İncelenmesi

Genomik DNA'lar % 1.5'lik agoroz jel kullanılarak analiz edildi. 1.5 g agaroz (Sigma) tartılıp, 100 ml TAE (Tris Asetat EDTA) tamponunda mikrodalga fırınında eritildi. Tamponun sıcaklığının yaklaşık 50-55^{o}C'ye düşmesi beklendi. DNA'nın UV ışık altında gözlenebilmesi için jele 5 µl etidyum bromür eklenerek, elektroforez kasedine döküldü. 30 dakika sonra donan jel, içinde TAE bulunan elektroforez tankına (MyRun –Cosmo Bio Co. Ltd.) alındı. PCR ürünlerini içeren mikrotüplere, DNA'ların kuyulara çökmesini sağlamak için 2 µl elektroforez yükleme tamponu kondu. PCR ürününün ve yükleme tamponunun iyice karışmasını sağlandıktan sonra jel kuyularına 27 µl yükleme yapıldı. PCR ürünlerinin boyutlarını belirlemek amacıyla 100 bp marker (GeneRuler 100 bp, DNA ladder Plus) kullanıldı.

Elektroforez, sabit 70 V ve 110 mA serbest akım altında ortalama 1,5 saat yapıldı. UV ışık altında gözlenen PCR sonucu meydana gelen bantlar Sony DSC-T100 dijital makinası üzerinde fotoğraflandı.

Tablo 3. 2. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

Çözeltinin ismi	İçeriği
Tris Asetat EDTA (TAE) Tamponu	Tris-asetat EDTA(0.4 M), pH 8,2(0.01 M)
Yükleme Çözeltisi (6x)	Bromofenol mavisi %0.25 (w/v) Sükroz %40 (w/v)
Etidyum Bromür	Etidyum Bromür 10 mg/ml

3. 6. 5. Polimorfizm değerlerinin hesaplanması

A. majus ve *A. visnaga* bitkilerinin DNA düzeyindeki farklılıkları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı [Nei ve Li, 1979].

Benzerlik oranı ;

$$\mathbf{F = 2\ M_{XY} /\ M_X + M_Y}$$

F = Benzerlik oranı (%)

M_{XY} = İki hat içinde aynı uzunluktaki toplam RAPD fragmenti sayısı

M_X = X hattındaki RAPD fragmenti sayısı

M_Y = Y hattındaki RAPD fragmenti sayısı

Benzerlik, bilgisayarda DOS ortamında COMM programı kullanılarak Sorensen indeksine gore hesaplandı. Dendrogram “complete-linkage” analizi ile CorelDRAW 10 programı kullanılarak düzenlendi. Sonuçlar % olarak tablo halinde verildi.

Polimorfizm oranı ise,

$$\mathbf{Polimorfizm\ oranı = 1- F}$$

formülünden faydalanılarak bulundu.

4. BULGULAR

4. 1. KİMYASAL ANALİZ SONUÇLARI

A. visnaga tohumlarının kloroform ekstresi kolon kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi yöntemleri sonucunda UV'de 366 nm'de incelendiğinde, Rf değeri 0,57 bulunan, sarımsı kahverengi renkte gözlenen maddenin khellin olduğu literatür verileri yardımıyla belirlendi. *A. visnaga* tohumlarının hekzan ekstresi kolon kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi yöntemleri sonucunda UV'de 366 nm'de incelendiğinde, Rf değeri 0,89 olan visnadin ve Rf değeri 0,84 olan samidin maddeleri, laboratuvarda bulunan standart maddeler ile karşılaştırılması sonucunda tespit edilmiştir.

4. 2. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE SONUÇLARI

4. 2. 1. Toplam Fenolik ve Flavonoit İçerikleri

Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi [Öztürk ve diğ., 2007]. Toplam flavonoit içerikleri ise kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat metodu ile belirlendi [Topçu ve diğ., 2007].

A. majus'un metanol ekstresinin fenolik ve flavonoit içeriklerinin *A. visnaga*'nın metanol ekstresine göre daha yüksek olduğu belirlendi.

Tablo 4. 1. *A. majus* ve *A. visnaga* bitkilerinin metanol ekstrelerinin toplam fenolik ve toplam flavonoit içerikleri a

***Ammi* Türleri**	**Ekstre**	**Fenolik içerik (µg PEs/ mg ekstre)**[b]	**Flavonoit içerik (µg QEs/ mg ekstre)**[c]
A. majus	Metanol Ekstresi	100,76±1,44	105,87± 0,45
A. visnaga	Metanol Ekstresi	76,6±1,15	74,64±0,21

[a] Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması şeklinde verilmiştir.

[b] Pirokatekole eşdeğer fenolik içerik miktarı

[c] Kersetine eşdeğer flavonoit içerik miktarı

4. 2. 2. Toplam Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

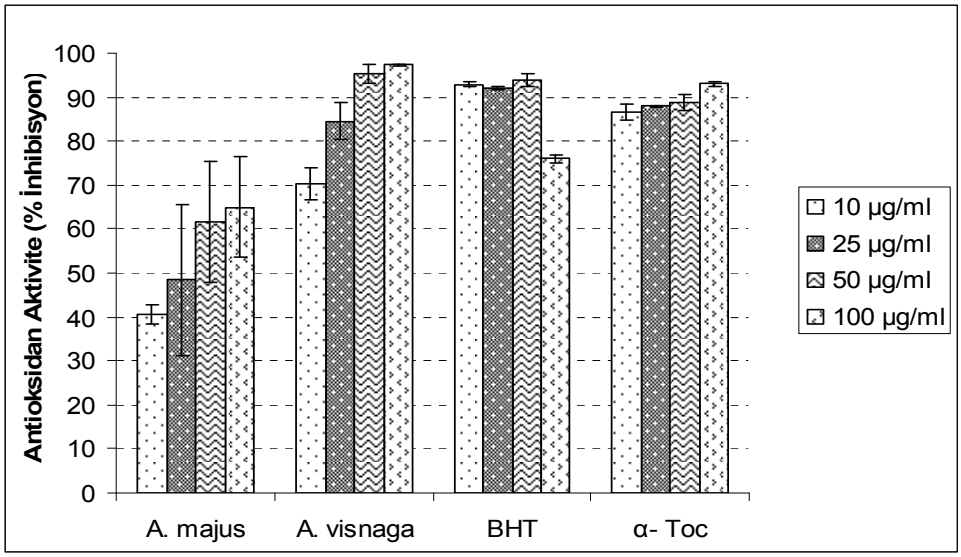
β-Karoten-Linoleik Asit Yöntemi

Bu yöntemde *A. visnaga* metanol ekstresinin antioksidan aktivitesi *A. majus* metanol ekstresine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4. 2). *A. majus*'un antioksidan aktivitesinin 100 µg/ml konsantrasyonda bile standartların altında kaldığı gözlenmiştir. Her iki türde de konsantrasyonun artmasıyla antioksidan aktivite de artmaktadır. Standart olarak BHT ve α-tokoferol kullanıldı (Şekil 4. 1).

Tablo 4. 2. *A. majus* ve *A. visnaga* metanol ekstrelerinin β-Karoten-Linoleik Asit yöntemine göre antioksidan aktivitesi (% inhibisyon) [a]

***Ammi* Türleri ve standartlar**	**10 µg/ml**	**25 µg/ml**	**50 µg/ml**	**100 µg/ml**
A. majus	40,06±2,31	48,37±17,27	61,47±13,81	64,90±11,44
A. visnaga	70,15±3,65	84,43±4,17	95,25±2,26	97,42±0,21
BHT	92,90±0,59	92,02±0,53	93,68±1,44	75,99±0,83
α- Tokoferol	86,71±1,85	87,92±0,15	88,81±1,91	93,04±0,48

[a] Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.



Şekil 4. 1. *A. majus* ve *A. visnaga*'nın β-karoten-linoleik asit sistemindeki antioksidan aktivitesi

DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi

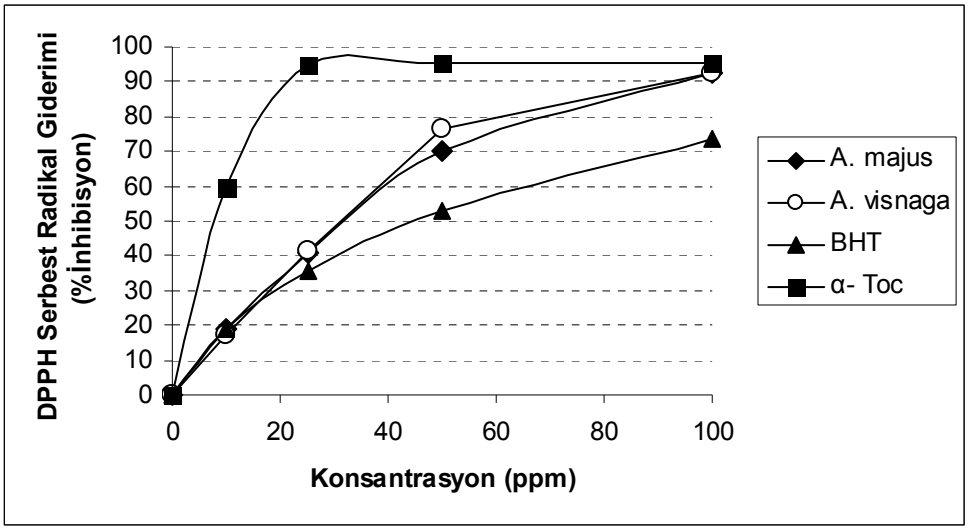
A. majus ve *A. visnaga* metanol ekstrelerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi çok yakın sonuçlar göstermiştir (Tablo 4. 3).

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak BHT ve α-tokoferol kullanıldı (Şekil 4. 2).

Tablo 4. 3. *A. majus* ve *A. visnaga* metanol ekstrelerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) [a]

***Ammi* Türleri ve standartlar**	**10 µg/ml**	**25 µg/ml**	**50 µg/ml**	**100 µg/ml**
A. majus	18,90±0,18	40,80±0,14	70,00±0,37	92,45±0,72
A. visnaga	17,51±0,39	41,45±0,24	76,63±0,47	92,51±0,12
BHT	18,85±0,74	35,44±2,13	53,11±0,27	73,82±0,93
α-tokoferol	59,66±0,59	95,03±0,01	95,46±0,23	95,68±0,01

[a] Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.



Şekil 4. 2. *A. majus* ve *A. visnaga*'nın DPPH serbest radikal giderim aktivitesi

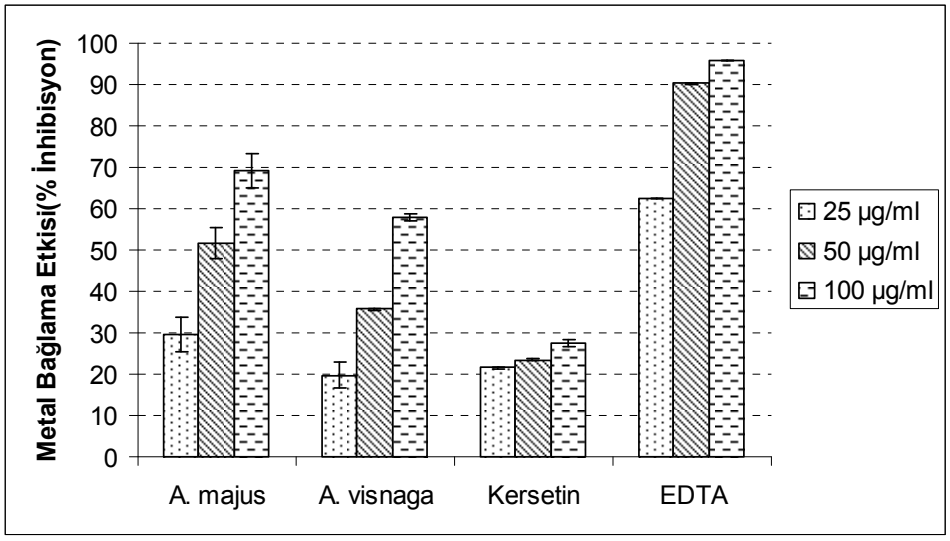
Metal Bağlama Etkisi

A. majus'un metal bağlama etkisinin *A. visnaga*'ya göre daha yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir. *A. majus*'un metal bağlama etkisi standart olarak kullanılan Kersetin'den daha yüksek değerde olduğu gözlenirken, *A. visnaga*'nın 25 µg/ml konsantrasyonundaki değerinin Kersetin'den düşük olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4. 4). Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak kersetin ve EDTA kullanıldı (Şekil 4. 3).

Tablo 4. 4. *A. majus* ve *A. visnaga* metanol ekstrelerinin metal bağlama etkisi (% inhibisyon) [a]

***Ammi* Türleri**	**25 µg/ml**	**50 µg/ml**	**100 µg/ml**
A. majus	29,70±4,16	51,53±3,70	69,19±4,13
A. visnaga	19,77±3,09	35,65±0,07	57,86±0,94
Kersetin	21,48±0,03	23,51±0,27	27,49±0,93
EDTA	62,46±0,01	90,33±0,23	96,03±0,01

[a] Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.



Şekil 4. 3. *A. majus* ve *A. visnaga*'nın metal bağlama etkisi

4. 3. ANTİFUNGAL AKTİVİTE SONUÇLARI

A. majus ve *A. visnaga*'nın metanol, hekzan ve kloroform ekstrelerinin *Aspergillus niger* küf mantarının besiyerine eklenmesiyle, bitkilerin antifungal etkileri incelenmiştir. Sonuçta, kontrol grubu petrilerdeki gelişim ile ekstrelerin eklenmiş olduğu petrilerdeki gelişim aynı zamanda tamamlanmıştır. Konsantrasyonu 0,005 g/ml olan bitki ekstrelerinin mantarın gelişimini geciktirici ya da engelleyici bir etkisi gözlenememiştir.

4. 4. SİTOTOKSİK AKTİVİTE SONUÇLARI

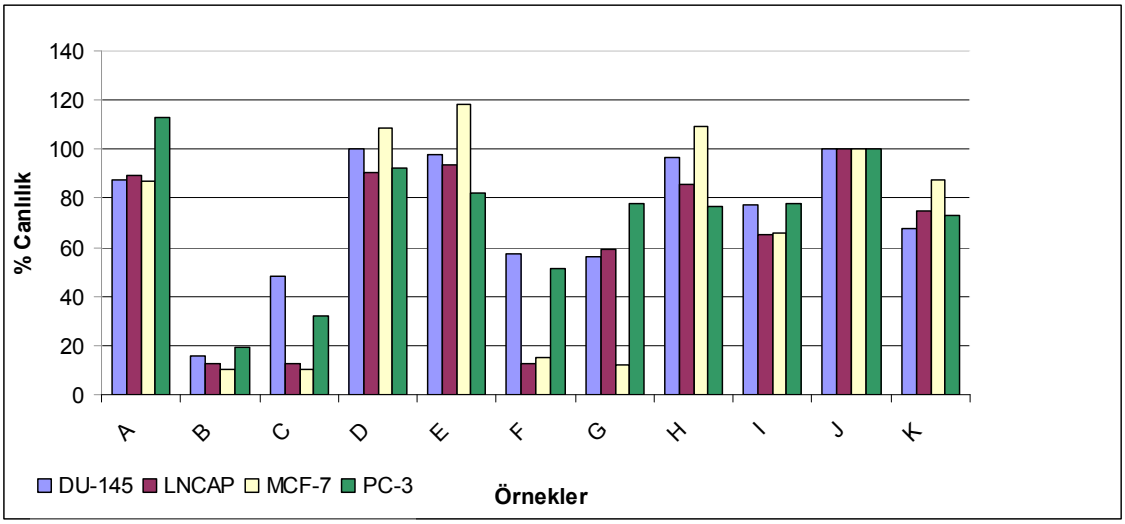
A. majus ve *A. visnaga*'nın metanol, etanol ve uçucu yağlarının sitotoksik aktiviteleri Tablo 4. 5' te, örneklerin açıklamaları ise Tablo 4. 6'da verilmiştir.

Tablo 4. 6. Örneklerin açıklamaları

A. *A. majus* – kök (metanol ekstresi)
B. *A. visnaga* – kök (metanol ekstresi)
C. *A. visnaga* - tohum (metanol ekstresi)
D. *A. majus* - kök (metanol ekstresi) hekzan ve kloroform ile tüketildikten sonra geriye kalan metanol ekstresi
E. *A. visnaga* kök (metanol ekstresi) hekzan ve kloroform ile tüketildikten sonra geriye kalan metanol ekstresi (khelol glikozid)
F. Khellin (% 95 saflıkta) etanol ekstresi
G. *A. majus* – Su buharı ile damıtılarak elde edilen uçucu yağ
H. *A. visnaga* – Su buharı ile damıtılarak elde edilen uçucu yağ
I. Negatif Kontrol
J. % 0,1 DMSO K
K. (+K) 10 µg/ ml

Örnekler / Hücreler	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
DU-145	87,7	15,9	48,5	100,4	97,6	57,1	56,1	96,6	77,1	100	67,7
LNCAP	89,5	12,4	12,8	90,7	93,4	12,4	59,1	85,5	65,4	100	74,6
MCF-7	86,7	10,1	10	108,6	118,1	14,8	12,3	109,1	65,5	100	87,5
PC-3	113,1	19,2	31,7	92,6	81,8	51,2	77,7	76,8	77,6	100	73,1

Tablo 4. 5. Bitki ekstrelerinin sitotoksik etkisi



A Maddesi için, test edilen hücre tiplerinin hiçbirinde anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir.

B Maddesi için, test edilen tüm hücre tiplerinde anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. DU-145 hücrelerini %84, LNCAP hücrelerini %88, MCF-7 hücrelerini %90 oranında , PC-3 hücrelerini %81 oranında öldürmüştür. B maddesi en çok MCF-7 hücrelerinin daha sonra ise sırasıyla, LNCAP, DU-145, PC-3 hücrelerinin canlılığını birbirine yakın düzeyde etkilemiştir.

C Maddesi için, test edilen tüm hücre tiplerinde anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. DU-145 hücrelerini %51, LNCAP hücrelerini %87, MCF-7 hücrelerini %90, PC-3 hücrelerini %68 oranında öldürmüştür. C maddesi en çok MCF-7 hücrelerinin daha sonra ise sırasıyla, LNCAP, PC-3, DU-145 hücrelerinin canlılığını etkilemiştir.

D maddesi için, test edilen hücre tiplerinin hiçbirinde anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir.

E maddesi için, test edilen hücre tiplerinin hiçbirinde anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir.

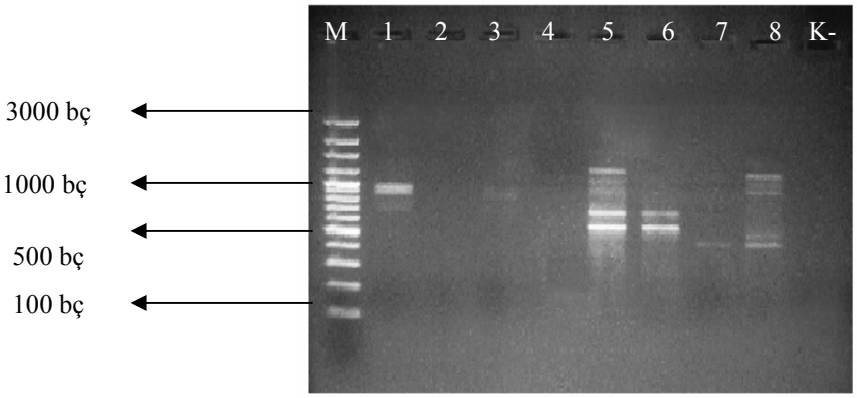
F maddesi için, test edilen hücre tiplerinden LNCAP hücrelerini %88, MCF-7 hücrelerini %85 oranında öldürmüştür.

G maddesi için, test edilen hücre tiplerinden MCF-7 hücresi hariç diğerlerinde anlamlı sonuç elde edilmemiştir. MCF-7 hücrelerinin %88'ini öldürmüştür.

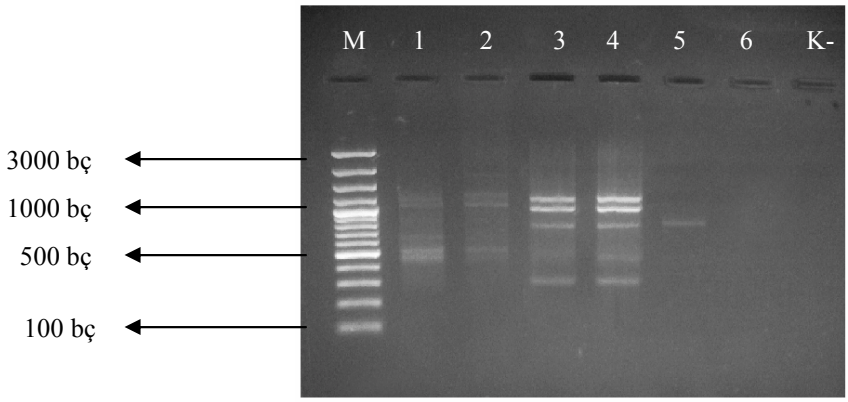
H maddesi için, test edilen hücre tiplerinin hiçbirinde anlamlı sonuç elde edilmemiştir.

4. 5. RAPD YÖNTEMİ İLE BİTKİLERİN ANALİZİ

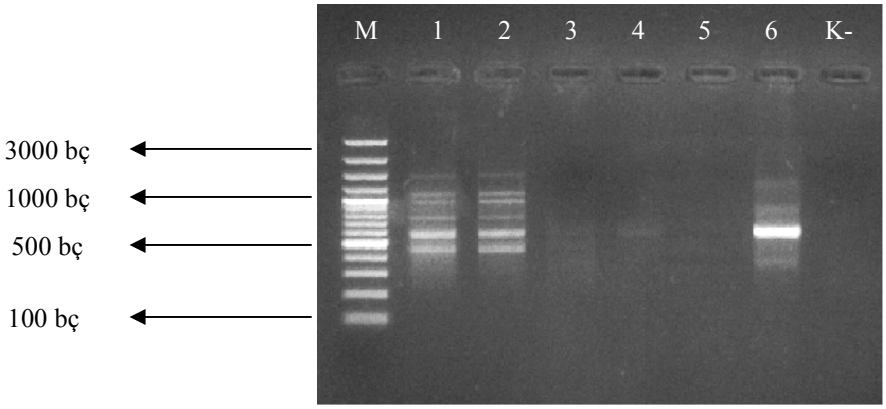
A. visnaga (Selam), *A. visnaga* (Belen) ve *A. majus* (Ayvalık) bitkilerine ait DNA'lar ile 20 primer kullanılarak RAPD çalışması yapıldı. Şekil 4. 4, 4. 5, 4. 6, 4. 7 ve 4. 8'de gösterildiği gibi elektroforez sonucunda GA 17, GA 11, GA 05 ve OPA 022 primerlerinin polimorfik bantlar verdiği gözlendi. Çalışmayan ya da monomorfik bantlara yol açan primerler ise değerlendirmeye alınmadı.



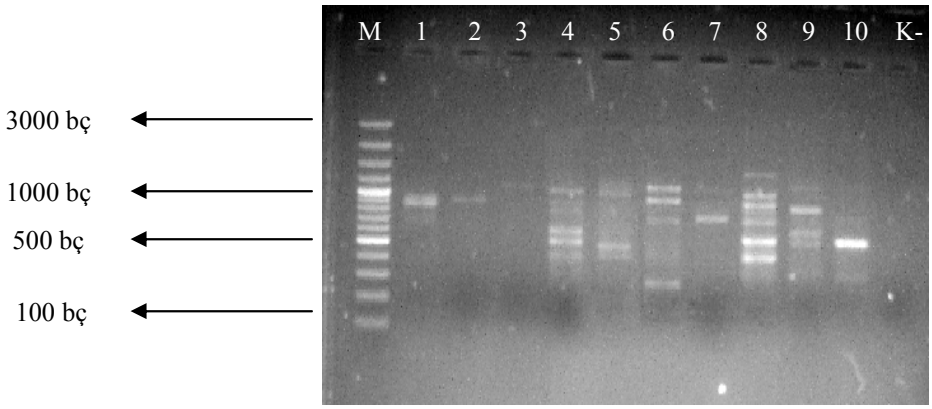
Şekil 4. 4. *A. majus* (Ayvalık), *A. visnaga* (Selam) örneklerinin 1,2,3 ve 4 numaralı primerler ile gerçekleştirilen RAPD analizi sonucu elde edilen RAPD markırlarının % 1.5'lik agaroz jeldeki görünümü, M: Markır, K- : Negatif Kontrol
1,3,5 ve 7 numaralı kuyular, *A.majus* ; 2,4,6 ve 8 numaralı kuyular, *A. visnaga* (Selam)
1-2 : 1. primer, 3-4 : 2. primer, 5-6 : 3. primer, 7-8 : 4. primer



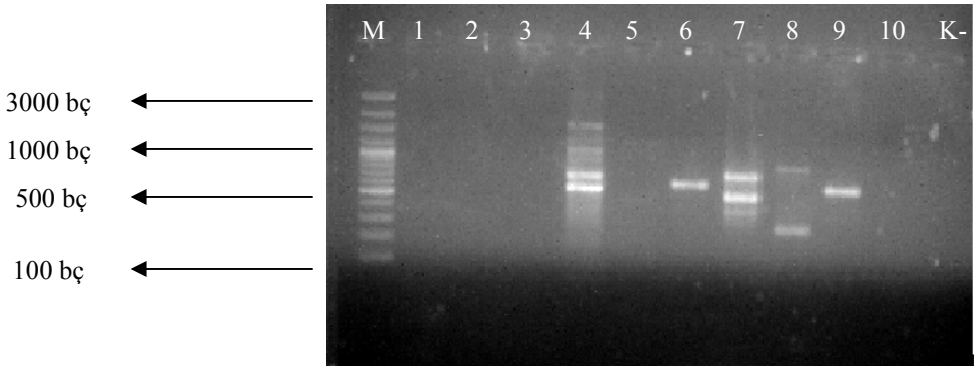
Şekil 4. 5. *A. majus* (Ayvalık), *A. visnaga* (Selam) örneklerinin 5,6 ve 7 numaralı primerler ile gerçekleştirilen RAPD analizi sonucu elde edilen RAPD markırlarının % 1.5'lik agaroz jeldeki görünümü, M: Markır, K- : Negatif Kontrol
1,3 ve 5 numaralı kuyular, *A.majus* ; 2,4 ve 6 numaralı kuyular, *A. visnaga* (Selam)
1-2 : 5. primer, 3-4 : 6. primer, 5-6 : 7. primer



Şekil 4. 6. *A. majus* (Ayvalık), *A. visnaga* (Selam) örneklerinin 8,9 ve 10 numaralı primerler ile gerçekleştirilen RAPD analizi sonucu elde edilen RAPD markırlarının % 1.5'lik agaroz jeldeki görünümü, M: Markır, K- : Negatif Kontrol
1,3 ve 5 numaralı kuyular, *A. majus* ; 2,4 ve 6 numaralı kuyular, *A. visnaga* (Selam)
1-2 : 8. primer, 3-4 : 9. primer, 5-6 : 10. primer



Şekil 4. 7. *A. visnaga* (Belen) örneklerinin 1-10 numaralı primerler ile gerçekleştirilen RAPD analizi sonucu elde edilen RAPD markırlarının % 1.5'lik agaroz jeldeki görünümü,
M: Markır, K- : Negatif Kontrol



Şekil 4. 8. *A. visnaga* (Belen) örneklerinin 11-20 numaralı primerler ile gerçekleştirilen RAPD analizi sonucu elde edilen RAPD markırlarının % 1.5'lik agaroz jeldeki görünümü, M: Markır, K- : Negatif Kontrol

4. 5. 1. Örnekler arasındaki polimorfizm

RAPD analizi sonucunda meydana gelen çoğaltılmış bölgeler değerlendirildi. Bu şekilde genomik farklılıklar belirlendi ve polimorfizm oranı hesaplandı.

GA 17 primeri ile yapılan çalışma sonucunda toplam 5 markır saptandı ve bu markırların örneklerdeki dağılımı Tablo 4. 7' da gösterildi.

GA 11 primeri ile yapılan çalışma sonucunda 5 markır saptandı ve bu markırların örneklerdeki dağılımı Tablo 4. 8'de gösterildi.

GA 05 primeri ile yapılan çalışma sonucunda toplam 7 markır saptandı ve bu markırların örneklerdeki dağılımı Tablo 4. 9'de gösterildi.

OPA 022 primeri ile yapılan çalışma sonucunda toplam 5 markır saptandı ve bu markırların örneklerdeki dağılımı Tablo 4. 10'da gösterildi.

Her tablo önce ayrı ayrı değerlendirilip polimorfizm oranları hesaplandı. Daha sonra 4 çalışmanın ortalaması alınarak polimorfizm değerleri bulundu.

Bunun sonucunda *A. visnaga* (Selam) ve *A. visnaga* (Belen) arasındaki polimorfizm değeri % 0.041, *A. visnaga* (Selam) ve *A. majus* arasındaki polimorfizm değeri % 0.178, *A. visnaga* (Belen) ve *A. majus* arasındaki polimorfizm değeri ise % 0.65 bulundu. Sorensen indeksine göre hesaplanan benzerlik oranları (Tablo 4. 11), "complete-linage" analizi yapılarak oluşturulan dendrograma göre, *A. visnaga* (Selam) ve *A. visnaga* (Belen) arasındaki benzerlik %91 ve *A. majus*'un bu iki örnek ile benzerliği ise %81 bulundu (Şekil 4.9).

Tablo 4. 7. GA 17 primeri kullanılarak elde edilen RAPD markırlarının örneklerdeki dağılımı

	1	**2**	**3**	**4**	**5**
A. visnaga **(Selam)**	-	+	-	+	-
A. visnaga **(Belen)**	-	+	-	+	-
A. majus	+	+	+	+	+

Tablo 4. 8. GA 11 primeri kullanılarak elde edilen RAPD markırlarının örneklerdeki dağılımı

	1	**2**	**3**	**4**	**5**
A. visnaga **(Selam)**	+	+	+	+	+
A. visnaga **(Belen)**	+	+	+	+	+
A. majus	+	+	+	+	+

Tablo 4. 9. GA 05 primeri kullanılarak elde edilen RAPD markırlarının örneklerdeki dağılımı

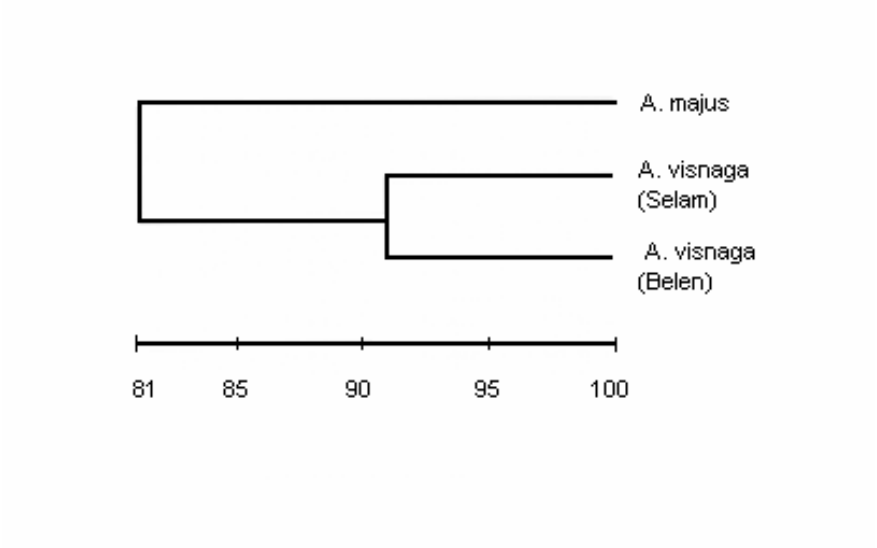
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
***A. visnaga* (Selam)**	+	+	+	-	+	+	+
***A. visnaga* (Belen)**	-	+	+	+	+	+	+
A. majus	+	+	+	-	+	+	+

Tablo 4. 10. OPA 022 primeri kullanılarak elde edilen RAPD markırlarının örneklerdeki dağılımı

	1	**2**	**3**	**4**	**5**
***A. visnaga* (Selam)**	+	+	+	-	-
***A. visnaga* (Belen)**	+	+	+	-	+
A. majus	+	+	+	+	-

Tablo 4. 11. Örnekler arasında hesaplanan benzerlik değerleri (% halinde verildi)

	A. visnaga (Selam)	*A. visnaga* (Belen)	*A. majus*
A. visnaga (Selam)	100		
A. visnaga (Belen)	91	100	
A. majus	89	81	100



Şekil 4. 9. Örnekler arasındaki genetik uzaklıklara ait dendrogram

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

A. majus ve *A. visnaga* bitkileri içerdikleri aktif maddeler nedeniyle pek çok ülkenin farmakopelerinde yer almakta; vitiligo, astım, angina pectoris ve kalp-damar hastalıkları tedavisinde kullanılmaktadır. Ülkemizde ise yabani olarak geniş bir alanda yetiştiği halde, hiçbir şekilde değerlendirilmemektedir ve Türk farmakopesi'nde yer almamaktadır. Bu çalışmada, iki türün kimyasal bileşenlerinin göstermiş olduğu aktiviteler paralel olarak karşılaştırılmış ve RAPD-PCR yöntemi ile filogenetik ilişkisinin belirlenmesi sağlanmıştır.

Sadece *A. visnaga*'da bulunup, başka hiçbir bitkide bulunmayan khellin maddesi ekstraksiyon, kolon kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi yöntemleriyle, literatür verileri doğrultusunda *A. visnaga*'dan izole edilmiştir. *A. visnaga*'nın piranokumarin türevlerinden olan samidin ve visnadin maddeleri de aynı yöntemler kullanılarak izole edilmiştir. Elde edilen diğer ekstreler ise antioksidan, antifungal ve sitotoksik aktivite çalışmalarında kullanılmıştır.

A. majus ve *A. visnaga* bitkilerinin metanol ekstrelerinin üç farklı yöntemle antioksidan özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu yöntemler, toplam antioksidan aktivitenin β-karoten linoleik asit test yöntemiyle, serbest radikal gideriminin DPPH ile, metal bağlama kapasitesinin demir (II) klorür ve ferrozin ile belirlenmesidir. Bu yöntemler, maliyeti düşük, kolay sonuçlanabilen ve güvenilir yöntemlerdir. *A. majus* (metanol ekstresi)'un toplam fenolik ve flavonoit içeriği, *A. visnaga* (metanol ekstresi)'ya göre daha yüksek bulunmuştur. DPPH ve β-karoten linoleik asit test yöntemleri birbirini tamamlamaktadır. DPPH, 517 nm'de karakteristik absorbsiyonu olan kararlı serbest bir radikaldir. Antioksidanlar, radikallere proton vererek absorbsiyonu azaltırlar. Absorbsiyonda azalma olduğu için, DPPH'in rengi açılır. Karışımın rengi mor'dan sarımsı bir renge dönüşür. Karışımının düşük absorbsiyon göstermesi, serbest radikal giderim aktivitesinin yüksek olduğunu gösterir.

100 µg/ml konsantrasyonunda *A. majus* (metanol ekstresi), *A. visnaga* (metanol ekstresi), BHT ve α -tokoferol'un % inhibisyonu sırasıyla, (92,45 ± 0,72), (92,51 ± 0,12), (73,82 ± 0,93) ve (95,68 ± 0,01) bulunmuştur. Buna göre, *A. majus* ve *A. visnaga*'nın DPPH serbest radikal giderim aktivitesi birbirine yakın olup BHT'den düşük, α–tokoferol'den daha yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir.

β-karoten linoleik asit test yöntemi, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen hidroperoksitlerin inhibisyonunun ölçülmesi esasına dayanır. Linoleik asit'ten hidrojen çıkması sonucu serbest radikalin β-karoten'e hücum etmesi ile reaksiyonun rengi açılır. Örneklerin β-karoten'in renginin açılmasını engellemesi ya da geciktirmesi, örneklerin serbest radikal süpürücü etkiye sahip olduğunu gösterir. 100 µg/ml konsantrasyonunda *A. majus* (metanol ekstresi), *A. visnaga* (metanol ekstresi), BHT ve α –tokoferol'un % inhibisyonu sırasıyla, (64,90 ± 11,44), (97,42 ± 0,21), (75,99 ± 0,83) ve (93,04 ± 0,48) bulunmuştur. Bu yöntemde *A. visnaga*'nın antioksidan aktivitesinin *A. majus*'a göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Her iki örneğin de BHT ve α–tokoferol standartlarının altında kaldığı gözlenirken sadece *A. visnaga*'nın 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonunda sahip olduğu % inhibisyon değeri standartlar'dan daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Metal bağlama yöntemi, Fe (II) – Ferrozin metoduna göre belirlendi. Ekstrelerin demir (III)'ü, demir (II)'ye indirgemesi, hidrojen verme kapasitesinin olduğunu ve antioksidan aktiviteye sahip olduğunu gösterir. 100 µg/ml konsantrasyonunda *A. majus* (metanol ekstresi), *A. visnaga* (metanol ekstresi), Kersetin ve EDTA'nın % inhibisyonu sırasıyla, (69,19±4,13), (57,86±0,94), (27,49±0,93) ve (96,03±0,01) bulunmuştur. Buna göre, *A. majus* (metanol ekstresi)'un metal bağlama kapasitesi *A. visnaga* (metanol ekstresi)'ne göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak yine de *A. majus*'un metal bağlama kapasitesi standart olarak kullanılan EDTA'dan daha düşük olduğu gözlenmiştir. *A. majus* furanokumarinler açısınan zengindir. Kumarinin yapısında çift bağ taşıyan oksijen'deki bağın kopması sonucunda yerine hidroksil grubu geçer, oksidasyon durumunda hidrojen, serbest radikale bağlanarak, radikali giderme işlevi görür. *A. majus*'un antioksidan aktivite göstermesi bu şekilde açıklanabilir. *A. visnaga*'da hem furanokromon hem de piranokumarinler bulunmaktadır. Piranokumarinlerden visnadin ve samidin'in sahip olduğu piran grubunun antioksidan aktivite gösterdiği düşünülmektedir.

A. majus ve *A. visnaga*'nın metanol, hekzan ve kloroform ekstrelerinin *Aspergillus niger* küf mantarının besiyerine eklenmesiyle, bitkilerin antifungal etkileri incelenmiştir. Sonuçta, kontrol grubu petrilerdeki gelişim ile ekstrelerin eklenmiş olduğu ve mantarın aşılandığı petrilerdeki gelişim aynı zamanda tamamlanmıştır. %2'lik konsantrasyonda hazırlanan bitki ekstrelerinin mantarın gelişimini geciktirici ya da engelleyici bir etkisi gözlenememiştir. Steril kağıtlara bitki ekstrelerinin emdirilip, petrilere bırakılması yönteminde de gelişiminin aynı zamanda tamamlandığı gözlenmiş, bu 2 yöntem ile antifungal aktivitenin belirlenmesinde hiçbir fark bulunamamıştır. Mahmoud (1999), *A. visnaga*'nın 5 farklı konsantrasyondaki sulu ekstrelerinin, *Aspergillus flavus*'un gelişimini engellediğini belirtmiştir. Bu çalışmada farklı mantar ve %2'lik konsantrasyonda hazırlanan ekstrelerin kullanılması sebebiyle daha sonraki çalışmalarda değişik konsantrasyonlarda hazırlanan *A. visnaga* ve *A. majus* bitki ekstrelerinin antifungal aktivite çalışmalarında denenmesi gerektiği düşünülmektedir.

A. visnaga ve *A. majus* bitkileri sitotoksik aktiviteleri açısından karşılaştırıldığında, *A. visnaga* (kök) metanol ekstresi ve *A. visnaga* (tohum) metanol ekstresinin, tümör hücrelerinin %50 ve/veya üstü oranında gelişimini engellediği gözlenirken *A. majus* (kök) metanol ekstresi test edilen 4 hücre tipinde de etki göstermemiştir. Ancak antioksidan aktivitelerine bakıldığında *A. visnaga*'nın *A. majus*'a göre fenolik ve flavonoit içeriklerinin düşük olduğu görülmektedir. Bu sonuç, sitotoksik aktivite'den fenolik ve flavonoit bileşiklerin sorumlu olmadığını göstermektedir. *A. visnaga*'dan elde edilen khellin maddesi ise DU-145 ve PC-3 hücreleri hariç diğer hücrelerin %50 ve/veya üstü oranında gelişimini engellemiştir ayrıca *A. visnaga* (kök)'nın , hekzan ve kloroform ile tüketildikten sonra geriye kalan metanol ekstresinde bulunan khellol glikozid sitotoksik aktiviteye sahip değildir. Buna göre sitotoksik aktivite'de khellin'in etkili olduğu düşünülmektedir. *A. majus*'tan elde edilen uçucu yağ, sadece MCF-7 hücresinde etki göstererek, hücrelerin %88'inin gelişimini engellemiştir. *A. visnaga*'dan elde edilen uçucu yağın 4 hücre tipinde de sitotoksik aktivite göstermediği gözlenmiştir. Bu sonuç ile bitkilerin fenolik içerikleri karşılaştırıldığında sonucun anlamlı olduğu anlaşılmaktadır. *A. majus*'un fenolik içeriğinin *A. visnaga*'ya göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bunun sonucunda *A. majus*'un uçucu yağ bileşimindeki fenol miktarının yüksek olması ile sitotoksik aktivitesinin etkili olduğu düşünülmektedir.

Daha önce de bahsedildiği gibi *A. majus* ve *A. visnaga* bitkileri vitiligo tedavisinde kullanılmaktadır ve vitiligo hastalığının oluşumundaki nedenlerden biri serbest radikallerdir. Sitotoksik aktivite çalışmalarında kullanılan kanser hücrelerinin oluşum nedenlerinden biri de serbest radikallerdir. Antioksidan aktivite çalışmalarında bitki ekstrelerinin serbest radikallerin giderilme aktivitelerinin belirlenmesi olduğuna göre, antioksidan ve sitotoksik aktivite çalışmalarında ortaya çıkan sonuçların birbirleri ile paralel olduğu gözlenmiştir.

Moleküler markırlar, bitki genomlarının yapısının incelenmesinde, genetik çeşitliliğin saptanması, yabancı genlerin bulunması, evrimsel ilişkilerin analizinde kullanılır, yüksek derecede polimorfik özellik, kodominant kalıtım, genomda sıkça bulunma, genomda düzgün dağılım, kolay erişim (satın alma veya hızlı işlemler gibi), kolay ve hızlı analiz etme, yüksek tekrarlanabilirlik, laboratuvarlar arası kolay veri alışverişi, markır geliştirilmesinin ve analizinin düşük maliyetli olması gibi sayılan özelliklerin hepsinin bir moleküler markırda bulunması beklenmez, en azından birkaçının birarada olması istenir [Weising ve diğ., 2005; Semagn, 2006]. RAPD çalışmalarında, sonuçların yüksek tekrarlanabilirlik göstermediği ve başka laboratuvarlarda değişik sonuçların alındığı söylenmektedir. Ancak çalışmada kullanılan pipetlerin hassas olmayışı, izole edilen DNA ve primerin konsantrasyonun yanlış belirlenmesi, DNA'nın sık dondurulup çözülmesi gibi teknik hatalardan kaynaklanan sorunlar giderildiği zaman sonuçların tekrarlanabildiği düşünülmektedir.
Çalışmada kullanılan primer sayısı, polimorfizm oranını etkileyebilmektedir. Primer sayısının fazla olması, daha fazla lokusun taranmasını sağladığı için sonuçlardaki hata payını azaltmış olur.

RAPD-PCR yöntemi ile bitkilerin filogenetik karşılaştırmasını yapmak amacıyla, *A. majus* Balıkesir'den, *A. visnaga* ise Hatay ilinin farklı iki bölgesinden sağlanmış olup, bu 3 örnek genetik çalışmada kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan 20 primerden GA 17, GA 11, GA 05 ve OPA 022 primerleri polimorfik bantlar verdiği için değerlendirilmiştir. *A. visnaga* (Selam) ve *A. visnaga* (Belen) arasındaki polimorfizm değeri % 0.041, *A. visnaga* (Selam) ve *A. majus* arasındaki polimorfizm değeri % 0.178, *A. visnaga* (Belen) ve *A. majus* arasındaki polimorfizm değeri ise % 0.65

bulundu. Buna göre, *A. visnaga* (Belen) ve *A. visnaga* (Selam) örnekleri arasında %91, *A. majus* ve *A. visnaga* (Selam) örnekleri arasına %89, *A. majus* ve *A. visnaga* (Belen) arasında %81 benzerlik bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan 20 primerin, örneklerde oluşturduğu polimorfik bantlar dikkate alınarak Sorensen indeksine göre filogenetik ilişkinin belirlendiği dendrogram hazırlanmıştır. 20 primerden sadece 4 primerin değerlendirilmeye alınması ile ortaya çıkan bu sonuçların, polimorfik bantlar meydana getirecek daha fazla sayıda primer ile tekrarlanması düşünülmektedir.

Daha önceki çalışmalarda *A. majus* ve *A. visnaga*'nın kimyasal bileşenleri oldukça araştırılmasına rağmen, bitkilerin antioksidan ve sitotoksik aktivitelerinin belirlenip, karşılaştırılması, antifungal aktivitelerinin paralel olarak incelenmesi ve RAPD- PCR yöntemi ile polimorfizminin değerlendirilmesi ilk kez yapılmıştır. Elde edilen bulguların, bu alanlarda yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

AGARWAL, A., PRABAKARAN, S.A., 2005, Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology, *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 43, 963-974

AMAROWICZ, R., NACZK, M., SHAHIDI, F. , 2000, Antioxidant activity of various fractions of nontannin phenolics of canola hulls, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2755–2759

ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P.D., PATSALIDES, E., McDONALD, S., ROBARDS, K., 2002, Methods for testing antioxidant activity, *Analyst*, 127, 183-198

BACHMAYER, O., 2004, *Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Culinary Herbs*, Yüksek Lisans Tezi, University of Helsinki, Division of Pharmacognosy, Helsinki, Finland

BENABADJI S.H., WEN R., ZHENG J.B., DONG, X.,C., YUAN, S., G., 2004. Anticarcinogenic and antioxidant activity of diindolylmethane derivatives. *Acta Pharmacol Sin*, 25, 666-671

BEYAZIT, N., 2001, *Ammi visnaga (Lam.) bitkisinin kimyasal bileşiminin incelenmesi ve özel etkili kozmetik preparatlarının formülasyonu*, Yüksek lisans tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi

BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W., 1980, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 314 – 331

BRUNETON, J. ,1999, Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants, 2nd Ed. pp. 263-277, Intercept Ltd., Hampshire, UK

BUDAK, H., BÖLEK, Y., DOKUYUCU, T., AKKAYA, A., 2004 , Potential uses of molecular markers in crop improvement, *KSU Journal of Science and Engineering*, 7(1), 75-79

CADENAS, E., DAVIES, K. J., 2000, Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress and Aging, *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 222-230

CALDEIRA, R.L., CARVALHO, O.S., LAGE, R.C. G., CARDOSO, P.C. M, OLIVEIRA, G.C., 2002, Sequencing of simple sequnce repeat anchored polymerase chain reaction amplification products of *Biomphalaria glabrata*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97, 23-26

CHEUNG, L.M., CHEUNG, P.C.K., OOI, V.E.C., 2003, Antioxidant activity and total phenolics of edible mushrooms extracts, *Food Chem*, 81, 249-255

CUMNINGHAM, A.B., 1988, An investigation of the herbal medicine trade in Natal/ KvanZulu, Investigation report No. 29, Institute of Natural Resources, Scottsville, South Africa

DAVIS, P.H., 1969, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 4. cilt, 426-427

DELSENY, M., LAROCHE, M., PENON, P., 1983, Detection of sequences with Z-DNA forming potential in higher plants, *Biochem. Bioph. Res. Commun.* ,116, 113-120

DEMEKE, T., LYNCH, D.R., KAWCHUK, L.M., KOZUB, G.C., ARMSTRONG, J.D., 1996, Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis, *Plant Cell Reports*, 15(9), 662- 667

DENHAM, H., 1956, Aging, a theory based on free radical and radiation chemistry, *J Geronto,* 11, 298–300

DENHAM, H., 1981, The aging process, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 78, 7124–7128

DISEPIO, D., CHANDRARATNA, R.A.S., NAGPAL, S., 1999, Novel approaches for the treatment of psoriasis, DDT, 4 , 222- 231

DOLDI, M.L., VOLMANN, J., LELLEY, T., 1997, Genetic diversity in soybean as determined by RAPD and microsatellite analysis, *Plant Breeding*, 116, 331- 335

EBERHARDT, M.K., 2001. Reactive oxygen metabolites, chemistry and medical consequences, CRC Press, 24 (1), 23- 262

EL-FIKY, F.K., REMMEL,R.P., STABA,E.J., 1989, *Ammi visnaga*: Somatic embryo induction and furanochromone production in embryos, seedlings and plants, *Planta Medica*, 55, 446- 451

ESTERBAUER, H., STRIEGL, G., PUHL, H., ROTHENEDER, M., 1989, Continuous monitoring of oxidation of human low density lipoprotein, *Free Radic. Res. Commun*, 6(1), 67- 75

FAIN, P.R., GOWAN, K., LABERGE, G.S., ALKHATEEB, A., STETLER, G.L., TALBERT, J., BENNETT, D.C., SPRITZ, R.A., 2003, A genome-wide screen for generalized vitiligo, confirmation of AIS1 on chromosome 1p31 and evidence for additional susceptibility loci, *Am J. Hum. Genet*., 72, 1560-1564

FISCHER, M., HUSI, R., PRATI, D., M., PEINTINGER, M., KLEUNEN, M.V., SCHMID, B. 2000, RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *Am. J. Bot.,* 87, 1128-1137

FOTAKIS, G., TIMBRELL, J.A., 2006. *In vitro* cytotoxicity assays : Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letters*, 160, 171-177

FU, C., QUI, Y., KONG, H., 2003, RAPD analysis for genetic diversity in *Changium smyrnioides* (Apiaceae), an endangered plant, *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 44, 13-18

FUKUMOTO L.R., MAZZA, G., 2000, Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3597-3604

GANZERA, M., STURM, S., STUPPNER, H.,1997, HPLC-MS and MECC analysis of coumarins. *Chromatographia*, 46, 197-203

GARN, H., KRAUSE, H., ENZMANN, V., DROSSLER, K., 1994, An improved MTT assay using the electron-coupling agent menadione, *Immunol Methods*, 168, 253-256

GENKINA, G.L., 1981, Methods of analysis of furocoumarins, *Khim.-Farm. Zh., Review*, 15(11), 108-115

GEORGIEVSKII, V.P., KOMISSARENKO, N.F., DMITRUK, S.E., 1990, Biologically active substance of medicinal plants [in Russian], Nauka, Novosibirsk, 9-11, 14-34, 152-191

GIBBS, M., DAWSON, D.A., MCCAMLEY, C., WARDLE, A.F., ARMOUR, J.A., BURKE, T., 1997, Chicken microsatellite markers isolated from libraries enriched for simple tandem repeats, *Anim Genet.*, *28*, 401-417

GILBERT, D.L., 1981, Perspective on the history of oxygen and life, In oxygen and the living process, an inter- disciplinary approach. *Springer Verlag*, New York, 1-43

GILBERT, D.L., COLTON,C.A., 1999, Reactive oxygen species in biological systems, *Kluwer Academic Publishers*, USA, 12-16

GOLEMBIEWSKI, R.C., DANNEBERGER, T.K., SWEENEY, P.M., 1997, Potential of RAPD markers for use in the identification of creeping bentgrass cultivars, *Crop Sci.*, 37, 212- 214

GREINWALD, R., STOBERNACK, H.P., 1990, *Ammi visnaga (L.) Lamarck* - the *Khella* plant [*Ammi visnaga*- Das bischofskraut], *Phytoter.*, 11, 65-69

GRODZICKER, T., WILLIAMS, J., SHARP, P., SAMBROOK, J., 1975. Physical mapping of temperature sensitive mutants of adenovirus, *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 39, 439-446

GROMAKOVA, A.I., 1982, Author's Abstract of Cand. Sci. (Pharm.) Thesis [in Russian], Moscow

GROPPE, K., SANDERS, I., WIEMKEN, A., BOLLER, T., 1995, A microsatellite marker for studying the ecology and diversity of fungal endophytes (*Epichloe spp*) in grasses, *Appl Environ Microbio, 61*, 3943-3949

GUILLENSANS, R., GUZMANCHOZAS, M., 1998, The thiobarbituric acid (TBA) raection in foods, *Critical reviews in food sicence and nutrition*, 38(4), 315- 330

GÜLÇİN, İ., OKTAY, M., KİREÇCİ, E., KÜFREVİOĞLU, Ö.İ., 2003, Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum L*.) seed extracts, *Food Chemistry*, 83, 371-382

GÜLÇİN, İ., ŞAT, İ.G., BEYDEMİR, Ş., ELMASTAŞ, M., KÜFREVİOĞLU, Ö.İ., 2004. Comparison of antioxidant of clove (*Eugenia caryophylata* thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.), *Food Chem*., 87, 393-400

GÜNAYDIN, K., ÜNAL, G., 1996, *Melekotu Bitkisinin Uçucu Yağ ve Kumarin Bileşiklerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi

GÜNAYDIN, K., ERİM, F.B., 2002, Determination of khellin and visnagin in *Ammi visnaga* fruits by capillary electrophoresis, Journal of Chromatography, 954, 291-294

GÜNAYDIN, K., BEYAZIT, N., 2004, The chemical investigations on the ripe fruits of *Ammi visnaga (Lam.)* Lamarck growing in Turkey, *Natural Product Research*, 18, 169-175

GÜNER, A., ÖZHATAY, N., EKİM, T., BAŞER, K.H.C., 2000, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, vol. 11, 578-582

HALLDEN, C., NILSSON, N.O., RADING, I.M., SALL, T., 1994, Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of *Brassica napus* breeding lines, *Theor. Appl. Genet.*, 88, 123- 128

HALLIWELL, B, GUTTERIDGE, J.M.C., 1999, Free radicals in biology and medicine, *Oxford Science Publicati.*, Oxford

HAMERSKI, D., BEIER, R.C., KNEUSEL, R.E., MATERN, U., HIMMELSPACH, K., 1990, Accumulation of coumarins in elicitortreated cell suspension cultures of *Ammi majus*, Phytochemistry, 4, 1137- 1142

HAWRYL, M.A., SOCZEWINSKI, E., DZIDO, T.H., 2000, Seperation of coumarins from *Archangelica officinalis* in high-performance liquid chromatography and thin-layer chromotography systems, *J. Chromatogr. A*., 886, 75-81

HEINZE, B., SCHMIDT, J., 1955, Monitoring genetic fidelity vs somaclonal variation in Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis by RAPD analysis, *Euphytica*, 85(1-3), 341- 345

HELENTJARIS, T., SLOCUM, M., WRIGHT, S., SCHAEFER, A., NIENHUIS, J., 1986, Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms, *Theor. Appl. Genet*. 61, 650-658

HEYWOOD, V.H., 1979, Flowering plants of the world, *Oxford University Press*, Oxford

ISHIBASHI, Y., SAITOH, T., ABE, S., YOSHIDA, M.C., 1997, Sex-related spatial kin structure in a spring population of grey-sided voles *Clethrionomys rufocanus* as revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Mol Ecol., 6*, 63-71

JAWAD, A.M., JAFFER, H.J., AL-NAIB, A., NAJI, A., 1988, Antimicrobial activity of sesquiterpene lactone and alkaloid fractions from Iraqi-plants, *Int., J., Crude Drug Res.*, 26 (4), 185-188

KABOUCHE, A., KABOUCHE Z., ÖZTÜRK, M., KOLAK, U., TOPÇU, G., 2007, Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*, *Food chem*,102(4), 1281-1287

KAMINSKI, M., KARTANOWICZ, R.., KAMINSKI, M.M., KROLICKA, A., SIDWA-GORYCKA, M., LOJKOWSKA, E., *et al.*, 2003, HPLC-DAD in identification and quantification of selectedcoumarins in crude extracts from plant cultures of *Ammi majus* and *Ruta graveolens*, *J Sep Sci*., 26(14), 1287-91

KEATING, G.J., O'KENNEDY, R., 1997, The chemistry and occurrence of coumarins, O'Kennedy & Thornes, 23-66

KIVANÇ, M., AKGÜL, A., 1986, Antibacterial activities of essential oils from Turkish species and Citrus. *Flavour and Fragrance Journal*, 1, 175-179

KOLEVA, I.I., VANBEEK, R.A., LINSSEN, J.P.H., DEGROOT, A., EVSTATIEVA, L.N., 2002, Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity, A Comparison Study on Three Testing Methods, *Phytochem. Anal.*, 13, 8-17

KOUL, S., KOUL, A.K., 1993, Development of media for growth and furanocoumarin production of *Ammi majus* cells, *Fitoterapia*, 5, 415- 422

KOWALSKI, B., RATUSZ, K., KOWALSKA, D., BEKAS, W., 2004, Determination of the oxidative stability of vegetable oils by differential scanning calorimetry and rancimat measurement, *Eur. J. Lipid Sci. Technol*., 106, 165-169

KROLICKA, A., STANISZEWSKA, I., BIELAWSKI, K., MALINSKI, E., SZAFRANEK, J., LOJKOWSKA, E., 2001, Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*, *Plant Sci.*, 160, 259-264

KROLICKA, A., KARTANOWICZ, R., WOSINSKI, S.A., SZPITTER, A., KAMINSKI, M., LOJKOWSKA, E., 2006, Induction of secondary metabolite production in transformed callus of *Ammi majus L.* grown after electromagnetic treatment of the culture medium, *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1386-1391

KUBOTA, M., ARAI, K., YORIMITU, A., 1993, Studies of Papaver section Oxytona growing as garden plants on *Papaver bracteatum* Lindl., *Yakugaku Zasshi*, 113(11), 810- 817

KURSINZKI, L., TROILINA, J., SZOKE, E., 1998, Determination of visnagin in *Ammi visnaga* hairy root cultures using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography, *Microchemical Journal*, 59, 392-398

KUZNETSOVA, G.A., 1967, Natural coumarins and furocoumarins [in Russian], Nauka, Leningrad

LAMIRI, A., LHALOUI, S., BENJILALI, B., BERRADA, M., 2001, Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say), *Field Crops Research*, 71, 9-15

LERNER, A.B., 1959, Vitiligo, *J. Invest Dermatol*, 32, 285-310

LOCHER, C.P., BURCH, M.T., MOWER, H.F., BERECSTECKY, J., DAVIS, H., VAN POEL, B., LASURE, A., VANDEN BERGHE, D.A., VILETNICK, A.J., 1995, Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants, *Ethnopharmacol*, 49, 23–32

LOECKIE, L., JOHN H., 1999, Biomarkers of free radical damage applications in expremental animals in human, *Free Radical Biology and Medicine* 26, 202-226

LYNCH, M., WALSH, B., 1998, Genetics and analysis of quantitative traits, Sinauer Associates, Sunderland, MA

MABRY, T.J., ULUBELEN, A.J., 1980, Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins, and lignans, *J. Agric. Food. Chem*., 28, 188-96

MAHINDRU, S.N., 1992, Indian plant perfumes, *Pub Metropolitan*, New Delhi, 103-104

MAHMOUD, A.L.E., 1999, Inhibition of growth and aflatoxin biosynthesis of aspergillus flavus by extracts of some Egyptian plants, *Letters in Applied Microbiology*, 29, 334-336

MAJUMDAR, P.P., DAS, S.K., LI, C.C., 1988, A genetic model for vitiligo. *Am. J. Hum. Genet.*, 43: 119-25

MATERN, U., LUER, P., KREUSCH, D., 1999, BARTON, D., NAKANISHI, K., METH-COHN, O., SANKAWA, U., Biosynthesis of coumarins, polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives, *Comprehensive Natural Products Chemistry*, vol 1, *Elsevier Science Ltd*., Oxford, UK., 623-637

MAVAREZ J., AMARISTA M., POINTIER J.P., JARNE P., 2000, Microsatellite variation in the freshwater schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata*. *Mol Ecol*, 9, 1009-1011

MILLER, D.D., 1996, Mineral, In O.R. Fenama (Ed.), *Food Chemistry*, Marcel Deckker, New York, 618-649

MOLISH, H., 1937, Der einfluss einer pflanze auf die andere- allelopathie. Fischer: Jena

NASSER, A., SINGAB, B., 1998, Acetylated flavonol triglycosides from *Ammi majus L.*, *Phytochemistry*, 49, 2177-2180

NEI, M., LI, W.H., 1979, Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, *Pro. Natl. Acad, Sci*. USA. 76, 5269-5273

NORDLUND, J.J., ORTONNE, J.P., SYSTEM, J.J. NORDLUND, R.E. BOISSY, V.J. HEARING, R.A., KING, J.P. ORTONNE, eds., 1998, Vitiligo vulgaris, In The Pigmentary (New York: Oxford University Press), 513–551

OCHOCKA, R.J., RAJZER, D., KOWALSKI, P., LAMPAREZYK, H., 1995, Determination of coumarins from *Chrysanthemum segetum* L. by capillary electrophoresis, *J Chromatogr A.*, 709, 197-202

OGG, G.S, DUNBAR, P.R, ROMERO, P., *et al*., 1998, High frequency of skin-homing melanocyte-specific cytotoxic T lymphocytes in autoimmune vitiligo, *J. Exp Med*, 6, 1203-1208

OHNISHI M., MORISHITA H., IWAHASHI H., TODA, S., SHIRATAKI Y., KIMURA, M., KIDO, R., 1994, Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis, *Phytochemistry*, 36, 579

ÖZTÜRK, M., AYDOĞMUŞ-ÖZTÜRK, F., DURU M.E., TOPÇU, G., 2007, Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*), An edible medicinal plant, *Food Chem*, 103, 623-630

POULSEN, D.M.E., HENRY, R.J., JOHNSTON, R.P., IRWIN, J.A.G., REES, R.G., 1995, The use of bulk segregant analysis to identify a RAPD marker linked to leaf rust resistance in barley, *Theoretical and Applied Genetics*, 91(2), 270- 273

RAGHUNATHACHARI, P., KHANNA, V.K., SINGH, U.S., SINGH, N.K., 2000, RAPD analysis of genetic variability in Indian scented rice germplasm (*Oryza sativa L.*), Current Science, 79 (7-10), 994-998

READ, N.D., 1991, Low-temperature scanning electron microscopy of fungi and fungus-plant interactions, In: *Electron Microscopy of Plant Pathogens* (ed. by K. Mendgen & D.-E. Lesemann), Springer-Verlag: Berlin 17-29

SAKAR, M.K., TANKER, M., 1991, Fitokimyasal analizler, tanım, miktar tayini ve izolasyon. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi yayınları No:67, 105

SAMEC, P., POSVEC, Z., STEJSKAL, J., NASINEC, V., GRIGA, M., 1998, Cultivar identification and relationships in *Pisum sativum* L. based on RAPD and isoenzymes, *Biologia Plantarum*, 41(1), 39-48

SANTOS, F.R., PENA, S.D.J, EPPLEN, T.J., 1993, Genetic population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism, *Hum. Genet., 90*, 655-656

SCHOBERG, A., SINA, A., 1948, Xanthotoxin from the fruits of *Ammi majus*, *Nature* , 161, 481

SCHUSTER, E., COLEMAN, N.D., FRISVAD, J.C., DIJCK, P.W.M., 2002, On the safety of *Aspergillus niger*, *Review*, *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 59, 426-435

SEMAGN, K., BJORNSTAD, A., NDJIONDJOP, M.N., 2006, An oveview of molecular marker methods for plants, *Review*, *African Journal of Biotechnology*, 5(25), 2540-2568

SHAHIDI, F., 1997, In Natural Antioxidants-Chemistry, Health Effects and Applications, ed. F. Shahidi, *AOCS Press*, Champaigh, IL, ch. 24

SIDWA-GORYCKA, M., KROLICKA, A., KOZYRA, M., GLOWNIAK, K., BOURGAUD, F., LOJKOWSKA, E., 2003. Establishment of a co-culture of *Ammi majus* L. and *Ruta graveolens* L. for the synthesis of furanocoumarins, *Plant Science*, 165, 1315-1319

SIES, H., 1985, Oxidative Stress : introductory remarks. In Oxidative Stress, ed. Sies. pp. 1-8 Academic Press London

SINGH, A.K., SINGH, M., SINGH, A.K., SINGH, R., KUMAR, S., KALLOO, G., 2006, Genetic diversity within the genus Solanum (Solanaceae) as revealed by RAPD markers, *Current Science*, 90(5), 711- 716

SOKOVIC, M., TZAKOU, O., PITAROKILI, D., COULADIS, M., 2002, Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece, *Nahrung/Food*, 46 (5), 317- 320

STANISZEWSKA, I., KROLICKA, A., MALINSKI, E., LOJKOWSKA, E., SZAFRANEK, J., 2003, Elicitation of secondary metabolites in *in vitro* cultures of *Ammi majus L.*, *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 565-568

TANKER, N., TANKER, M., 1998, Farmakognozi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 65, Cilt: 2. sayfa 406-407

TEILLIER, S., 2006, Apiaceae [online], Universidad Central de Santiago de Chile, http://www.chlorischile.cl/cursoonline/guia9/fig33y34.htm#esquema
[Ziyaret Tarihi: 5 mayıs 2007]

THOM, S.M., HOROBIN, R.W., SEIDLER, E., BARER, M.R., 1993, Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity, *Appl. Bacteriol*, 74, 433-443

TOPÇU, G., AY, M., BİLİCİ, A., SARIKÜRKCÜ, C., ÖZTÜRK, M., ULUBELEN, A., 2007, A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*, *Food Chem.*; 103(3), 816-822

VALKOVA, S., TRASHLIEVA, M., CHRISTOVA, P., 2004, Treatment of vitiligo with local khellin and UVA: comparison with systemic PUVA. *Clin Exp Dermatol*, 29, 180-4

VONDERBANK, H., 1949, Ergebnisse der Chemotherapie der Tuberculose, *Pharmazie*, 4, 198-207

VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M., 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Res*., 23, 4407- 4414

WEISING, K., NYBOM, H., WOLFF, K., KAHL, G., 2005, DNA fingerprinting in plants : principles, methods, and applications, 2 nd edn. *CRC Press*, 450

WELSH, J., McCLELLAND, M., 1990, Fingerprinting genome-using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.,* 18, 7213-7218

WILLIAMS, J.G.K., KUBLIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V., 1990, DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res*., 18, 6531–6535

YAMADA, H., KOHNO, S., MAESAKI, S., KOGA, H., KAKU, M., HARA, K., TANAKA, H., 1993, Rapid and highly reproducible method for antifungal susceptibilty testing of Aspergillus species, *J. Clin. Microbiol*., 31(4), 1009–1012

YILDIZ, B., AKTOKLU, E., 1987, Taksonomik Terminoloji (Tohumlu Bitkiler), Malatya, 169-170

ZGORKA, G., DRAGAN, T., GLOWNIAK, K., BASIURA, E., 1998, Determination of furanochromones and pyranocoumarins in drugs and *Ammi visnaga* fruits by combined solid-phase extraction high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 797, 305-309

ZHANG X.J, LIU, J.B, GUI, J.P, LI, M., XIONG, Q.G, WU, H.B.L, *et al*, 2004, Characteristics of genetic epidemiology and genetic models for vitiligo, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 51, 383-90