

**LAMIACEAE FAMILYASINA AIT FARKLI  
TÜRLERDEN ELDE EDİLEN ALLELOPATİK  
POTANSİYELE SAHİP ESANSİYEL YAĞLARIN  
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Sedat BOZARI**

**Doktora Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Prof. Dr. Güleray AĞAR  
2012  
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**LAMIACEAE FAMILİYASINA AİT FARKLI TÜRLERDEN ELDE  
EDİLEN ALLELOPATİK POTANSİYELE SAHİP ESANSİYEL  
YAĞLARIN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Sedat BOZARI**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERZURUM  
2012**

**Her Hakkı Saklıdır**



T.C.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

LAMIACEAE FAMILİYASINA AİT FARKLI TÜRLERDEN ELDE EDİLEN  
ALLELOPATİK POTANSİYELER SAHİP ESANSİYEL YAĞLARIN GENOTOKSİK  
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Prof. Dr. Güleray AĞAR danışmanlığında, Sedat BOZARI tarafından hazırlanan bu çalışma 10/10/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Güleray AĞAR

İmza

Üye : Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

İmza

Üye : Prof. Dr. Sezai ERCİŞLİ

İmza

Üye : Doç. Dr. M. Sinan TAŞPINAR

İmza

Üye : Doç. Dr. Lokman ALPSOY

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU  
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.  
Proje No: BAP-2010/271

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

## ÖZET

Doktora Tezi

### LAMIACEAE FAMILYASINA AİT FARKLI TÜRLERDEN ELDE EDİLEN ALLELOPATİK POTANSİYELE SAHİP ESANSİYEL YAĞLARIN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Sedat BOZARI

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Güleray AĞAR

Bu tezde, Lamiaceae familyasına ait altı farklı türden hidrodistilasyonla elde edilen ve allelopatik potansiyelleri olan esansiyel yağların uygulandıkları mısır tohumları üzerine genotoksik etkileri belirlendi. Elde edilen uçucu yağların içerikleri GC-MS yöntemi ile tayin edildi. Bu yağlar, biyolojik aktivitelerini belirlemek için farklı dozlarda *Zea mays* L. tohumlarına uygulandı. Bileşenlerin, artan dozlarda mısır tohumlarının çimlenme oranlarıyla beraber kök ucu meristemlerinin mitotik bölünme yüzdelerini düşürdüğü belirlendi. Esansiyel yağların genotoksik etkilerini belirlemek için RAPD ve AFLP teknikleri kullanıldı. Genomik stabilite RAPD, dozlar arasındaki genetik farklılıklar ise AFLP tekniğiyle belirlendi. RAPD ve AFLP profillerindeki değişimlerin çimlenme oranlarıyla mitotik indeks sonuçlarını desteklediği gözlemlendi. Ancak bu etkinin doza bağlı değişimler sergilemediği tespit edildi. En yüksek polimorfizm oranı *C. nepeta* bitkisinin uçucu yağlarında 55,44 olarak kaydedilirken, normale en fazla yaklaşan tür *O. rotundifolium* olup, GTS değeri 85,86 olarak belirlendi. AFLP analizlerinde aynı tür olmalarına rağmen farklı dozlarda uygulanan uçucu yağlardan dolayı mısır örneklerinin genetik benzerlik indeksleri, kontrole göre 0,272 (*M. longifolia*'da) ile 0,782 (*N. nuda*'da) değerleri arasında değişim gösterdi. Uçucu yağların gen ekspresyonuna etkisini belirlemek amacıyla da mısır örneklerinin toplam çözünebilir protein miktarları belirlenip SDS-PAGE ile protein profillerinde meydana gelen değişimler belirlendi. Çözünür protein seviyeleri, genotoksisite testlerindeki sonuçlar gibi dozdan bağımsız bir şekilde değişiklik gösterdi. Uçucu yağların benzer şekilde hormon seviyelerini de etkilediği tespit edildi. Genel anlamda esansiyel yağların etkilerini; sitotoksik, genotoksik ve fizyolojik hasarlar oluşturarak gösterdikleri belirlendi.

2012, 148 Sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Esansiyel yağlar, Genotoksisite, Çözünebilir protein, Hormon

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### DETERMINATION OF THE GENOTOXIC EFFECTS OF THE POTENTIAL ALLELOPATHIC ESSENTIAL OILS OBTAINED FROM VARIOUS SPECIES OF LAMIACEAE FAMILY

Sedat BOZARI

Ataturk University  
Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Güleray AĞAR

In the present thesis, genotoxic effects of the essential oils obtained by hydro-distillation from six different species of Lamiaceae family were determined against to maize seeds. The obtained volatiles were qualified with GC-MS. To determine their biological activity, the oils were applied to *Zea mays* L. seeds at different doses. It was observed that germination rates and mitotic division of the root tips were decreased with the increasing of the applied compounds' doses. The genotoxicity of the volatiles was determined by using RAPD and AFLP techniques. Genomic stability was established by RAPD and the genetic differences between doses with AFLP technique. The alterations obtained from RAPD and AFLP profiles supported the germination rate and mitotic index results. While the highest polymorphism value was calculated as 55,44 for *C. nepeta* volatiles, the closest species to control was *O. rotundifolium* with 85,86 GTS value. Due to different applied concentrations of volatile oils, the genetic similarity indices of maize seedlings varied from 0,272 (*M. longifolia*) to 0,782 (*N. nuda*), even though they were same species according to the AFLP analyses. In order to determine effects of the volatiles on gene expression, the soluble protein levels of the samples were measured and the changes occurred in the protein profiles were determined by SDS-PAGE analyses. Similar to the genotoxicity results, the soluble protein levels of the samples showed differences without a dose-dependent manner. Samely, hormone's level was affected by the volatiles. In general, these compounds showed their effects as a result of their cytotoxic, genotoxic and physiological damages.

**2012, 148 Pages**

**Keywords:** Essential oils, genotoxicity, Soluble protein, Hormones.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince engin bilgi ve deneyimleriyle bana öncülük eden, çalışmalarımı büyük bir titizlikle yürüten, her zaman manevi desteğini ve yardımını gördüğüm tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a iyi niyetini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgisini ve ilgisini vermekten hiçbir zaman kaçınmayan, Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye teşekkürlerimi arz ederim. Yardım ve katkılarıyla bana yol gösteren Sayın Prof. Dr. Sezai ERCİŞLİ'ye Biyoloji bölümünün bütün imkânlarını sağladığı için Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya, çalışmalarım sırasında kullandığım örneklerin tayinlerini yapan Sayın Doç. Dr. Yusuf KAYA'ya, laboratuvar çalışmalarının farklı aşamalarında ve yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Derya YANMIŞ'a, Sayın Uzman Biyolog Furkan ORHAN'a, Sayın Biyolog Filiz AYGÜN ERTÜRK'e, teşekkürlerimi sunarım. Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarının değerli çalışanlarına ilgi ve yardımlarından dolayı ayrıca teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında sevgi, ilgi, maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Annem, Babam Kardeşlerim ve Eşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP-2010/271) kapsamında desteklenmiştir.

Sedat BOZARI

Ekim 2012

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>	<b>8</b>
2.1. Esansiyel Yağlar.....	8
2.1.1. Monoterpenler.....	9
2.1.2. Sesquiterpenler.....	10
2.1.3. Diterpenler.....	10
2.1.4. Quassinoidler.....	10
2.1.5. Benzoksazinoidler.....	10
2.1.6. Glukozinolatlar.....	10
2.1.7. Triterpenoidler.....	11
2.1.8. Karotenoidler.....	11
2.2. Allelopatik Etkileşim.....	12
2.3. Lamiaceae Bitki Familyası.....	16
2.3.1. <i>Calamintha nepeta</i> (L.) SAVI ssp. <i>glandulosa</i> .....	17
2.3.2. <i>Mentha longifolia</i> (L.) HUDSON (L.) HUDSON.....	18
2.3.3. <i>Nepeta nuda</i> L. ssp. <i>nuda</i> L.....	19
2.3.4. <i>Origanum rotundifolium</i> BOISS.....	20
2.3.5. <i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>vulgare</i> .....	20
2.3.6. <i>Satureja hortensis</i> L.....	21
2.4. Genotoksisite.....	23
2.4.1. Mutasyon.....	24
2.4.2. Metilasyon.....	25
2.5. Sitotoksisite.....	26

2.6. Allelopatik Potansiyelin Belirlenmesi İçin Gerekli Olan Biyoteknolojik	
Yöntemler .....	26
2.6.1. Mİ (Mitotik indeks - Allium cepa) testi .....	27
2.6.2. MN (Micronucleus/Mikronükleus) .....	27
2.6.3. SCE (Sister cromatid exchange/Kardeş kromatid değişimi=KDD) .....	27
2.6.4. RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA/ Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) .....	28
2.6.5. AFLP (Amplified fragment length polymorphism/ Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi ) .....	28
2.6.6. CRED-RA (Coupled restriction enzyme digestion-random amplification/ Çift restriksiyon enzimi kesimi ve rastgele çoğaltım).....	29
2.6.7. MSAP( Methylation-sensitive amplified polymorphism/ Metilasyona duyarlı çoğaltılmış polimorfizm) .....	29
2.6.8. RFLP (Restriction fragment length polymorphism/Sınırlayıcı enzim parça uzunluk polimorfizmi) .....	29
2.6.9. Kantitatif çözünebilir protein miktarı tayini (Bradford yöntemi) .....	30
2.6.10. SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis/ Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) ile protein elektroforezi .....	30
2.6.11. Hormon analizi .....	31
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>32</b>
3.1. Materyal.....	32
3.1.1. Bitki örneklerinin toplanması .....	32
3.1.2. Kullanılan cihazlar .....	33
3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar .....	34
3.1.4. Sitotoksisite testlerinde kullanılan çözeltiler.....	35
3.1.5. DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler .....	36
3.1.6. RAPD ve AFLP tekniklerinde kullanılan çözeltiler .....	37
3.1.7. Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler .....	38
3.1.8. Çözünebilir protein miktarı tayininde kullanılan çözeltiler .....	40
3.1.9. SDS-PAGE protein analizi için kullanılan çözeltiler .....	40
3.1.10. Hormon analizlerinde kullanılan çözeltiler .....	45



3.2. Yöntem .....	45
3.2.1. Uçucu yağların eldesi .....	45
3.2.2. GC–MS (Gas chromatography–mass spectrometry= Gaz kromatografi-kütle spektrometresi ) analizi .....	45
3.2.3. Çimlenme deneyleri .....	46
3.2.4. Mitotik İndeks testi.....	46
3.2.5. DNA izolasyonu .....	47
3.2.6. RAPD-PCR protokolü.....	48
3.2.6.a. RAPD primerleri.....	48
3.2.6.b. Agaroz jel elektroforezi.....	50
3.2.6.c. RAPD analizleri ve genomik kalıp sabitliliğinin (Genomik template stability= GTS) belirlenmesi .....	50
3.2.7. AFLP protokolü.....	50
3.2.7.a. DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesimi .....	51
3.2.7.b. Adaptörlerin eklenmesi .....	51
3.2.7.c. Pre-amplifikasyon reaksiyonları .....	52
3.2.7.d. Selektif amplifikasyon.....	53
3.2.7.e. AFLP primerleri .....	54
3.2.8. Jelin dökülmesi ve örneklerinin yüklenmesi .....	55
3.2.9. Gümüş boyama.....	56
3.2.10. Toplam çözüner protein miktarı tayini.....	56
3.2.11. SDS-PAGE analizi .....	57
3.2.11.a. Proteinlerin izolasyonu .....	57
3.2.12. Numunelerin yüklenmesi ve jellerin boyanması .....	58
3.2.13. Hormon ekstraksiyon, saflaştırma ve analiz İşlemleri .....	58
3.2.13.a. Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri .....	58
3.2.13.b. Sıvı kromatografi (HPLC) ile analiz şartları .....	59
3.2.14. İstatistiksel analizler .....	60
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>61</b>
4.1. Bitkilerden Elde Edilen Esansiyel Yağların İçerikleri .....	61
4.2. Uçucu Yağların Çimlenme Oranları Üzerine Etkisi.....	66
4.3. Uçucu Yağların Kök Ucu Hücrelerinin Mitotik İndeksleri Üzerine Etkisi.....	67

4.4. Uçucu Yağların uygulandığı <i>Zea mays</i> L. örneklerinin RAPD Profilleri .....	69
4.5. AFLP Analizleri .....	81
4.6. Uçucu Yağların Çözünabilir Protein Miktarına Etkisi .....	93
4.7. Uçucu Yağların Uygulandığı <i>Zea mays</i> L. Örneklerinin SDS-PAGE Profilleri ..	97
4.8. Uçucu Yağların Uygulandığı <i>Zea mays</i> L. Örneklerinin Hormon Analizleri ...	103
<b>5. TARTIŞMA SONUÇ .....</b>	<b>107</b>
5.1. Öneriler.....	130
KAYNAKLAR .....	131
ÖZGEÇMİŞ .....	148

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
5 <sup>m</sup> C	5 metil sitozin
aa	Aminoasit
ABA	Absisik asit
AFB1	Aflatoxin B <sub>1</sub>
AFG1	Aflatoxin G <sub>1</sub>
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
APS	Amonyum per sülfat
bç	Baz çifti
BME	Beta merkaptoetanol
BSA	Bovin Serum Albumin
C	Karbon
CpG	Sitozin fosfat Guanin
CRED-RA	Çift Restriksiyon Enzimi Kesimi ve Rastgele Çoğaltım
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	Dithioeritol
GA	Giberrallik asit
GAA	Glasiyal asetik asit
GC-MS	Gaz Kromatografi -Kütle Spektrometresi
gr	Gram
GTS	Genomik Kalıp Stabilitesi
HCL	Hidroklorik asit
HIV-1	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
HPLC	Yüksek Performans Basınç Sıvı Kromatografisi
IAA	İndol asetik asit
IAS	Uluslararası Allelopati Topluluğu
IQ	2-amino-3- methylimidazo
K	Potasyum
KDD	Kardeş Kromatid Değişimi
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Monopotasyum Fosfat
Kons	Konsantrasyon
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
Mİ	Mitotik İndeks
MIC	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MMC	Mitomycin C
MN	Mikronükleus

MSAP	Metilasyona Duyarlı oğaltılmış Polimorfizm
N	Normal
NaOCL	Sodyum hipoklorit
ND	Belirlenemeyen
ng	Nanogram
OD <sub>260</sub>	260nm'de okuma değeri
P	Fosfat
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pmol	Pikomol
PVPP	Polivinilpolipirilidon
RAPD	Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluk Polimorfizmi
RI	Tutma İndisi
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
RT	Tutunma Zamanı
SCE	Kardeş Kromatid Değişimi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TBE	Tris Borat EDTA
TCA	Trikloroasetik asit
TE	Tris-EDTA
TEAA	Trietil amonyum asetat
TEMED	Tetrametiletilediamin
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Aritmetic Means
UV	Ultraviyole
V	Volt
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bitki sekonder metabolitlerinin ekolojik ve fizyolojik fonksiyonları.....	9
Şekil 2.2. Esansiyel yağlarda bulunan bazı majör bileşiklerin kimyasal yapısı .....	12
Şekil 2.3. Allelokimyasalların verici bitkiden hedef bitkiye taşınma yolları .....	14
Şekil 2.4. Kullanılan Bitkiler .....	23
Şekil 4.1. Kromozomal anormallikler.....	68
Şekil 4.2. <i>C. nepeta</i> 'dan elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarından elde edilen DNA örneklerinin OPH-18 ve OPY-6 primerlerine karşı gösterdiği amplifikasyon ürünleri.....	71
Şekil 4.3. <i>M. longifolia</i> 'dan elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarından elde edilen DNA örneklerinin OPY-15 ve OPY-16 primerlerine karşı gösterdiği amplifikasyon ürünleri.....	73
Şekil 4.4. <i>N. nuda</i> 'dan elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarından elde edilen DNA örneklerinin OPA-13 ve OPH-17 primerlerine karşı gösterdiği amplifikasyon ürünleri .....	75
Şekil 4.6. <i>O. vulgare</i> 'den elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarından elde edilen DNA örneklerinin OPY-1 ve OPY-8 primerlerine karşı gösterdiği amplifikasyon ürünleri.....	79
Şekil 4.7. <i>S. hortensis</i> 'ten elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarından elde edilen DNA örneklerinin OPW-1 ve OPB-8 primerlerine karşı gösterdiği amplifikasyon ürünleri.....	81
Şekil 4.8. <i>C. nepeta</i> 'nın uçucu yağlarının farklı dozlarda uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohum örnekleri arasındaki yakınlık oranları .....	82
Şekil 4.9. <i>C. nepeta</i> 'nın uçucu yağlarının uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohumlarının E-ACA/ M-CTA ve E-AAG/ M-CTA AFLP primerine karşı oluşturduğu amplifikasyon ürünleri .....	83
Şekil 4.10. <i>M. longifolia</i> 'nın uçucu yağlarının farklı dozlarda uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohum örnekleri arasındaki yakınlık oranları.....	84

<b>Şekil 4.11.</b> <i>M. longifolia</i> 'nin uçucu yağlarının uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohumlarının E-AAC/ M-CTC ve E-AAG/ M-CAA AFLP primerine karşı oluşturduğu amplifikasyon ürünleri .....	85
<b>Şekil 4.12.</b> <i>N. nuda</i> 'nin uçucu yağlarının farklı dozlarda uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohum örnekleri arasındaki yakınlık oranları .....	86
<b>Şekil 4.13.</b> <i>N. nuda</i> 'nin uçucu yağlarının uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohumlarının E-ACA/ M-CTA ve E-ACA/ M-CTC AFLP primerine karşı oluşturduğu amplifikasyon ürünleri .....	87
<b>Şekil 4.14.</b> <i>O. rotundifolium</i> 'un uçucu yağlarının farklı dozlarda uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohum örnekleri arasındaki yakınlık oranları.....	88
<b>Şekil 4.15.</b> <i>O. rotundifolium</i> 'nin uçucu yağlarının uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohumlarının E-ACA/ M-CTA ve E-ACA/ M-CTC AFLP primerine karşı oluşturduğu amplifikasyon ürünleri .....	89
<b>Şekil 4.16.</b> <i>O. vulgare</i> 'nin uçucu yağlarının farklı dozlarda uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohum örnekleri arasındaki yakınlık oranları.....	90
<b>Şekil 4.17.</b> <i>O. vulgare</i> 'nin uçucu yağlarının uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohumlarının E-AAC/ M-CTC ve E-AAG/ M-CAA AFLP primerine karşı oluşturduğu amplifikasyon ürünleri .....	91
<b>Şekil 4.18.</b> <i>S. hortensis</i> 'in uçucu yağlarının farklı dozlarda uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohum örnekleri arasındaki yakınlık oranları.....	92
<b>Şekil 4.19.</b> <i>S. hortensis</i> 'in uçucu yağlarının uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohumlarının E-ACA/ M-CTA ve E-AGC/ M-CTC AFLP primerine karşı oluşturduğu amplifikasyon ürünleri .....	93
<b>Şekil 4.20.</b> <i>C. nepeta</i> 'dan elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarının SDS-PAGE protein profilleri .....	98
<b>Şekil 4.21.</b> <i>M. longifolia</i> 'dan elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarının SDS-PAGE protein profilleri .....	99
<b>Şekil 4.22.</b> <i>N. nuda</i> 'dan elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarının SDS-PAGE protein profilleri .....	100
<b>Şekil 4.23.</b> <i>O. rotundifolium</i> 'dan elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarının SDS-PAGE protein profilleri .....	101

<b>Şekil 4.24.</b> <i>O. vulgare</i> 'den elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarının SDS-PAGE protein profilleri .....	102
<b>Şekil 4.25.</b> <i>S. hortensis</i> 'ten elde edilen yağların uygulandığı mısır tohumlarının SDS-PAGE protein profilleri .....	103

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> Çalışmada kullanılan bitki örnekleri, toplandıkları lokasyonlar ve Herbarium numaraları .....	32
<b>Çizelge 3.2.</b> Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve modelleri .....	33
<b>Çizelge 3.3.</b> Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ve üretici firmaları .....	34
<b>Çizelge 3.4.</b> RAPD’de kullanılan primerler ve DNA sekans bilgileri .....	49
<b>Çizelge 3.5.</b> Selektif amplifikasyonda kullanılan AFLP primer kombinasyonları .....	55
<b>Çizelge 4.1.</b> GC-MS yöntemiyle <i>C. nepeta</i> bitkisinden elde edilen uçucu yağların içerik analizleri .....	61
<b>Çizelge 4.2.</b> GC-MS yöntemiyle <i>M. longifolia</i> bitkisinden elde edilen uçucu yağların içerik analizleri .....	62
<b>Çizelge 4.3.</b> GC-MS yöntemiyle <i>N. nuda</i> bitkisinden elde edilen uçucu yağların içerik analizleri .....	63
<b>Çizelge 4.4.</b> GC-MS yöntemiyle <i>O. rotundifolium</i> bitkisinden elde edilen uçucu yağların içerik analizleri .....	64
<b>Çizelge 4.5.</b> GC-MS yöntemiyle <i>O. vulgare</i> bitkisinden elde edilen uçucu yağların içerik analizleri .....	65
<b>Çizelge 4.6.</b> GC-MS yöntemiyle <i>S. hortensis</i> bitkisinden elde edilen uçucu yağların içerik analizleri .....	66
<b>Çizelge 4.7.</b> Altı farklı türden, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış uçucu yağların mısır tohumlarının çimlenme oranları üzerine (%) etkisi .....	67
<b>Çizelge 4.8.</b> Altı farklı türün esansiyel yağının uygulandığı <i>Zea mays L.</i> kök uçlarından hesaplanan mitotik bölünme yüzdeleri .....	68
<b>Çizelge 4.9.</b> <i>C. nepeta</i> ’dan elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarının kontrollerinde meydana gelen bantlar ile tüm primerlere karşı elde edilen polimorfik bantların moleküler uzunlukları, GTS ve polimorfizm oranları .....	70
<b>Çizelge 4.10.</b> <i>M. longifolia</i> ’dan elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarının kontrollerinde meydana gelen bantlar ile tüm primerlere	



karşı elde edilen polimorfik bantların moleküler uzunlukları, GTS ve polimorfizm oranları.....	72
<b>Çizelge 4.11.</b> <i>N. nuda</i> 'dan elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarının kontrollerinde meydana gelen bantlar ile tüm primerlere karşı elde edilen polimorfik bantların moleküler uzunlukları, GTS ve polimorfizm oranları.....	74
<b>Çizelge 4.12.</b> <i>O. rotundifolium</i> 'dan elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarının kontrollerinde meydana gelen bantlar ile tüm primerlere karşı elde edilen polimorfik bantların moleküler uzunlukları, GTS ve polimorfizm oranları.....	76
<b>Çizelge 4.13.</b> <i>O. vulgare</i> 'den elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarının kontrollerinde meydana gelen bantlar ile tüm primerlere karşı elde edilen polimorfik bantların moleküler uzunlukları, GTS ve polimorfizm oranları.....	78
<b>Çizelge 4.14.</b> <i>S. hortensis</i> 'ten elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarının kontrollerinde meydana gelen bantlar ile tüm primerlere karşı elde edilen polimorfik bantların moleküler uzunlukları, GTS ve polimorfizm oranları.....	80
<b>Çizelge 4.15.</b> <i>C. nepeta</i> 'nın uçucu yağlarının uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohumları arasındaki genetik benzerlik indeksi .....	82
<b>Çizelge 4.16.</b> <i>M. longifolia</i> 'nın uçucu yağlarının uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohumları arasındaki genetik benzerlik indeksi .....	84
<b>Çizelge 4.17.</b> <i>N. nuda</i> 'nın uçucu yağlarının uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohumları arasındaki genetik benzerlik indeksi .....	86
<b>Çizelge 4.18.</b> <i>O. rotundifolium</i> 'un uçucu yağlarının uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohumları arasındaki genetik benzerlik indeksi.....	88
<b>Çizelge 4.19.</b> <i>O. vulgare</i> 'nin uçucu yağlarının uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohumları arasındaki genetik benzerlik indeksi .....	90
<b>Çizelge 4.20.</b> <i>S. hortensis</i> 'in uçucu yağlarının uygulandığı <i>Zea mays</i> L. tohumları arasındaki genetik benzerlik indeksi .....	92
<b>Çizelge 4.21.</b> <i>C. nepeta</i> 'dan elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarında toplam çözünür protein miktarı .....	94

<b>Çizelge 4.22.</b> <i>M. longifolia</i> 'dan elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarında toplam çözümlür protein miktarı.....	94
<b>Çizelge 4.23.</b> <i>N. nuda</i> 'dan elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarında toplam çözümlür protein miktarı.....	95
<b>Çizelge 4.24.</b> <i>O. rotundifolium</i> 'dan elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarında toplam çözümlür protein miktarı.....	95
<b>Çizelge 4.25.</b> <i>O. vulgare</i> 'den elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarında toplam çözümlür protein miktarı.....	96
<b>Çizelge 4.26.</b> <i>S. hortensis</i> 'ten elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarında toplam çözümlür protein miktarı.....	97
<b>Çizelge 4.27.</b> <i>C. nepeta</i> 'nın uçucu yağlarının uygulandığı mısır örneklerinde GA, ZA, IAA ve ABA hormonlarının seviyelerinde meydana gelen değişimler .....	104
<b>Çizelge 4.28.</b> <i>M. longifolia</i> 'nın uçucu yağlarının uygulandığı mısır örneklerinde GA, ZA, IAA ve Absisik asit hormonlarının seviyelerinde meydana gelen değişimler .....	104
<b>Çizelge 4.29.</b> <i>N. nuda</i> 'nın uçucu yağlarının uygulandığı mısır örneklerinde GA, ZA, IAA ve ABA hormonlarının seviyelerinde meydana gelen değişimler .....	105
<b>Çizelge 4.30.</b> <i>O. rotundifolium</i> 'un uçucu yağlarının uygulandığı mısır örneklerinde GA, ZA, IAA ve ABA hormonlarının seviyelerinde meydana gelen değişimler .....	105
<b>Çizelge 4.31.</b> <i>O. vulgare</i> 'nin uçucu yağlarının uygulandığı mısır örneklerinde GA, ZA, IAA ve ABA hormonlarının seviyelerinde meydana gelen değişimler .....	105
<b>Çizelge 4.32.</b> <i>S. hortensis</i> 'in uçucu yağlarının uygulandığı mısır örneklerinde GA, ZA, IAA ve ABA hormonlarının seviyelerinde meydana gelen değişimler .....	106

## 1. GİRİŞ

Belli bir bölgeyi işgal eden, birbirleriyle sürekli etkileşim içinde olan canlılar ve onların cansız çevreleri, dünya üzerindeki doğal ekosistemleri oluşturmaktadır. Ekosistemlerin canlı öğelerinin başında yeşil bitkilerden oluşmuş üreticiler gelmektedir. Geniş yayılış alanları ve biyokütleleriyle besin zincirinin temel basamağının vazgeçilmez elemanlarını oluşturan bitkilerin doğadaki yayılışları biyotik (aynı türe ait bitkiler, farklı türlere ait bitkiler, hayvanlar, mantarlar ve bakteriler) ve abiyotik (sıcaklık, güneş ışınları, toprak içeriği, su ve topografya) faktörler tarafından belirlenmektedir. Birçok canlı için temel besin kaynağı olan bitkiler çeşitli canlılar için barınak oluşturmakta ve çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Yine bitkiler, iklimlerin şekillenmesini sağlamakta, toprak erozyonunu önlemekte, ekosistemleri dengelemekte, sera etkisini azaltmakta ve çeşitli ham maddelerin kaynağını oluşturmaktadır (Gibson and Gibson 2007). Öte yandan bitkilerden elde edilen çeşitli ürünler ve bu ürünlerin kullanım alanları son yıllarda büyük bir artış göstermiştir. Bu maddeler zirai ilaçların (pestisit, herbisit, fungusit, gübre ve büyüme regülatörleri), gıda katkı maddelerinin (nutrasotikler, koruyucu ve lezzet verici baharatlar), çeşitli ilaçların (antibiyotikler, anti-inflamatuar ilaçlar ve hormonlar) ve kozmetik ürünlerin (krem bileşenleri, parfüm ve losyonlar) kaynağı olmuşlardır (Sampietro *et al.* 2009; Wink 2010). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO=World Health Organization) verilerine göre, gelişmekte olan ülkelerde bitkisel kaynaklı ilaçlar, nüfusun yaklaşık %80'inin sağlık ihtiyaçlarını karşılamada kullanılmaktadır (Jain and Saxena 2009; Arora 2010). Bitkiler tarafından bol miktarda oluşturulan, bitki protoplazmasının yapısına girmeyen, farklı sentez basamaklarına sahip olan biyoaktif fitokimyasallar ve antioksidan maddeler yukarıda bahsedilen ilaçların hammaddesi olarak kullanılmaktadır. Bu kimyasallar temel olarak primer ve sekonder metabolitler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (Kocaçalışkan 2010). Primer metabolitler; anabolik ve katabolik reaksiyonların yanı sıra bitki yapısına katılan ve yaşamsal faaliyetlerin sürdürülebilirliğini sağlayan temel bileşenlerdir. Öte yandan, geçmiş yıllara kadar atık ürünler ya da kullanılmayan maddeler olarak nitelendirilen sekonder metabolitler bitkinin belirli kısımlarında sentezlenen ve uzun

süre depo edilebilen, genellikle savunma amaçlı kullanılan metabolitlerdir (Hartmann 2007; Karlovsky 2008).

Sekonder metabolitler, sayıları 100 binlere ulaşmış azot içeren (alkoloidler, aminler, siyanojenik glikozitler, alkamidler, peptitler, protein olmayan aminoasitler ve glikosinolatlar) ve içermeyen (terpenler, poliketidler, fenolikler, saponinler ve poliasetlenler) bileşiklerdir. Bu bileşikler, bitkinin farklı doku ya da organlarında sentezlenebilirler (Facchini 2001). Bitkinin kuru ağırlığının %1-3'ünü oluşturan bu metabolitlerden hidrofilik olanlar hücrede kofullarda depolanırken, lipofilik olanlar ise; reçine kanallarında, latisiferlerde, tüylerde, yağ hücrelerinde veya kütikula tabakasında depo edilirler (Wink 2010). Hücre içinden ziyade, epidermal sistemlere yakın yerlerde depo edildikleri için geçmişte sekonder metabolitlerin atık ve fonksiyonel olmayan maddeler olduğu hakkında görüşler ileri sürülmüştür (Hartmann 2007). Ancak bu görüşler aşağıda verilen gözlemlere dayanılarak çürütülmüştür;

1) Atık maddeler, hetetrof canlılara karakteristik maddelerdir. Çünkü bu canlılar yapılarında buldukları besinleri enerji elde etmek için tamamıyla indirgeyemezler. Böylece azotça zengin atık maddeleri, boşaltım ürünü olarak vücutlarından dışarı atarlar. Oysaki bitkiler zorunlu ototrofturlar ve ayrıntılı boşaltım sistemlerine ihtiyaç duymazlar. Bitkiler için sınırlayıcı element olan azot, çeşitli sekonder metabolitlerin (örneğin alkoloidler) yapısında bulunur. Azotun özellikle yaşlı veya senesense uğrayan hücrelerde değil de genç ve aktif hücrelerde bulunması bu teoriyi kısmen çürütmektedir.

2) Sekonder metabolitler, atık maddeler gibi durağan değildir. Aksine bitkide hareket halinde olup gerektiği zaman metabolize olabilirler. Örneğin bazı Leguminaceae tohumlarında azımsanmayacak derecede azot taşıyan alkoloidler, siyanojenik glikozitler veya lektinler gibi sekonder metabolitlere rastlanmıştır. Bu bileşiklerdeki azotun, çimlenme esnasında metabolize edildiği gözlenmiştir.

3) Karmaşık bir yapıya sahip olan sekonder metabolitler, belirli bir dokuya spesifik düzenlenip ihtiyaç halinde bitkinin farklı kısımlarına taşınarak depolanabilme özelliğine sahiptirler (Wink 1983).

Son zamanlarda ikincil metabolitlerin üstlendikleri görevler daha iyi aydınlatılmıştır. Gerek içsel gerekse dışsal kaynaklı saldırılara karşı bütünlüklerini koruma amaçlı farklı stratejiler geliştiren bitkiler, sürekli olarak sentezleyip biriktirdikleri şaşırtıcı miktardaki bu metabolitleri ile savunma stratejilerinin temelini oluşturmaktadırlar.

Diğer organizmalarla karşılaştırıldıklarında bitkiler, stabil yaşamlarından dolayı dış tehditlere karşı birincil hedef durumundadırlar. Wink (2010)'in de belirttiği gibi bitkilerin aksine hayvanlar, karşılaştıkları dışsal saldırılara, avcılara karşı aktif hareket ederek kurtulurlar. Hayvanlar, kendilerini enfekte eden mikrop veya parazitlere karşı ise bir immün sistemi geliştirmişlerdir; ancak bu mekanizmalar bitkilerde görülmemektedir. Bitkilerde ise aktif olan rejenerasyon özelliği ve sınırsız büyüme bölgeleri, çeşitli nedenlerden dolayı bitkiden ayrılan parçaların yerine yenisinin eklenmesini kolaylaştırmıştır (Kocaçalışkan 2010). Bu durum tek başına yeterli olmayıp savunmaya yönelik bir olgu değildir. Bunun yerine, bitkiler bazı mekanik ve morfolojik koruma mekanizmalarıyla donatılmışlardır. Dikenler, çeşitli kimyasallarla dolu salgı tüyleri, delinemeyecek kadar sert olan kabukları hayvanlardaki savunma sistemlerine analog yapılar sayılabilir (Wink 2010). Bunların dışında bitkiler, ürettikleri metabolitlerle savunma sistemlerini güçlendirmişlerdir. Örneğin; sekonder metabolitlerden eterik yağlar ya da uçucu yağlar olarak bilinen esansiyel yağlar, bitkiler arasında sinyal bileşikleri olarak görev yapmalarının yanı sıra herbivorlara, bitki patojenlerine, virüslere ve hatta aynı ortamda yaşadıkları bitkilere karşı savunmada da görev yapabilirler. Genellikle Akdeniz ülkeleri ve tropik bölgelerde yetişen kokulu bitkilerden elde edilen esansiyel yağlar, başta Lamiaceae familyası olmak üzere Lauraceae, Apiaceae, Rutaceae, Euphorbiaceae, Rosaceae ve Asteraceae gibi bitki familyalarından elde edilmektedir (Franz and Novak 2009). Özellikle fenolik asitler ve terpenoid türevlerinin kuvvetli allelopatik etkiye sahip oldukları bilinmektedir (Chengxu *et al.* 2011). Bu familyalardan Lamiaceae familyası, barındırdığı *Salvia*,

*Origanum*, *Mentha*, *Nepeta*, *Calamintha*, *Lavandula*, *Sideritis*, *Melisa*, *Satureja*, *Thymus* gibi cinsleriyle esansiyel yağ içeriği bakımından zengin bir familyadır. Bu familyaya ait türlerden elde edilen uçucu yağlarla yapılan çalışmalar, elde edilen içeriklerin birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Örneğin; *Salvia* ve *Thymus* gibi cinslerin de içinde bulunduğu bazı bitkilerden elde edilen bileşenlerin antioksidan özelliğe sahip oldukları, süperoksit radikallerini süpürdükleri ve lipoksijenaz enzim aktivitesini inhibe ederek iltihaplanmaları önledikleri bildirilmiştir (Albano and Miguel 2011). *Salvia* cinsinin mantarlarda misel oluşumunu engellemek koşuluyla antifungal etkiye sahip olduğu (Alizadeh-Salteh *et al.* 2010), patojen ve yararlı bakteriler üzerine etkili olduğu ancak bu etkiyi farklı konsantrasyonlarda gösterdiği (Roldan *et al.* 2010) önceki çalışmalarda belirtilmiştir. Bu familyanın farklı türleriyle yapılan çalışmalarda türlerin çoğunun tohum çimlenmesini, büyüme ve gelişmeyi etkilemek koşuluyla allelopatik etkiye neden oldukları belirlenmiştir (Basile *et al.* 2011).

*Calamintha* cinsiyle yapılan çalışmalarda ise çeşitli ekstrelerin serbest oksijen radikallerini süpürmek koşuluyla antioksidan ve anti diyabetik aktivitelerinin olduğu bildirilmiştir (Monforte *et al.* 2012; Singh *et al.* 2012) *Calamintha*'nın da içinde bulunduğu farklı cinslerle yapılan antimikrobiyal çalışmalarda *Calamintha* cinsinin diğerlerine oranla daha az antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmış ve bu durum yağların diğer türlerde sinerjik etkilerine bağlanmıştır (Miladinovic *et al.* 2012). Yine bu cinsten elde edilen içeriklerin vücut ısısını düşürerek çeşitli sağlık sorunlarını giderdiği (Monforte *et al.* 2011), çeşitli hastalıkların tedavisini sağlayan lipoksijenaz enzim aktivitesini inhibe ettiği (Demirci vd 2011) bildirilmiştir.

Öte yandan *Mentha* cinsiyle yapılan çalışmalarda ise türden elde edilen ekstrelerin kanatlı böceklerle karşı etkili oldukları ve bazılarında toksisiteye neden oldukları (Khani and Asghari 2012; Kumar *et al.* 2012) uygun dozlarda bazı bitki zararlılarının kontrolünde kullanılabilecekleri (Motazedian *et al.* 2012), vücutta toksik etkiye sebep olan serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırdıkları bildirilmiştir (Ahmad *et al.* 2012a). *Amaranthus* cinsiyle yapılan diğer bir çalışmada *Mentha* cinsinin de bulunduğu

Lamiaceae familyasına ait bazı türlerin *Amaranthus* bitkisi üzerine allelopatik etkiye sahip olduğu ve biyoherbisit olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Cavalieri and Caporali 2010). *Origanum* ve *Mentha* cinslerine ait farklı türlerle yapılan bir diğer allelopati çalışmasında, bu türlerin uygulandıkları yabancı otlarla beraber pamuk ve domates bitkilerinin gelişimini inhibe ettikleri bildirilmiştir (Argyropoulos *et al.* 2008).

Mutlu vd (2010) *Nepeta* cinsinden elde ettikleri ve 10 farklı yabancı ota uyguladıkları uçucu yağların herbisidal özelliğe sahip olduklarını bildirmişlerdir. Benzer şekilde *Nepeta* cinsinden elde edilen farklı ekstraların antiglikasyon, fitotoksik, sitotoksik ve antimikrobiyal etkilere sahip oldukları yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır (Hussain *et al.* 2009). Bu cinsin sahip olduğu ekstraların ekonomik öneme sahip bazı tahıllar üzerinde allelopatik etkiye neden oldukları belirtilmiştir (Mutlu ve Atıcı 2009). Bu bileşenlerin aynı zamanda serbest oksijen radikallerini süpürücü ve antimikrobiyal oldukları (Emre vd 2011) bazı kanatlılara karşı kovucu etkiye sahip oldukları bilinmektedir (Birkett *et al.* 2011).

*Origanum* cinsiyle yapılan çalışmalarda, bu türlerin hem bazı tahıl ürünlerinin hem de yabancı otların çimlenmelerini ve gelişimlerini engellemek suretiyle allelopatik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Argyropoulos *et al.* 2008). Türker vd. (2008) içerisinde *Origanum* cinsinin de bulunduğu farklı türlerden elde ettikleri çeşitli ekstraların çimlenen mısır tohumlarının radikula ve plumula uzunluğunu etkilediği, kromozomal anormalliklere sebep olduklarını ve bitkisel hormonların miktarını etkilediklerini bildirmişlerdir. Yine aynı cinsten elde edilen karvakrol, timol ve karvon gibi bileşenlerin düşük konsantrasyonlarda bile inhibisyona neden oldukları ve allelopatik potansiyele sahip oldukları bildirilmiştir (Azirak ve Karaman 2008). *Coffea arabica* ile yapılan arazi çalışmalarında da *Origanum* cinsine ait türlerin bu bitkinin plagiotropik (yatay büyüme) gelişimini teşvik ettikleri görülmüştür (Bustos *et al.* 2008). Biyoherbisit olarak kullanımı önerilen *Origanum* cinsiyle yapılan laboratuvar ve arazi çalışmalarında bu bitkilerden elde edilen ekstraların kuvvetli allelopatik etkiye sahip oldukları belirtilmiştir (De Mastro *et al.* 2006).

*Satureja* cinsine ait türlerden elde edilen uçucu yağların allelopatik etkileri dört farklı tahıl ile iki farklı yabancı ot üzerinde denenmiştir. Sentetik herbisitlerle beraber uygulanan bu bileşenlerin tahıl ürünlerine daha az zarar verdikleri ve yabancı bitkilere karşı allelopatik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Grosso *et al.* 2010). Benzer bitkilerin yine uygulandıkları yabancı bitkilerde büyüme inhibitörü gibi etki gösterdikleri biber gibi bazı bitkilere ise pek fazla etki etmedikleri bildirilmiştir (Angelini *et al.* 2003). Domates bitkileriyle beraber yaşayan parazit bitki *Orobancha* (canavarotu)'ye karşı kullanılan ve *Satureja* cinsinin de dahil olduğu bitki ekstrelerinin, parazit bitkinin istilasını azalttığı belirtilmiştir (Qasem 2002). *Satureja* cinsinin aynı zamanda lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği (Öztürk 2012) antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip olduğu da önceki çalışmalarda belirlenmiştir (Giweli *et al.* 2012).

Bahsi geçen doğal bitki bileşenleri buldukları ortamdaki farklı popülasyonlara tehdit oluşturabilmektedirler. Özellikle sebep oldukları allelopatik etkiyle bitkilerin komşularını seçmelerinde büyük oranda etkilidirler. Çoğunlukla inhibitör etki yaratan bu bileşenlerin etki mekanizmaları tam olarak çalışılmamıştır. Bu etki fizyolojik, sitotoksik ya da genetiksel bir etki olabilir. Rekabete girdikleri canlıların DNA'sında meydana getirecekleri kalıtsal değişiklikler popülasyonların zayıflamasına hatta kaybına neden olabilir. Besin olarak tüketildiklerinde ise organizmada benzer olumsuz sonuçlar doğurabilirler. Farklı alanlarda kullanılan bu tür bitkilerin etki mekanizmalarının açıklanması dezavantajlarını avantaja dönüştürmeye yardımcı olabilir. Toksik etkilerinin belirlenmesiyle allelopatik etkilerinin mekanizması açıklanabileceği gibi ekstraksiyondan sonra çeşitli alanlarda (tarım, tıp, boya ve gıda sanayii gibi) güvenli kullanımları da sağlanmış olacaktır.

Verilen bilgilerden de anlaşılacağı gibi, bitkisel kaynaklı metabolitlerin geçmişten günümüze farklı amaçlarla kullanıldığı görülmektedir. Özellikle yaşamımızın hemen her alanına girmiş ve farklı biyolojik aktiviteye sahip esansiyel yağlar birçok bitkiye karşı allelopatik etki (Kobayashi *et al.* 2008; Mutlu ve Atici 2009) gösterirken bunun yanı sıra bazı organizmalara karşı da antioksidan (Güllüce vd 2007; Gkinis *et al.* 2010), antibakteriyel (Güllüce vd 2007; Shafaghat 2011), nemetidal (Ntalli *et al.* 2010) ve



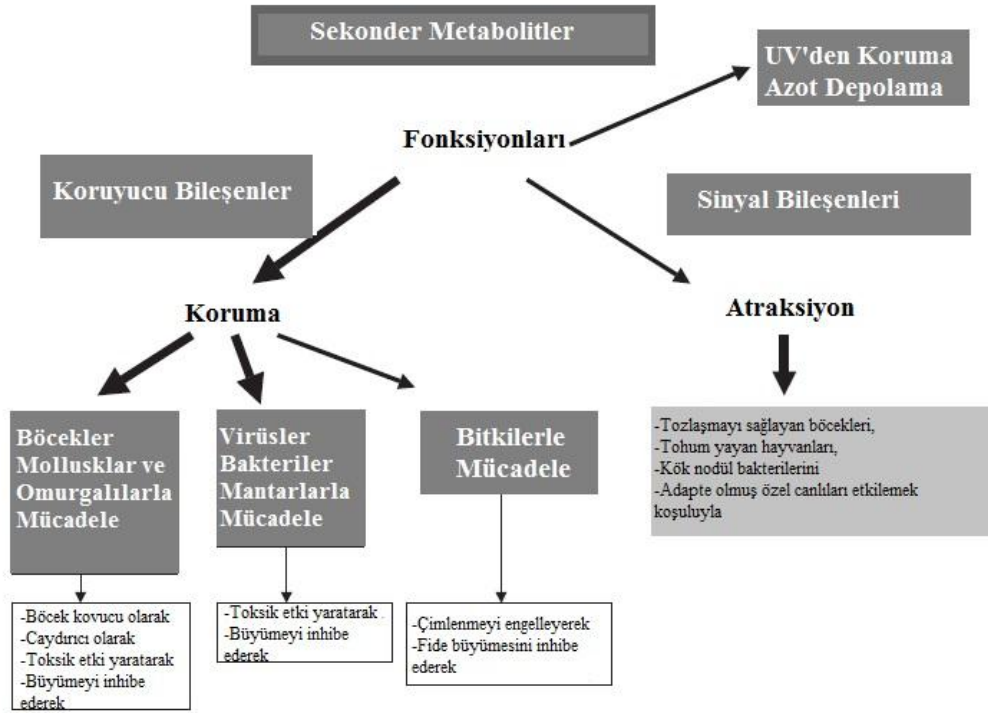
repellent (kovucu) (Kim *et al.* 2010) etki gösterebilmektedirler. Allelopatik çalışmalar dışında ölçülen biyolojik aktivitelerin belirlenmesi için prokaryotik canlılar kullanılmıştır. Bu canlılarda, genetik hasarı ve miktarını gözlemleyip ölçmek zor olacaktır. Ancak, morfolojik ölçümlere bakılarak değerlendirmeler yapılabilir. Model canlı olarak ökaryotik bitkilerin seçilmesi, toksik dozların miktarını belirlemenin yanı sıra, sitotoksiste, genotoksiste ve çeşitli fizyolojik parametrelerin ölçülmesini kolaylaştıracaktır. Birçok bitki familyasının üyelerinde bulunan ve allelopatik potansiyele sahip olan uçucu yağların genotoksik etkileriyle ilgili çalışmalar literatürde oldukça sınırlı sayıdadır.

Bu nedenle bu tezde, ülkemizde farklı bölgelerde yayılış gösteren Lamiaceae bitki familyasına ait *Calamintha nepeta* (L.) SAVI ssp. *glandulosa*, *Mentha longifolia* (L.) HUDSON (L.) HUDSON, *Nepeta nuda* L. ssp. *nuda* L., *Origanum rotundifolium* BOISS., *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* ve *Satureja hortensis* L. türlerinden elde edilen allelopatik potansiyele sahip esansiyel yağların mısır tohumları üzerine; çimlenme oranlarının ölçülmesiyle fenotipik, hücre bölünmeleri yüzdelerinin belirlenmesi, genomik kalıp stabilitesinin, polimorfizm oranlarının, genetik benzerlik oranlarının ölçümü ve çözünebilir protein ölçümüyle genetiksel etkilerinin ve bu genetiksel etkiler üzerine bitkisel hormonların rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Esansiyel Yağlar

Eterik yağlar ya da uçucu yağlar olarak bilinen esansiyel yağlar, bitkilerde tohum, meyve, çiçek, kök ve yaprak gibi kısımlardan hidrodistilasyon, soğukta sıkma, çözücü ekstraksiyonu ya da sıvılaştırılmış gazlarla ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen sekonder metabolitlerdir (Hussain 2009b). Bu metabolitlerin biyosentezi ise karbonhidrat, protein ve yağların bitkide metabolize olmaları suretiyle asetat veya şikimik asit yollarıyla gerçekleşir (Sampietro *et al.* 2009). Bu maddeler lipofilik maddeler olduğundan hücre zarından kolaylıkla geçebilirler ve sentezlendikleri bölgelerden bitkinin diğer organlarına floemle taşınırlar. Bitkide savunma aracı olarak kullanılan bu bileşikler, floemi hedef olarak seçen afid gibi parazit canlıları doğrudan etkilemek suretiyle bitkiyi koruyabilirler ya da taşıdıkları yaprak veya primer gövde kısımlarının heterotrof canlılar tarafından tüketilmesine karşı benzer şekilde koruma sağlayabilirler. Ancak bitkiler bu kimyasalları sadece bünyelerinde bulundurarak savunma yapmazlar. Yapraklardan ya da kökten salıverme yoluyla uçucu yağların eksüdasyonu sağlanabilir. Bir kısmı aromatik olan bu bileşenler Şekil 2.1'de belirtildiği gibi bir yandan çekici özellikleriyle hayvanları cezbederken diğer yandan yakınında bulunan bitkilere, köklerine yakın yaşayan bakterilere, mantarlara veya bitkilere karşı tehdit oluşturmak suretiyle kendilerini korurlar. Bu etki daha sonra bahsedilecek olan allelopatik etkidir. Genel olarak bitkilerde değişimlere neden olan ve esansiyel yağların da dahil olduğu sekonder metabolitlerin görevleri, etki ettikleri canlı grupları ve etki şekilleri aşağıda sunulmuştur.



**Şekil 2.1.** Bitki sekonder metabolitlerinin ekolojik ve fizyolojik fonksiyonları (Wink 2010'dan çevrilmiştir)

Kimyasal olarak esansiyel yağlar; terpenoidler ve aromatik bileşikler olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar (Dudai *et al.* 1999). Ancak içeriğin büyük bir kısmını terpen grubu kimyasallar oluşturmuştur. Terpenoidler taşıdıkları 5 karbonlu izopiren halkasına göre; monoterpenler ( $C_{10}$ ), sesquiterpenler ( $C_{15}$ ), diterpenler ( $C_{20}$ ), triterpenoidler ( $C_{30}$ ), karotenoidler ( $C_{40}$ ), quassinoidler, benzoksazinoidler ve glukozinolatlar olarak gruplandırılabilir (Hanson 2003; Macias *et al.* 2007).

### 2.1.1. Monoterpenler

Esansiyel yağların içeriğini oluşturan en yaygın uçucu bileşiklerdir. Genellikle kurak ya da yarı kurak bölgelerdeki aromatik bitkilerde bulunurlar. Bu bileşikler bazı bitki komünitelerinde allelopatik interaksiyonun sebebi olarak gösterilmişlerdir. Sinmetilin herbisidine yapısal olarak benzeyen 1,4- ve 1,8-sineol monoterpen olup bu bileşiklerin herbisit olarak kullanılabilmesi önceki çalışmalarda belirtilmiştir.

### **2.1.2. Sesquiterpenler**

Antibakteriyel, antifungal ve insektisidal gibi geniş ölçüde biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerdir. Acı bir tada sahip olmaları çeşitli canlılar tarafından besin olarak kullanılmalarını kısıtlamaktadır. Bu nedenle sesquiterpenler, buldukları bitkilerin istilacı olmalarını kolaylaştırmaktadır.

### **2.1.3. Diterpenler**

Büyüme inhibitörleri olup çoğunlukla allelopatik ajan olarak belirtilmemişlerdir. Bunların ekolojik rolleri daha çok insektisidal ve otçullara karşı caydırıcı olmalarıdır. Hormonların yapısına da katılırlar.

### **2.1.4. Quassinoidler**

Daha çok ilaç olarak kullanılırlar. Genellikle anti-kanser, antilosemik ve antimalarial olarak kullanılmışlardır.

### **2.1.5. Benzoksazinoidler**

Yabani ot kontrolünde kullanılan bir terpen grubu olup belirli bitki familyalarında (Gramineae Acanthaceae, Ranunculaceae ve Scrophulariaceae) bulunurlar.

### **2.1.6. Glukozinolatlar**

Brassicaceae, Resedaceae ve Capparidaceae familyalarında bulunan küçük bir savunma grubudur. İsektisitlere mikroorganizmalara ve özellikle kelebeklere karşı buldukları bitkileri korurlar.

### **2.1.7. Triterpenoidler**

Turunçgiller başta olmak üzere, tahıllarda, trugillerde bulunan triterpenoidler yiyeceklere tat ve koku verirler. Biyolojik aktiviteleri; tümör gelişimini tetikleyen steroidal hormonları etkisiz hale getirmek, hızlı bölünen hücrelerin bölünme hızını yavaşlatarak kansere karşı koruma sağlamak şeklinde sıralanabilir.

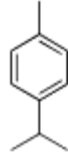
### **2.1.8. Karotenoidler**

Karotenoidler, çeşitli bitkilerde ve bazı mikroorganizmalarda bulunan bir pigmenttir. Karotenoidlerin pek çok fizyolojik işlevi vardır. Yapıları gereği serbest radikalleri etkili bir şekilde bertaraf ederler ve bağışıklık sistemini güçlendirirler.

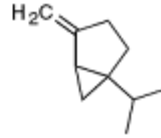
Esansiyel yağların yapısında en fazla bulunan bileşikler monoterpen ve sesquiterpenlerdir. Bunlardan bazıları Şekil 2.2'de sunulmuştur.

### Monoterpenler

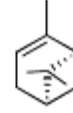
P-simen



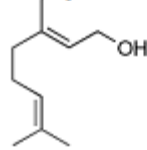
Sabinen



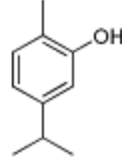
Alfa-pinen



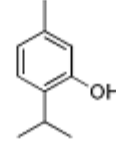
Geraniyol



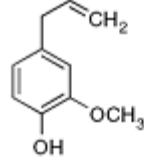
Karvakrol



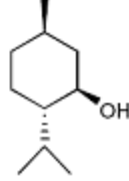
Timol



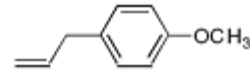
Ögenol



Mentol

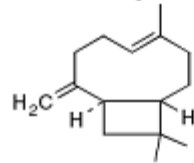


Estragol

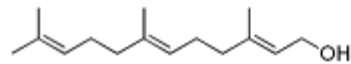


### Sesquiterpenler

Karyofilen



Famesol



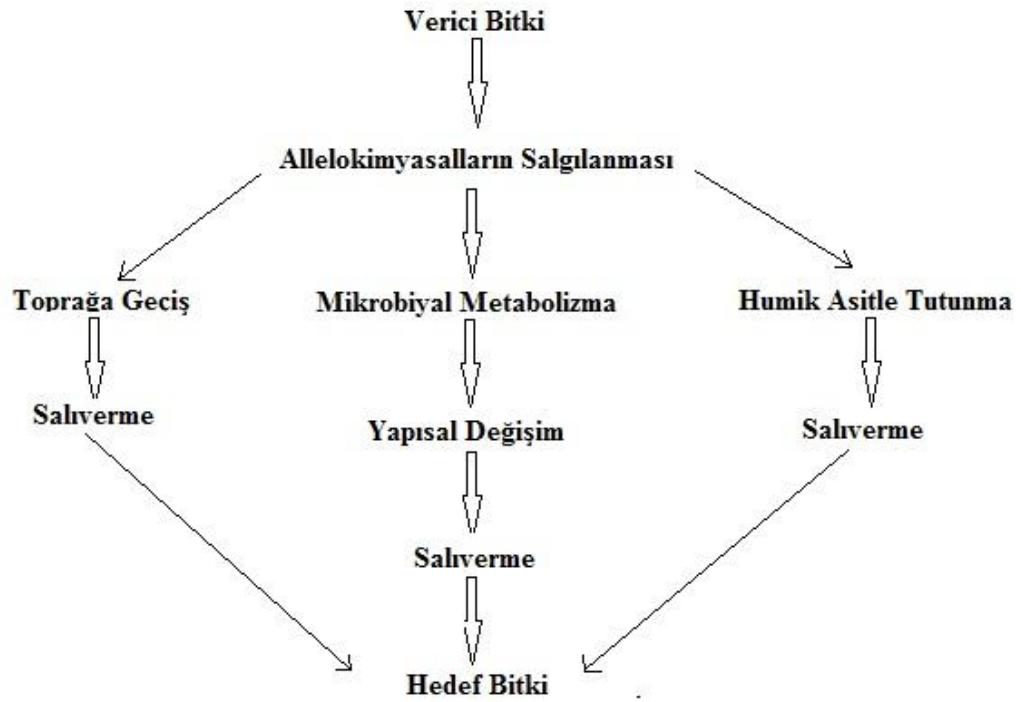
**Şekil 2.2.** Esansiyel yağlarda bulunan bazı majör bileşiklerin kimyasal yapısı (Hussain 2009a)

## 2.2. Allelopatik Etkileşim

Varlığı çok eski yıllara dayanan ancak ilk defa Molisch (1937) tarafından tanımlanan allelopatinin tanımı ve etki mekanizması, geçen yetmiş beş yıllık süreye rağmen hala tam anlamıyla aydınlatılabilmemiş değildir. Uluslararası Allelopati Topluluğu (International Allelopathy Society =IAS) allelopatiyi; bitki, alg, bakteri veya mantarlar

tarafından sentezlenen sekonder metabolitlerin tarımsal ve biyolojik sistemlerin gelişimini etkilemesi olarak tanımlanmıştır (Macias *et al.* 2007). Ancak daha basit anlamda bitki-bitki ya da bitki ile çevresindeki organizmalar arasındaki kimyasal etkileşime allelopati denilebilir (Kocaçalışkan 2010). Allelopatik etki, bitkinin sentezlediği allelokimyasalların aynı ortamda yaşayan bitki ya da organizmalar tarafından alınarak olumlu veya olumsuz bir şekilde etki bırakmak suretiyle meydana gelir (Kocaçalışkan 2010). Allelokimyasallar; kimi bitkiler için toksik olup bitkide inhibisyona, strese hatta ölüme bile neden olabilirler. Aynı allelokimyasallar diğer bir bitkide ise olumlu etki göstererek büyüme ve gelişmeyi düzenleyebilirler (Şekil 2.1). Bu etki aynı zamanda kimyasalların bitki ile etkileşim süresine ve dozuna bağlı olarak değişebilir. Bu bağlamda, Paracelsus'un "Bütün maddeler zehirdir, zehirle devayı birbirinden ayıran dozdur" sözü allelopatik etkileşimin doza bağlı olarak meydana geleceği gerçeğini savunmaktadır.

Allelokimyasallar hemen her ortamda etki gösterebilmektedirler. Sulak ortamlarda difüzyon ile hedef bitkiye ulaşırken, karada ise kök sistemiyle hedef bitkiye alınmaktadır. Bitkide sentezlenip floemle taşınan allelokimyasalların salınımı gerçekleştikten sonra toprakta ilerleyerek hedef bitkiye ulaşmalarıyla allelopatik aktivite gösterebilirler. Bu kimyasalların hedef bitkiye ulaşmalarının bir diğer yolu; sentezlendikleri bitki yapraklarının çürüyüp toprağa karışması veya atmosfere salınan gaz halindeki formlarının yağmur ile toprağa karışması şeklinde olabilir (Inderjit and Weiner 200; Erez 2009). Kocaçalışkan (2010)'a göre allelokimyasallar verici bitkiden hedef bitkiye 3 farklı yolla ulaşabilir. Bu etkileşimi ise Şekil 2.3'teki gibi açıklamıştır.



**Şekil 2.3.** Allelokimyasalların verici bitkiden hedef bitkiye taşınma yolları (Kocaçalışkan 2010)

Allelopatik ajanlar hedef bitkiye nüfuz ettikten sonra; a) hücre bölünmesi b) hormonal gelişim c) membran geçirgenliği d) mineral alımı e) topraktaki potasyum (K) ve fosfat (P)'ın kullanılabilirliği f) stomaların açılması ve fotosentez g) solunum h) protein sentezi ile lipit ve organik asit metabolizmasının değişimi i) porfirin halkalarının sentezinin durdurulması j) enzim inhibisyonu veya stimülasyonu k) ksilem elemanlarının tıkanması ve gövdeden suyun geçişi gibi fizyolojik olayları etkileyebilirler (Rice 1985; Seigler 1996; Kocaçalışkan 2010).

Yukarıda belirtilen fizyolojik değişimlerin belirlenebilmesi için verici ve hedef bitki hakkında bilgi sahibi olmak gerekir. Aynı zamanda allelokimyasalın yapısının bilinmesi, sebep olduğu morfolojik, sitolojik ve genetik değişimleri açıklamayı kolaylaştıracaktır. Örneğin anormal kök gelişimi, inhibitör maddenin mikrotübül oluşumunu engellediğini göstermektedir. Lateral kök gelişimi veya primer kökün zarar görmesi hormonal dengenin bozulduğunu ifade eder. Kök ve gövde uzunluğundaki farklılıklar, bitki gelişimin primer düzeyde etkilendiğini gösterir. Bu etkiler salınan



allelokimyasalın etki mekanizması ve biyolojik etkisine bağlı olduğu kadar, hedef bitkinin tolerans durumuna da bağlıdır (Erez 2009). Ya da, lipofilik (esansiyel yağlar gibi) veya amfifilik allelokimyasallar hücre membranını etkileyebilirler. Özellikle terpenoidler, fosfolipid ve kolesterol tarafından oluşturulan lipofilik öz ile etkileşime girerler. Bu etkileşim sonucunda hücre membranında geçici porlar açabilir veya membranın çözülmesine sebep olabilirler. Böylece hücre zarının permeabilitesini artırıp ekzojen kaynaklı maddelere açık hale getirebilirler (Wink 2010). Öte yandan metabolik ve yapısal olaylar, hücre bölünmesi, gen regülasyonu ve iletişimde çok önemli yere sahip olan proteinler, allelokimyasallarla kolaylıkla etkileşebilirler. Bu etkileşim sonucunda proteinin konformasyonu kolaylıkla aktif veya inaktif hale gelebilir. Allelokimyasallar, bu etkiyi sahip oldukları reaktif fonksiyonel gruplarıyla proteinlere kovalent bağlanarak gerçekleştirebilirler. Bazı durumlarda da monoterpenler ve sesquiterpenlerde olduğu gibi, allelokimyasalların mitokondriyal solunumu inhibe ederek hedef canlıda hasarlar meydana getirdikleri bilinmektedir (Wink and Latzbruning 1995; Duke and Oliva 2004). Yapılan çalışmalarda allelokimyasalların bitkinin membran geçirgenliğini artırdığı, makro ve mikro besin elementleri alımını ve düşük pH değerlerinde K<sup>+</sup> alımını engellediği, bitki büyümesini sağlayan İndol asetik asit (IAA)'i bloke eden IAA-oksidadı teşvik ederek gelişmeyi önlediği belirlenmiştir (Lenoir *et al.* 1983). Sahip oldukları bu nitelikler; bitkileri, dışsal olumsuz faktörlere karşı büyük ölçüde koruma sağlayabilir, istilacı karakterler kazandırabilir buna bağlı olarak süksesyona sebep olabilirler. Genellikle toksik özellikleri kullanılarak çeşitli alanlarda yaşamımıza dahil olan bu bitkilerin biyoherbisit olarak kullanımları da son zamanlarda gündeme gelmiştir (Özdemir 2007). Ancak sentetik herbisitlerin sebep olduğu gibi kalıcı hasarlarla karşılaşmamak için bu amaçla kullanılacak allelopatik etkiye sahip kimyasalların etki mekanizmalarının araştırılıp açılığa kavuşturulması gerekmektedir.

Birçok bitki türünün toksik özelliklerinin insanlar tarafından tarihin çok eski devirlerinden beri bilindiği ve bu özelliklerinin çeşitli amaçlarla kullanıldığı birçok tarihi belgede kayıtlıdır. Örneğin; Afrika yerlilerinin *Strophantus hispidus* ve *Sprophantus kombe* bitki tohumlarını ok zehiri olarak düşmanlarına karşı kullandıkları;

eski Yunanların baldıran bitkisini (konin alkaloidi içerir) resmi zehirleyici madde olarak kullandıkları belirlenmiştir. Yine besin olarak kullanılan bazı bitkilerin çok az miktarda içerdikleri toksik bileşenlerin, duyarlı canlılarda zehirlenmeye neden olduğu (*Vicia faba* ile görülen favizm gibi), bitkilerin coğrafi dağılım nedeni ile topraktaki toksik maddeleri akümüle edip, bu maddelerin farklı canlılara geçişinde köprü rolü oynadıkları (selenyumlu topraklarda yetişen bitkilerle görülen zehirlenmeler) bilinmektedir (Vural 1996). Bu durum gelişigüzel kullanımların yaratacağı olumsuzlukları kavramak açısından önemlidir. Her ne kadar herbisit, insektisit ve fungusit gibi ekolojik rollere sahip oldukları düşünülen bu allelokimyasallara karşı insanoğlunun ilgisi, sentetik pestisitlerin olumsuz etkilerine bağlı olarak artmışsa da (Sampietro *et al.* 2009) özellikle bu tür bitkilerden elde edilen bu doğal bileşiklerin etki ettiği organizmanın genetik yapısında nasıl bir hasar meydana getirdikleri tam olarak bilinmemektedir.

Bu biyoaktif bileşenlerin güvenli kullanımı, toksik etkilerinin karakterizasyonu ile mümkündür. Çünkü yüksek dozlarda hücresel seviyede genellikle toksiktirler. Ancak bazı canlı hücrelerde düşük dozlarda kullanımları hücrelere pozitif yönde bir biyolojik aktivite kazandırabilir (Soberón *et al.* 2010).

### **2.3. Lamiaceae Bitki Familyası**

Dünyada 200 cins 3200 türle ifade edilen Lamiaceae (labiate= ballıbabagiller veya dudaklılar) familyası hemen her habitatta ve yükseklikte yetişebilen bitkilerdir. Çoğu tek ya da çok yıllık otsu bitki olan familyanın üyeleri genellikle salgılı ve tüylüdürler. Salgılarının büyük çoğunluğunu monoterpenler, diterpenler ve sesquiterpenler oluşturur. Atraktif ve hoş kokulu çiçeklerinden dolayı ornamental olarak yetiştirilebilirler. Bunun yanı sıra tıp, eczacılık, parfümeri, sabun deterjan sanayiinde esansiyel yağlarından faydalanılır. Ülkemizde bazı türleri çay olarak da tüketilmektedir (Davis 1988; Yıldız ve Aktoklu 2010). Çalışmada kullanılan türlere ait resimler Şekil 2.4'te sunulmuştur.

Lamiaceae familyasının sistematiki aşağıdaki gibidir.

<b>Alem</b>	: Plantae
<b>Bölüm</b>	: Magnoliophyta
<b>Sınıf</b>	: Magnoliopsida
<b>Altsınıf</b>	: Asteridae
<b>Takım</b>	: Lamiales
<b>Familya</b>	: Lamiaceae (Labiata)

### 2.3.1. *Calamintha nepeta* (L.) SAVI ssp. *glandulosa*

Ülkemizde genellikle Karadeniz bölgesi ve Batı Anadolu'da yetişen *C. nepeta* çok yıllık otsu bitki olup genellikle Haziran-Eylül ayları arasında çiçeklenir. Ortalama yaşam süresi 3-4 yıl olan bitki çoğunlukla doğal olarak yetişir. Bitki fungal bir hastalık olan küllenme hastalığına sıkça maruz kalır.

Bu türle ilgili günümüze kadar yapılan çalışmalar, esansiyel yağlarının içeriğini belirlemeye yönelik olmuştur. Çalışmaların bir kısmı ise biyolojik aktivitelerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Mastelic ve arkadaşlarının (1998) yapmış oldukları çalışma türle ilgili ilk yayınlardanır. Aglikon (glikozitlerin tüvelendiği bileşik) içeriğini belirlemek için yaptıkları çalışmada toplamda %91'lik uçucu yağ verimi elde etmişlerdir. Aglikon miktarını ise 8,1 mg/kg olarak belirlemişlerdir. Daha sonra Flamini et al. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada da elde edilen uçucu yağların, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella veneziana*, *S. paratyphi B*, *S. typhimurium*, *Fusarium moniliforme*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* ve *Pyricularia oryzae* türlerinde antimikrobiyal etki yarattığı görülmüştür. Ancak, aynı çalışmada saf olarak elde edilen pulegon bileşiminin ise özellikle *Salmonella* cinsleri üzerine kuvvetli antimikrobiyal olduğu gözlenmiştir. Başka bir çalışmada yine elde edilen yağlar Gaz Kromatografi Kütle Spektrometresi (GC-MS) ile analiz edilip farklı bakteriler (*Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas aeruginosa*) üzerinde antimikrobiyal özellikleri test

edilmiş olup, mikroorganizmaların bu yağlara karşı hassas oldukları gözlenmiştir (Kitic *et al.* 2005). İtalya ve Portekiz'den toplanan bitkilerin uçucu yağları ise *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* ve *Aspergillus flavus* mantarlarında denenmiştir. Monoterpen olan pulegon açısından zengin olan İtalya örneklerinin kuvvetli antifungal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Marongiu *et al.* 2010). Başka bir çalışmada ise iltihaplı hastalık durumunda ortaya çıkan serbest radikaller ve demir içeren lipoksigenaz enzimine karşı kullanılan uçucu yağların serbest oksijen radikallerini süpürücü özelliği gözlenmezken, lipoksigenaz enzimini önemli ölçüde inhibisyona uğrattıkları ve uçucu yağ içeriğinin büyük bir kısmının oksijenli monoterpen olan pulegon olduğu belirtilmiştir (Demirci *et al.* 2011). Filomena *et al.* (2012)'in yaptığı çalışmada yine aynı türe ait uçucu yağların kuvvetli antioksidan oldukları belirlenmiştir.

### **2.3.2. *Mentha longifolia* (L.) HUDSON (L.) HUDSON**

Çok yıllık otsu bir bitki olan ve halk dilinde nane olarak da bilinen *M. longifolia* ülkemizde genellikle bataklık ve sulak alanlarda bulunmaktadır. Bol mentol içerdiklerinden keskin kokusu olan bu tür, genellikle ilaç besin ve şeker sanayiinde kullanılmaktadır (Yıldız ve Aktoklu 2010).

Bu türün sahip olduğu biyolojik aktiviteler ile ilgili literatürde birçok çalışma mevcuttur. Örneğin; Amzazi *et al.* (2003) yapmış oldukları çalışmada *M. longifolia*'nın farklı ekstrelerinin HIV-1 (human immunodeficiency virus type I)'e karşı %40 ila %55 arasında inhibisyon yarattığını gözlemişlerdir. Yine başka bir çalışmada da bakterisidal olan nitrofurantoinin *M. longifolia*'nın seyreltilmiş ekstreleriyle beraber *Enterobacteriaceae*'ye uygulandığında, bu maddenin minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MIC) değerini azalttığı gözlenmiştir (Shahverdi *et al.* 2004). Türker ve arkadaşlarının (2008) bildirdiğine göre, *M. longifolia*'dan elde edilen metanol

ekstreleri; *Zea mays L.* tohumlarının kök ve gövde uzunluğunun yanı sıra, bitkisel hormonları ile şeker düzeylerini etkileyip kromozomal anormalliklere neden olmuştur.

Ödeyemi *et al.* (2008) ise çalışmalarında bu türden elde edilen ekstrelerin; mısır dahil depo edilen tahıllara karşı zararlı etkisi olan *Sitophilus zeamais*'e karşı uygulama zamanı ve artan doza bağlı olarak kuvvetli insektisidal oldukları hatta böceğin ölümüne neden oldukları vurgulamışlardır. Aynı çalışma grubu farelerde yapmış oldukları deney sonucuna göre, bu türün uçucu yağlarının artan dozlara bağlı olarak vücut ağırlığı başta olmak üzere organ ağırlığını azaltırken, bazı kan hücrelerinin miktarının ise artışına neden olduğunu gözlemleyip bu sonucu *M. longifolia*'nın uçucu yağlarının uygulanan dozlarda güvenli olmadığı ile ilişkilendirmişlerdir. Bunun yanı sıra yapılan çalışmalar türün antioksidan ve antimikrobiyal etki gösterdiğini de belirtilmiştir (Güllüce vd 2007; Hajlaoui *et al.* 2009; Bhatti *et al.* 2010). Barış vd. (2011) *M. longifolia*'dan elde ettikleri flavonoidlerin, farklı test sistemleri kullanarak, uyguladıkları mikroorganizmalarda antimutajenik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Tür ile ilgili yapılan fitotoksik bir çalışmada ise ekstrelerin uygulandığı bitkinin kök ve gövde büyümesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Khan *et al.* 2011).

### 2.3.3. *Nepeta nuda L. ssp. nuda L.*

Çok yıllık otsu bir bitki olan *N. nuda*, genellikle kayalık ve yamaçlarda yabani olarak yetişmektedir. Terletici özelliğinden dolayı çay olarak tüketilmektedir. Sedatif etkilerinden dolayı insanlar tarafından kullanılan tür halk arasında “kedi nanesi” olarak da bilinmektedir.

Yüksek oranda ağrı kesici etkisi olan iridoid glikozit karakterindeki nepetalakton içerirler. Uyguladıkları bitki tohumlarında fizyolojik ve genotoksik hasarlar oluşturdukları belirlenmiştir (Kokdil *et al.* 1999). Alim vd. (2009) yapmış oldukları çalışmada *N. nuda* uçucu yağlarının *Klebsiella pneumoniae* ve *Salmonella typhi* bakterilerine karşı antibakteriyel etki gösterdiklerini ancak zayıf antioksidan içerikler olduklarını tespit etmişlerdir. Elde ettikleri uçucu yağları *Raphanus sativus L.* ve

*Lepidium sativum* L. türlerine uygulayan Mancini *et al.* (2009), uyguladıkları içeriklerin hedef bitkinin kök ve gövde uzamasını engellediğini tespit etmişlerdir.

#### **2.3.4. *Origanum rotundifolium* BOISS.**

Çok yıllık, yarı çalı formunda bulunan bitkilerdir. Kalkerli ya da kalkerli olmayan kayalar ve yamaçlarda doğal olarak yetişir. Mercanköşk olarak bilinen *Origanum* cinsinin ülkemizde bulunan 19 türünden biridir. Uçucu yağları genelde kekik olarak bilinir ve tüketilir (Yıldız ve Aktoklu 2010).

Türle ilgili literatürde çok az çalışma bulunmaktadır. Göze vd. (2009) bu türden elde ettikleri uçucu yağların antioksidan etkilerini araştırmışlardır. Dört farklı test kullanarak yapmış oldukları çalışmada ekstrelerin antioksidan etkilerini varlığını belirlemişlerdir. Çetin vd. (2011) yine bu türden elde edilen uçucu yağların bakteri, maya ve küflere karşı inhibe edici etki gösterdiklerini vurgulamışlardır. Aynı türün, çeşitli bitki patojenlerine karşı kuvvetli antibakteriyal etkileri tespit edilmiştir (Dikbas vd 2010; Dadaşoğlu vd 2011). Bir başka çalışmada da türden elde edilen esansiyel yağların buğday biti böceğinin ergin bireylerine karşı etkili olduğu belirtilmiştir (Yıldırım vd 2011).

#### **2.3.5. *Origanum vulgare* L. ssp vulgare**

Çok yıllık otsu bitkilerdir. Genellikle kuru topraklarda kayalık ve yamaçlarda yetişirler. Aromatik ve kısmi acı tatlarından dolayı baharat olarak kullanılırlar. Kimyasal içerikleri ise mevsimsel ve coğrafik şartlara göre değişkenlik gösterebilir.

Lamiaceae bitki familyası türlerinden bilimsel araştırmalarda en fazla adı geçen tür *O. vulgare*'dir. Türker vd. (2008)'ne göre *O. vulgare* bitkisinden elde edilen bitki özütleri mısır tohumlarının çimlenmesini etkileyerek kök ve gövde boyunda değişiklikler meydana getirmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda aynı bitkinin, çimlenen mısır tohumlarının hormon ve şeker miktarında da değişimler meydana getirdiği gözlenmiştir.

Yine bitki-bitki interaksiyonunu belirlemek üzere domates ve pamuk bitkisinde yabancı ot mücadelesi için kullanılan, *O. vulgare*'nin esansiyel yağlarının, hem domates ve pamuk hem de yabancı ot gelişimini etkilediği ortaya çıkmıştır (Argyropoulos *et al.* 2008). Yine *O. vulgare*'nin *Coffea arabica* bitkisinin büyümesini stimüle ettiği önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Can Başer 2008). Aynı türe ait uçucu yağların antifungal (Khosravi *et al.* 2011; Chaves-Lopez *et al.* 2012), antioksidan ve antimikrobiyal (Kürsat vd 2011; de Azeredo *et al.* 2012) oldukları literatürde bildirilmiştir.

### 2.3.6. *Satureja hortensis* L.

Tek yıllık otsu bitkiler olup, kayalık ve aşınmış yamaçlarda bulunurlar. Sos yapımında ve çay olarak tüketilebilirler.

*S. hortensis* bitkisinin esansiyel yağlarının *Aspergillus parasiticus* türevli AFB<sub>1</sub> ve AFG<sub>1</sub> oluşumunu engellediği öne sürülmüştür. Bunun yanı sıra bazı mantarların da gelişimini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Razzaghi-Abyaneh *et al.* 2008). Boyraz vd. (2006) *S. hortensis*'in uçucu yağlarının antifungal etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Benzer çalışmalar Yazıcı vd. (2011) tarafından da gerçekleştirilmiştir. Maruz kalma süresi ve dozuna bağlı olarak aynı içeriklerin kovucu etkiye sahip oldukları vurgulanmıştır (Maedeh *et al.* 2011). Bu türle yapılan bir diğer çalışmada Kotan vd. (2012) bu türe ait esansiyel yağların bakteri suşlarının yağ asidi kompozisyonunda değişimler meydana getirdiğini ifade etmişlerdir.

Literatürde farklı türlere ait esansiyel yağların allelopatik etkilerine rastlamak da mümkündür. Örneğin; *Aster lanceolatus*'un çiçeklerinden elde edilen esansiyel yağların *Lactuca sativa*'nın çimlenme ve büyümesini inhibe ettiği öne sürülmüştür (Dias *et al.* 2009). Oksijenik terpenoid olan karveol, karvon, menton, karvil asetat ve sedrol bileşiklerinin uygulandıkları *Echinochloa crus-galli* bitkisinin kök uzunluğunu ve büyümesini inhibe ettiği ve kuru ağırlığında azalmalara neden olarak, enzim aktivitesini düşürdüğü belirtilmiştir (He *et al.* 2009). Arpa buğday ve ayçiçeğine *Nepeta meyeri*'den ekstre edilip uygulanan bileşenler, ayçiçeği, kanola ve arpada toksik etki gösterirken,

özellikle düşük konsantrasyonlarda buğday gelişimini artırıcı etki göstermiştir (Mutlu ve Atici 2009). Yine çeşitli bitkilerden elde edilen esansiyel yağların, *Xanthium strumarium* L., *Avena sterilis* L., ve *Phalaris brachystachys* L.'ye laboratuvar koşullarında uygulanmış, artan doza bağlı olarak bitki gelişimini inhibe ettiğini belirtmişlerdir (Uremis *et al.* 2009). Benzer çalışma Verdeguer *et al.* (2009) tarafından yapılmış ve özellikle sesquiterpen içeriği bol olan esansiyel yağların daha fazla inhibisyona neden oldukları belirtilmiştir. Cavalieri vd. (2010) *Cinnamomum zeylanicum* L., *Lavandula* spp. ve *Mentha x piperita* L. uçucu yağlarını yedi farklı yabancı ota uygulayıp inhibitör etkilerini rapor etmişlerdir ve bu bileşenlerin herbisit olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Çoğunluğunu monoterpenlerin oluşturduğu uçucu yağları *Raphanus sativus* L. ve *Lepidium sativum* L. bitkilerine uygulayan De martino *et al.* (2010) uçucu yağların genelde inhibitör etki gösterdiğini ve *Raphanus sativus* L.'nin diğer türe göre daha hassas olduğunu belirtmişlerdir. Grosso *et al.* (2010) yapmış oldukları geniş kapsamlı çalışmada, *Coriandrum sativum* L., *Satureja montana* L., *Santolina chamaecyparissus* L., ve *Thymus vulgaris* L. 'den elde ettikleri uçucu yağları, mısır, buğday, bezelye ve marul bitkileriyle beraber iki yabancı ot üzerinde denemişlerdir. Kontrol amaçlı olarak da iki ayrı sentetik herbisit kullanan grup, *Thymus* ve *Satureja* uçucu yağlarının sentetik herbisitlere alternatif olduğunu belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada da, 1,8-sineol uçucu yağının uygulandığı *Lactuca sativa* bitkisinde doza bağlı inhibisyon yarattığı tespit edilmiştir (Qiu *et al.* 2010).

Bitki sekonder metabolitlerinin benzer etkileri çoğunlukla çalışılmış olup fizyolojik, sitolojik ve genetiksel etkileriyle ilgili bilgi literatürde sınırlı sayıdadır.





**Şekil 2.4.** Kullanılan Bitkiler

(A=*Calamintha nepeta* (L.) SAVI ssp. glandulosa, B=*Mentha longifolia* (L.) HUDSON (L.) HUDSON, C=*Nepeta nuda* L. ssp. nuda L., D=*Origanum rotundifolium* BOISS., E=*Origanum vulgare* L. ssp vulgare ve F=*Satureja hortensis* L. wikipedia'dan)

**2.4. Genotoksisite**

Bitkiler, maruz kaldıkları DNA replikasyon hatalarına, spontan kimyasal değişimlere ve çevresel kaynaklı genotoksik ajanlara karşı bütünlüklerini korumak zorundadırlar. Bunlardan DNA replikasyon hataları ve spontan kimyasal değişimler, çeşitli DNA tamir

mekanizmalarıyla onarılırken; farklı periyotlarda ekzojen kaynaklı ajanların etkisiyle oluşan ve tamir mekanizmalarından sıyrılabilen lezyonlar, DNA sentezinin sekteye uğramasına ve hatta replikasyon mekanizmasının bloke olmasına neden olabilirler (Lindahl and Wood 1999). Bahsedilen şekilde organizmaya kimyasal, biyokimyasal ya da genetiksel nitelikte zarar vererek organizmanın genomunda değişiklik meydana getiren her türlü maddeye “zehir” ya da “toksin” bu maddeleri inceleyen bilim dalına ise “toksikoloji” veya “zehir bilimi” denmektedir (Vural 2005). Kabaca yapılan bu tanım günümüzde “modern toksikoloji”nin tanımını belirlemede yetersiz kalmıştır. Bundan dolayı toksik maddelerin kaynaklarının, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin, organizmada uğradığı değişimin ve etki mekanizmalarının, zehirlenmelerin tedavilerinin, zehirlerin izolasyonunun, nitelik ve nicelik olarak analizlerinin, toksik maddelerin güvenli kullanımının, risk analizlerinin, standardizasyonlarının yapılması ve bunun yanı sıra toksik dozların belirlenmesi modern toksikolojinin uğraş alanı içine girmektedir (Vural 2000).

Toksik ajanların DNA molekülleri ile etkileşmesi sonucu ortaya çıkan ve gelecek nesillere taşınan toksisite “genotoksisite” olarak tanımlanır. Genotoksik etki metillenmeyle ya da ajanların direkt olarak mutasyona sebep olmasıyla gerçekleşebilir. Bu etkinin organizmadaki mekanizmasını ve mutajenlerin neden olabileceği riskleri araştıran bilim dalına ise Genotoksikoloji denir (Güley ve Vural 1975).

#### **2.4.1. Mutasyon**

Mutasyon; bir gen veya kromozomun yapısal olarak değişmesi işlemiyle, bu sürecin beraberinde getirdiği değişiklikler ya da hasarlar olarak tanımlanabilir. Mutasyonların sebep olduğu değişimler DNA tamir mekanizmalarıyla düzeltilemezse, meydana geldiği gen veya kromozoma farklı ve kalıtsal bir form kazandırabilirler (Stansfield *et al.* 1996; Tamarin 1999). DNA’da oluşan mutasyonlar gen düzeyinde (gen mutasyonları veya nokta mutasyonları) veya kromozom düzeyinde (sayısal ve yapısal aberasyonlar) olabilirler. Mutasyonlar, spontan meydana gelebilecekleri gibi ekzojen kimyasallar (çevresel ajanlar, besin içerikleri vb.) veya endojen metabolik süreçler sonucunda

oluşabilirler. Mutasyona sebep olan maddelere mutajen denir. Kimyasal mutajenlerin bazıları, gerek insanlar gerekse hayvanlar tarafından tüketilen bitkisel besinlerin bileşimindeki doğal besin toksinleridir (Vural 2005). Mutajen sayılabilecek bazı bitki toksinleri ise şunlardır;

Siyanojenik glikozitler	Biyojen aminler
Fitohemaglutininler (lektinler)	Kafein ve teofilin
Proteaz inhibitörleri	Erusik asit
Latirojenler	Safrol ve derivatifleri
Favizm etkenli ögeler	Karotatoksin
Guvatrojenler	Pirolizidin alkaloidleri
Glisirizin	Metal bağlayıcılar
Saponinler	Antivitamin faktörlerdir(Ayaz ve Yurttagül 2008).
Solanin	
Gosipol	
Miristisin	

#### 2.4.2. Metilasyon

Metilasyon ya da metillenme tanım olarak bir bileşiğe metil grubunun bağlanması anlamına gelir. Metilasyon DNA veya histon proteinlerinde meydana gelebilir. DNA'da genellikle CpG (Sitozin fosfat Guanin) bölgelerinde meydana gelen metilasyon, DNA metil transferaz enziminin, sitozin halkasına (5 nolu Karbona) metil grubu eklemesi suretiyle meydana gelir. Metillenen sitozin halkası 5 metil sitozin haline gelip ( $5^mC$ ) bulunduğu genin ifadesini düşürebilir. Meydana gelen değişimler kalıtsal olarak mutasyonlar gibi genetiksel bir değişim söz konusu olmaz (Tollefsbol 2004). Metilasyona, metabolik olaylar sonucu oluşan bileşikler veya çevresel ajanlar neden olabilir. Etkisini ise belli kromozomları veya genleri inaktive ederek gösterir.

## 2.5. Sitotoksisite

Sitotoksisite; toksik kimyasalların, hücrenin temel fonksiyonlarında meydana getirdiği hasar veya değişim olarak tanımlanabilir. Sitoloji ve genetik bilimlerinin ortaklaşa çalışmaları sonucu sitotoksisiteyi konu alan sitogenetik bilimi doğmuştur. Bu bilimin gelişmesi kromozom boyama metotlarının ve kromozom analiz metotlarının gelişmesiyle sıkı bir ilişki göstermiştir (Topaktaş ve Rencüzoğulları 2010). DNA hasarlarına veya hücrede apoptotik ve nekrotik etkiye sebep olan tehditlerin kısa sürede ölçülmesi sitotoksisite testleri tarafından gerçekleştirilir. Bu test sistemleri farklılıklar gösterebilir. Ancak hepsinin çalışma prensibi, hücresel metabolik aktivite, membran bütünlüğü ve direkt hücre sayısı ölçümü olmak üzere üç temel parametrenin ölçülmesine dayanır (Eisenbrand *et al.* 2002).

## 2.6. Allelopatik Potansiyelin Belirlenmesi İçin Gerekli Olan Biyoteknolojik Yöntemler

Biyoteknolojik yöntemler, organizmadaki değişim ve farklılaşmaları belirlemek amacıyla bir dizi teknik kullanılarak hücresel veya moleküler düzeyde yapılan tüm çalışmaları kapsar. Hücresel metodlar; bölünmeyi, hücre komponentlerinin değişimi ve hücresel deformasyonları belirlemede kullanılırken; moleküler yöntemler, organizmadaki herhangi bir gen bölgesi ya da bu bölgeyle ilişkili DNA molekülündeki polimorfik bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan belirteçlerdir. Buradaki amaç, genomu etkilemek suretiyle organizmada değişikliğe sebep olan ajanların, biyolojik sistemlerde meydana getirdikleri hasarları saptamak, etkili oldukları dozu veya dozları belirlemek, meydana gelen toksik etkinin kalitatif ve kantitatif miktarını tayin etmektir. Bu belirteçler, çeşitli primerlerle beraber, Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) kullanımına dayanır (Uncuoğlu 2001). Bu tekniklerden bazıları aşağıda sunulmuştur.

### 2.6.1. Mİ (Mitotik indeks - *Allium cepa*) testi

Test materyali olarak kullanılan *Allium cepa* L. (mutfak soğanı)'dan, ismini almıştır. Soğan kökü meristem hücrelerinin iriliğinden dolayı çok rahat kök ucu preparatları hazırlanabilmekte ve bölünen hücrelerde meydana gelen değişimler gözlenebilmektedir (Agar ve Alpsoy 2005). Son yıllarda model bitki olarak *Allium* dışında mısır, buğday ve arpa gibi kromozom sayıları düşük bitkiler de mitotik indeks çalışmalarında kullanılmaktadır. Mitoz bölünme üzerine fiziksel ve kimyasal mutajenlerin ya da bitki ekstrelerinin etkisini ölçmek için kullanılan ucuz ve kısa zamanlı bir testtir (Kuraş *et al.* 2006; Gönen 2007).

### 2.6.2. MN (Micronucleus/Mikronükleus)

Fiziksel veya kimyasal mutajenlerin etkisi ile hasar gören ve bölünme sonrasında yeni oluşan çekirdeklere dahil olmayan kromozom veya kromozom parçalarının sitoplazmada yoğunlaşarak oluşturdukları yapıya mikronükleus denir (Millioğlu 2010). MN'ler, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmentlerinden köken alan oluşumlardır ve MN sayısındaki artış, somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın göstergesidir. MN testi, fiziksel ve kimyasal ajanların hücrelerde oluşturduğu genotoksik etkinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir testtir. Bu test mitoz bölünme ile oluşan hemen hemen tüm hücre tipleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilmektedir. Ayrıca kromozom anormallikleri testine göre daha kolay ve daha hızlı bir uygulamaya sahiptir (Demirel ve Zamani 2002; Şekeroğlu ve Atlı Şekeroğlu 2011).

### 2.6.3. SCE (Sister chromatid exchange/Kardeş kromatid değişimi=KDD)

Kardeş Kromatid Değişimi homolog kromozomların gen lokusları arasındaki DNA replikasyon ürünlerinin değişimini test etmektedir. Dışsal kaynaklı DNA hasarlarını en kolay ve ucuz yoldan belirlenmesini sağlayan tekniklerden biridir. Duyarlı ve hızla işleyen sitogenetik bir analizdir. Mayoz bölünme de normalde homolog kromozomların

kardeş olmayan kromatidleri crossing-over ile parça değişirken KDD; replikasyon hatalarından veya toksik maddelerden kaynaklanan DNA hasarlarından dolayı meydana gelmektedir (Sardas *et al.* 1994; Bayel 2006).

#### **2.6.4. RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA/ Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)**

RAPD yönteminin temel prensibi, ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, genellikle 10 bç uzunluğundaki oligonükleotid primerlerle uygun PCR şartlarında ilgili bölgenin çoğaltılmasına dayanır. Elde edilen çoğaltma ürünleri radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar değerlendirilir (Aydın 2004). Son yıllarda popülasyon genetiği, genetik toksikoloji gibi çalışmalarda kullanılmaktadır (Cenkçi vd 2010b). Ucuz, birden fazla bant üretebilen, kısa zamanda yapılabilen, ön bilgi gerektirmeyen bir tekniktir (Mueller and Wolfenbarger 1999).

#### **2.6.5. AFLP (Amplified fragment length polymorphism/ Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi )**

İlk defa Vos *et al.* (1995) tarafından bulunan, PCR tabanlı, kesilen ve çoğaltılan yüzlerce polimorfik DNA parçacığının tespitini sağlayan moleküler bir tekniktir. Örneklerin tanımlanması aralarındaki benzerliklerin ölçülmesi, genetik toksikoloji ve gen ekspresyonunun belirlenmesi için kullanılmaktadır (Huang *et al.* 2002). Teknik; a)DNA'nın enzimlerle kesilmesi b)kesilmiş uçlara adaptör eklenmesi, c)kesilip adaptör bağlanan parçaların adaptörlerle homolog olan kısa primerlerle çoğaltılması aşamalarından oluşmaktadır. Elde edilen PCR ürünlerinin Poliakrilamid jel elektroforezle (PAGE) yürütülüp görüntülenmesine dayanan bir tekniktir (Yaşar 2009). Tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, ön bilgi gerektirmemesi, yüksek oranda polimorfizm görülmesi tekniğin olumlu yönlerini oluştururken; uzun zaman ve yüksek maliyet gerektirmesi ise tekniğin olumsuz yönlerini oluşturur.

### **2.6.6. CRED-RA (Coupled restriction enzyme digestion-random amplification/ Çift restriksiyon enzimi kesimi ve rastgele çoğaltım)**

Epigenetik varyasyonların temel sebeplerinden biri olan DNA metilasyonunu belirleyen bir metottur. Metilasyona duyarlı enzimler ile DNA kesildikten sonra RAPD primerleriyle kesilen parçaların amplifikasyonunun yapılmasıyla, gelişimin farklı aşamalarındaki veya farklı dokular arasındaki metilasyon değişikliklerini belirlemekte kullanılır. Bu teknik, diziler ve türler arasındaki varyasyon çalışmaları için kullanılabilir. Genom metilasyonu Msp I ve Hpa II restriksiyon enzimleri kullanılarak analiz edilir. Her iki enzimde CCGG sekansını tanır. Fakat *Hpa II* yalnızca sitozinler metillenmediğinde aktiftir. Oysaki Msp I dış sitozin metillendiğinde DNA'ya yapışamaz. Önce DNA RAPD yöntemi ile PCR'da çoğaltılır. Sonra restriksiyon enzimleriyle DNA kesilir ve tekrar PCR'la çoğaltılarak değerlendirmeler yapılır.

### **2.6.7. MSAP( Methylation-sensitive amplified polymorphism/ Metilasyona duyarlı çoğaltılmış polimorfizm)**

DNA zincirinde özellikle sitozin bulunan bölgelerdeki metillenmeyi tespit etmek için geliştirilen bir tekniktir. Teknik, AFLP' den modifiye edilmiştir. Metillenmiş bölgeye özgü bir izoşizomer restriksiyon enzim çifti kullanılarak DNA'daki metillenmiş bölgeler belirlenir (Labra *et al.* 2004). Bu teknik, diğer moleküler markırların aksine sadece metilasyon varlığını tespit etmede kullanılır. Teknik, genotipik değişimleri konu alan epigenetik çalışmalarında başarılı bir şekilde uygulanmaktadır.

### **2.6.8. RFLP (Restriction fragment length polymorphism/Sınırlayıcı enzim parça uzunluk polimorfizmi)**

Bu teknik, genomik DNA'nın nükleik asit dizilişini tanıyan restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve bu parçaların çeşitli yöntemlerle işaretlenmiş prob DNA molekülleri yardımıyla görüntülenmesi esasına dayanır. Teknik, DNA'nın homolog parçalarındaki değişimleri kullanır. Kesilen DNA parçaları jelde yürütülür ve büyüklüklerine göre

jelde dizilirler. Babalık testinde, hastalık risklerinin araştırılmasında, genetik hastalıklardaki genlerin lokasyonlarını belirlemede kullanılmaktadır (Anonim 2012).

#### **2.6.9. Kantitatif çözünebilir protein miktarı tayini (Bradford yöntemi)**

Yaygın olarak kullanılan çözünebilir protein miktarı tayini Bradford (1976) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem önceden hazırlanan bir standarda göre, tamponda ezilip çözünen proteinlerin spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanır. Kullanılan standart konsantrasyon eğrisi, farklı miktarlarda BSA (Bovin Serum Albumin) içeren numunelerin ölçülmesiyle elde edilir. Konsantrasyonu bilinmeyen numunelerin yoğunluğu, konsantrasyonu bilinenlerin verdiği absorbans değerinin, standart eğrisi üzerine çakıştırılması ile bulunur. Farklı pH'larda farklı renk değişimi gösteren Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasıyla ilk aşamada çözünebilir proteinlerin kantitatif tayini yapılırken, spektrofotometrede belirli dalga boylarında yapılan ölçümlerle ise çözünebilir proteinlerin kantitatif tayini yapılır (Yanmış 2008).

#### **2.6.10. SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis/ Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) ile protein elektroforezi**

Denatüre edilmiş proteinlerin (üç boyutlu yapı linear bir hale dönüşür) belirli bir pH değerinde elektriksel bir alanda, moleküler büyüklüğüne göre ayrılması prensibiyle çalışan bir tekniktir. Proteinin jeldeki hareketi, elektriksel alan gücüne, partikülün büyüklüğüne ve hazırlanan jelin yoğunluğuna bağlı olarak değişebilir. Teknik; moleküler ağırlık tayininde, protein saflığının belirlenmesinde, aminoasit (aa) diziliminin belirlenmesinde, türler arasındaki farklılıkların ya da aynı türe ait bireylerin farklı durumlarda sentezledikleri protein farklılıklarının belirlenmesinde kullanılır (Bozarı vd 2012).



### **2.6.11. Hormon analizi**

Yüksek bitkilerde, bitkinin metabolizmasının, büyüme ve şekillenmesinin düzenlenmesini sağlayan belirli bölgelerinde sentezlenip diğer kısımlarına iletilen kimyasal işaretlere hormon denir. Hormonların bitkideki düzenleyici görevleri bitkiden bitkiye ve çevre şartlarına bağlı olarak değişiklik gösterir. Özellikle abiyotik faktörler bitkisel hormonların düzeyini belirlemede önemlidir. (Kadıoğlu 1999; Kocaçalışkan 2010). Büyümeyi uyaran ve inhibe edenler olmak üzere iki gruba ayrılan hormonların bitkide bulunma seviyeleri, genetiksel değişimlerden etkilenebilir (Ağar vd 2006). Dolayısıyla bitkiye dışarıdan uygulanan kimyasal maddelerin, bitkiyi fizyolojik olarak etkileyip etkilemedikleri bitkisel hormonların düzeylerine bakılarak tespit edilebilir. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemiyle bitkilerdeki hormon seviyeleri ölçülebilir (Erez 2009).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bitki örneklerinin toplanması

Çalışmada kullanılmak üzere toplanan *Calamintha nepeta* (L.) SAVI ssp. glandulosa, *Mentha longifolia* (L.) HUDSON (L.) HUDSON, *Nepeta nuda* L. ssp. nuda L., *Origanum rotundifolium* BOISS., *Origanum vulgare* L. ssp. vulgare ve *Satureja hortensis* L. bitkilerine ait bilgiler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Bitki örnekleri 2008 yılı Haziran- Eylül ayları arasında toplanıp Doç. Dr. Yusuf KAYA (Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) tarafından teşhis edildikten sonra birer örnek Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu’nda (ATA Herbaryumu) saklanmıştır.

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan bitki örnekleri, toplandıkları lokasyonlar ve Herbaryum numaraları

No	Bitkinin Adı	Toplandığı Yer	Yükseklik	Herbaryum No
1	<i>Calamintha nepeta</i> (L.) SAVI ssp. glandulosa	Trabzon	0-10	ATA HERB-9837
2	<i>Mentha longifolia</i> (L.) HUDSON ssp longifolia	Aşkale	1700-1800	ATA HERB-9834
3	<i>Nepeta nuda</i> L. ssp. nuda L.	Erzurum-Tortum	1800-1900	ATA HERB-9838
4	<i>Origanum rotundifolium</i> BOISS.	Aşkale	1600-1700	ATA HERB-9835
5	<i>Origanum vulgare</i> L. ssp vulgare	Oltu	1900-2000	ATA HERB-9836
6	<i>Satureja hortensis</i> L.	Bingöl	1100-1200	ATA HERB-9838

Çalışmada model bitki olarak *Zea mays* L. (mısır) tohumları kullanılmış ve tohumlar Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü’nden temin edilmiştir.

### 3.1.2. Kullanılan cihazlar

Çalışmanın farklı zamanlarında kullanılan cihazların listesi aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2.** Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve modelleri

No	Cihaz Adı	Marka ve Model
1	Blender	WARING GERMANY CB-15T
2	Buzdolabı	Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF
3	Clevenger	Thermal Laboratory Equipment, TÜRKİYE
4	Çalkalayıcı	Thermoshake, Gerhard, GERMANY, SN 4002319
5	Derin Dondurucu	Nuarie, U.S.A,-86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316-PK
6	Elektroforez Sistemi	Biogen, Apelex, FRANCE, SN 280800
7	Hassas Terazi	Scaltec, GERMANY, SPB42, SN SPB42-9090823
8	İnkübatör	Binder, GERMANY, BD 53
9	Jel Görüntüleme Sistemi	Uvitec, Biolab, EEC, SN M01-2467
10	Kar makinesi	Angelontonia, ITALIA, SN 25183/00
11	Kolon	µ Bondapak C18 (Waters; 30*0,2 cm )
12	Manyetik Karıştırıcı	Nüve, TÜRKİYE, MK-418, SN 05-1083
13	Mikrodalga Fırın	Arçelik, TÜRKİYE, MD 592
14	Mikroskop	OLYMPUS CX-21
15	Otoklav	Hırayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253
16	Otomatik Pipetler	Eppendorf, GERMANY
17	Otomatik Termocycle Sistem	Eppendorf, GERMANY, SN 5331-01846
18	pH Metre	Hana, PORTUGAL, HI 9321, SN 396202
19	Saf Su Cihazı	Ateks, 7x35, Eu
20	Santrifüj	Eppendorf, GERMANY, 5414 D, SN 5425-40112
21	Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Mikro 22R, M10, SN 0001279-03-00)
22	Spektrofotometre	Shimadzu, JAPAN, RC 232C
23	Steril Kabin	Esco, SINGAPORE, Ace-4E1
24	Su Banyosu	Nüve, TÜRKİYE, ST-402, SN 02-0138
25	Pompa	Waters 6000A
26	UV dedektörü	Waters PU 4020

### 3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar

**Çizelge 3.3.** Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ve üretici firmaları

No	Kimyasalın Adı	Üretici Firma
1	$\beta$ -merkaptoetanol	Merck <sup>®</sup>
2	AFLP Kit	İnvitrogen <sup>®</sup>
3	Agaroz	Merck <sup>®</sup>
4	Gümüş nitrat	Sigma -Aldrich <sup>®</sup>
5	Akrilamid	Merck <sup>®</sup>
6	Amonyumpersulfat	Merck <sup>®</sup>
7	Aseton	Sigma -Aldrich <sup>®</sup>
8	Bis-Akrilamid	Merck <sup>®</sup>
9	Bromfenol mavisi	Merck <sup>®</sup>
10	Kolsişin	Merck <sup>®</sup>
11	Coomassie brillant blue	Merck <sup>®</sup>
12	Setiltrimetilamonyum bromid	Merck <sup>®</sup>
13	Deoksiribonükleozidtrifosfat	Operon Technologies <sup>®</sup>
14	Etilendiamintetraasetikasit	Sigma -Aldrich <sup>®</sup>
15	Etanol	Sigma -Aldrich <sup>®</sup>
16	Fenol	Merck <sup>®</sup>
17	Formaldehit	Sigma -Aldrich <sup>®</sup>
18	Formamid	Sigma -Aldrich <sup>®</sup>
19	Glasiyal asetik asit	Merck <sup>®</sup>
20	Gliserol	Sigma -Aldrich <sup>®</sup>
21	Hidroklorik asit	Sigma -Aldrich <sup>®</sup>
22	Dipotasyum fosfat	Merck <sup>®</sup>
23	Potasyum klorür	Merck <sup>®</sup>
24	Potasyumdihidrojenfosfat	Merck <sup>®</sup>
25	Kloroform	Merck <sup>®</sup>
26	Metanol	Sigma -Aldrich <sup>®</sup>
27	Sodyum Fosfat di Basic	Merck <sup>®</sup>
28	Sodyum Klorür	Sigma -Aldrich <sup>®</sup>
29	PCR Buffer	Operon Technologies <sup>®</sup>
30	Polyvinylpyrrolidone	Merck <sup>®</sup>
31	RAPD primerleri	Operon Technologies <sup>®</sup>
32	Sodyum dodesil sülfat	Merck <sup>®</sup>
33	Sodyum karbonat	Merck <sup>®</sup>
34	Sodyum tiyosülfat	Merck <sup>®</sup>
35	Taq DNA Polymeraz	Vivantis <sup>®</sup>
36	Tetramethylethylenediamine	Merck <sup>®</sup>
37	Trietilamin	Merck <sup>®</sup>
38	Tris-HCl	Sigma -Aldrich <sup>®</sup>
39	Tween 20	Merck <sup>®</sup>
40	Ksilen siyanol	Merck <sup>®</sup>

### 3.1.4. Sitotoksisite testlerinde kullanılan çözeltiler

Çalışmanın bu aşamasında kullanılan çözeltiler Agar vd. (2010b) ile Turker vd. (2008)'e göre hazırlanmıştır.

#### Tween çözeltisi (500mL)

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
Tween 20	1 mL
Saf su	499 mL

1 mL Tween 20, 499 mL saf su içinde iyice karıştırılıp 10 dk dinlendirildikten sonra kullanıldı.

#### Kolsişin çözeltisi (%0,15)

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
Kolsişin	15 mg
Saf su	10 mL

15 mg kolsişin 10 mL saf su içinde çözülerek hazırlandı.

#### Farmer fiksativi (100 mL)

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
Etanol	75 mL
GAA	25 mL

75 mL etanolün üzerine 25 mL GAA eklenerek hazırlandı.

**1 N HCL çözeltisi**

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
Saf su	91,7 mL
%37'lik ve 1 N' lik HCl	8,3 mL

91,7 mL saf su üzerine %37'lik ve 1 N'lik HCl'den 8,3 mL eklenip son hacim 100 mL'ye tamamlanmak suretiyle hazırlandı.

**Glasiyal asetik asit (GAA) çözeltisi**

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
GAA	45 mL
Saf su	55 mL

55 mL saf su üzerine 45 mL GAA eklenerek son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

**%2'lik Aseto orsein boyası**

Isıtıcı özelliği olan manyetik karıştırıcıda 55 mL GAA kaynatıldı. 2 gr Aseto-orsein boya kaynayan GAA'ya eklendi. Boya çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığına kadar soğutulup üzerine 45 mL saf su eklendi. Hazırlanan karışım filtre kâğıdında 2-3 kez süzüldü. Boya alüminyum folyo ile sarılmış cam şişede +4°C de buzdolabında saklandı.

**3.1.5. DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler**

Bu aşamada kullanılan çözeltiler, birkaç çalışmadan yararlanılarak hazırlanmıştır (Uncuoğlu 2001; Ağar vd 2009; Cenkçi vd 2010a).

**Ekstraksiyon çözeltisi**

100 mM TRIS-HCl

1,4 M NaCl

20 mM EDTA

%2 CTAB

% 2 PVP

%0,2  $\beta$ -merkaptoetanol

%0,1  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ile hazırlandı.

**Kloroform: İzoamil alkol**

24 hacim kloroforma 1 hacim izoamil alkol eklenerek hazırlandı.

**TE tamponu (pH 8.0)**

10mM Tris-HCl

1mM EDTA ile hazırlandı.

**3.1.6. RAPD ve AFLP tekniklerinde kullanılan çözeltiler****Agaroz jel (%1)**

1 g agaroz tartılıp 99 mL saf suya eklendi ve homojen karışımını sağlamak için mikrodalga fırında 2-3 dk ısıtıldı.

### **%30'luk akrilamid-*bis*akrilamid çözeltisi**

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
Akrilamid	29,2 gr
<i>Bis</i> -akrilamid	0,8 gr
Saf su	100 mL

29,2 g Akrilamid ve 0,8 g *Bis*-akrilamid tartıldı ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Oluşan homojen karışım, alüminyum folyoyle ışık görmeyecek şekilde sarılarak kullanılacağı zamana kadar buzdolabında +4°C'de saklandı.

### **Poliakrilamid jel (%6)**

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
%30'luk Akrilamid	16,8 mL
Saf su	53,2 mL
10X TBE	8,4 mL
APS %10' luk	800 µL
TEMED	75 µL eklendi.

TEMED ve APS hızlı polimerleşmeye neden olduklarından bu iki madde çözeltiliye en son eklendi. Bu çözelti uygulamaya başlamadan önce hazırlandı ve kısa sürede polimerleşmeden cam plakalara döküldü (Vos *et al.* 1995; Uncuoğlu 2001).

### **3.1.7. Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler**

#### **Fixing çözeltisi (100mL)**

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
---------------	---------------



Glasiyal Asetik Asit	12,5 mL
Saf su	87,5 mL

Bir miktar saf suyun üstüne 12,5 mL GAA eklendikten sonra, son hacim saf suyla 100 mL'ye tamamlandı. Çözeltinin, kullanım sırasında soğuk olması gerektiğinden, çözelti yeterli bir süre buzdolabında +4 °C'de tutuldu.

### **Gümüş çözeltisi**

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
AgNO <sub>3</sub>	0,1 gr
Saf su	100 mL

0,1 gr AgNO<sub>3</sub> 100 mL saf su içinde çözüldü. Uygulama öncesinde, çözeltiye 150 µL formaldehit eklenip iyice karıştırıldı ve buzdolabında +4°C'de tutuldu.

### **Developer çözeltisi**

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6 gr
Soğuk saf su	200 mL
Formaldehit	300 µL
Sodyum tiyosülfat	40 µL

6 gr Sodyum karbonat, 200 mL saf su içinde çözüldü. Uygulama öncesi 300 µL formaldehit ve 40 µL sodyum tiyosülfat eklenip iyice karıştırıldı. Kullanım sırasında soğuk olması gereken çözelti buzdolabında +4°C'de tutuldu (Uncuoğlu 2001).

### 3.1.8. Çözünebilir protein miktarı tayininde kullanılan çözeltiler

#### Commasie blue R-250

1,250 gr Commasie R-250 tartılıp 400 mL saf su eklendi. Boya çözülmeye başladıktan sonra 500 mL metanol ve 100 mL glasiyal asetik asit eklendi. Karışım manyetik karıştırıcıda homojen dağıldıktan sonra karanlıkta filtre edildi. Kullanılacağı zamana kadar buzdolabında +4°C'de saklandı.

#### Bovine serum albümin (BSA)

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
BSA	20 mg
Saf su	1 mL

20 mg BSA, 1 mL saf su içerisinde çözülüp, homojen karışımları sağlandı. Kullanılacağı zamana kadar buzdolabında -20 °C'de saklandı.

### 3.1.9. SDS-PAGE protein analizi için kullanılan çözeltiler

#### 1,5 M Tris-HCl pH:8,8

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
Tris Base	18,171 gr
Saf su	100 mL

18,171 gr Tris bir miktar saf suda çözüldükten sonra pH 8,8'e ayarlandı ve solusyonun son hacmi saf suyla 100 mL'ye tamamlandı. Daha sonra çözelti otoklavlanıp kullanılacağı zamana kadar buzdolabında +4°C'de saklandı.

**%10'luk Amonyum per sülfat**

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
APS	0,1 gr
Saf su	1 mL

0,1 gr APS 1 mL saf su içinde çözülüp kullanılacağı zamana kadar buzdolabında -20°C'de saklandı.

**%10'luk Sodyum dodesil sülfat**

<u>İçerik</u>	<u>Miktar (1 L)</u>
SDS	100 gr
Saf su	900 mL

100 gr SDS'nin üzerine 900 mL saf su eklendi. 65°C'de su banyosunda homojen karışım sağlandıktan sonra son hacim saf suyla 1 litreye tamamlandı. Solüsyon, oda sıcaklığında saklandı.

**Protein yükleme tamponu**

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
Tris-HCl (pH:6.8 1M)	150 µL
%10'luk SDS	400 µL
%80'lik Gliserol	250 µL
Bromfenol Blue	150 µL
B-Merkaptoetanol	50 µL

Listesi verilen her bir solüsyondan belirtilen miktarlarda bir ependorf tüpüne konularak gerekli tampon hazırlandı. Protein yükleme tamponu her uygulamadan önce taze olarak hazırlandı.

### **Bromfenol blue (Yürütme boyası)**

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
Tris Base (pH: 6.8)	160 µL
Gliserin	250 µL
Bromfenol blu (%0,1'lik)	250 µL

160 µL Tris (pH: 6.8), 250 µL Gliserin, 250 µL Bromfenol blue (%0,1'lik) karıştırılıp, vortekslendikten sonra kullanılacağı zamana kadar buzdolabında +4°C'de saklandı.

### **Yürütme tamponu (500 mL)**

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
Tris	1,5 gr
Glisin	7,2 gr
Saf su	500 mL

1,5 gr Tris, 7,2 gr Glisin tartıldı ve son hacim 500 mL'ye tamamlanarak manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Solüsyon, kullanılacağı zamana kadar buzdolabında +4°C'de saklandı.

### **Protein jeli boyama çözeltisi (100 mL)**

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
Coomassie Blu R-250	0,125 gr
Metanol	50 mL

Asetik asit	10 mL
Saf su	40 mL

0,125 gr Coomassie blu R-250 tartıldı üzerine 50 mL metanol ve 10 mL asetik asit eklendikten sonra saf su ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı. Solüsyon, kullanılacağı zamana kadar buzdolabında +4°C'de saklandı.

### **Yıkama çözeltisi**

<u>Solüsyon 1</u>	<u>Miktar</u> (100 mL)
Metanol	50 mL
Asetik asit	10 mL
Saf su	40 mL

Metanol, asetik asit ve saf su belirtilen oranlarda karıştırıldı. Solüsyon 1 her uygulamadan önce taze olarak hazırlandı.

<u>Solüsyon 2</u>	<u>Miktar</u> (150 mL)
Asetik asit	10,5 mL
Metanol	7,5 mL
Saf su	132 mL

Asetik asit, metanol ve saf su belirtilen oranlarda karıştırıldı. Solüsyon 2 her uygulamadan önce taze olarak hazırlandı.

### **DNA boyama çözeltisi**

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
Formamid	5 mL
Bromfenol Blue	0,005g

Ksilen siyanol	0,005g
EDTA	125µL
SDS (%10)	50 µL

0,005gr Bromfenol Blue ve 0,005gr Ksilen siyanol tartıldı. Üzerine 5 mL Formamid, 125µL EDTA (500mM, pH:8.00) ve 50 µL SDS (%10) eklenip karıştırıldı. Uzun süreli kullanımlar için viallere bölünerek buzdolabında +4°C’de saklandı.

<b>Ayırma jeli (%12)</b>	<b>Miktar</b>
Saf su	1,6 mL
%30’luk akrilamid	2 mL
1,5 M Tris-HCl (pH: 8.8)	1,3 mL
%10’luk SDS	50 µL
%10’luk APS	50 µL
TEMED	3 µL

<b>Yığılma jeli (%3)</b>	<b>Miktar</b>
Saf su	680 µL
%30’luk akrilamid	170 µL
1,5 M Tris-HCl (pH: 8.8)	130 µL
%10’luk SDS	10 µL
%10’luk APS	10 µL
TEMED	1 µL

Listelenen örneklerle hazırlanan çözelti donmadan cam bloklara döküldü (Yanmış 2008).

### **3.1.10. Hormon analizlerinde kullanılan çözeltiler**

#### **PVPP (Polivinilpolipirolidon) çözeltisi**

1 g çözünmeyen PVPP bir beher içerisine bırakıldı ve üzerine 0,1 M'lık asetik asit konarak süspansiyon şeklinde iyice karıştırıldıktan sonra süzüldü. Tekrar üç kat hacimdeki asetik asitle yıkanıp süzüldükten sonra kullanıldı (Erez 2009).

#### **TEAA Çözeltisi**

Belli bir miktarda trietilamin alınarak bir mezür içerisine bırakıldı. Üzerine trietilamin miktarından biraz daha az olacak şekilde asetik asit yavaş yavaş ilave edildi (Fritz *et al.* 1978). Daha sonra buzdolabına bırakıldı ve soğuduktan sonra kullanıldı.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Uçucu yağların eldesi**

Lokasyonlarından toplanıp gölgede kurutulan bitki örneklerinin gövde ve yaprak kısımları blenderde öğütülerek toz haline getirildi. Daha sonra 3 saat boyunca clevenger hidrodistilasyon yöntemiyle uçucu yağlar elde edildi. Elde edilen yağlar +4°C'de bekletildi (Barış vd 2006).

### **3.2.2. GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometry= Gaz kromatografi - kütle spektrometresi ) analizi**

Elde edilen uçucu yağların içeriğinin belirlenmesi için SGE-BPX5 MS (30 m X 0,25 mm i.d., 0,25 µm) kapiller kolona sahip Thermofinnigan Trace GC/Trace DSQ/A1300, (E.I Quadrapole) cihazı kullanıldı. GC-MS ölçümleri için iyonizasyon enerjisi 70 eV olan elektron iyonizasyon sistemi kullanıldı. Taşıyıcı gaz olarak Helyum gazı kullanıldı

ve akış oranı 1 mL/dk olarak ayarlandı. Enjektör sıcaklığı 220°C olarak belirlenirken, MS transfer hattı sıcaklığı 290°C olarak ayarlandı. Program 50-150°C sıcaklıklarında 3°C/dk hızla başlatıldı. 1/100 v/v, in Metilen klorid ile dilüe edilen örneklerden 1 µL manuel olarak cihaza enjekte edildi ve cihaz ayırma moduna alındı. Bileşenler, tutunma zamanlarının (RT) birbirine yakınlığı ve kütle spektrumları göz önüne alınarak Wiley 7N Library Data of the GC-MS System ve literatürle karşılaştırılarak tanımlandı (Barış vd 2006).

### 3.2.3. Çimlenme deneyleri

Mısır tohumlarının yüzeysel sterilizasyonu, tohumların %5'lik Sodyum hipoklorit (NaOCl)'de 10 dk bekletildikten sonra en az 5 kez saf suyla yıkanmasıyla sağlandı. Eşit büyüklükteki tohumlar seçilerek içerisinde iki kat steril Whatman No. 1 filtre kağıdı olan 12 cm çapındaki steril petrilere 15'er adet ekildi. Her bir uçucu yağ içeriğinden 0,1, 0,2, 0,4 ve 0,8µL/mL dozlarda olacak şekilde mısır tohumlarına eklendi. Kontrol için sadece Tween 20 içeren saf su kullanıldı. Örnekler daha sonra oda sıcaklığına (25°C) ayarlanmış etüve alındı. Deneyler üç paralelli ve beş tekrarlı yapıldı. Mitotik indeks çalışmaları için 3'üncü günün sabahında kök ucu örnekleri alındı. DNA izolasyonu, protein ölçümleri ve hormon analizleri için 7. günün sonunda gök ve gövde örnekleri ayrı ayrı alınarak etiketlendi. Örnekler çalışmanın yapılacağı zamana kadar -20°C'de bekletildi (Agar ve Alpsoy 2005).

### 3.2.4. Mitotik İndeks testi

Çimlenen mısır tohumlarının köklerinden 3. günün sabahında 0,5 cm alındı. Hücre bölünmesini durdurmak için örneklere %0,15'lik kolsişin eklenip oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Daha sonra saf suyla en az 4-5 kez yıkandı. Tespit işlemi yapmak için Farmer fiksatifine konan örnekler 24 saat +4°C'de bekletildi. Tespit işleminden sonra, örnekler 10'ar dakika musluk suyunda yıkandı. Yıkanan örnekler 1 N HCL ile 60°C'de 15 dakika hidroliz edildi. Tekrar 10'ar dakika musluk suyunda yıkanan örnekler %2'lik Aseto-orsein boyada 2-3 saat oda sıcaklığında bekletildi. Boyadan çıkarılan örnekler



boyamayı kolaylaştırdığı bilindiğinden 10'ar dakika musluk suyunda yıkandıktan sonra %45'lik GAA' da ezme preparat hazırlanarak incelendi (Türker vd 2008).

### 3.2.5. DNA izolasyonu

Uçucu yağların uygulandığı mısır örneklerinin DNA izolasyonu, Uncuoğlu (2001) ve (Yaşar 2009)'nun protokolü esas alınıp modifiye edilerek kullanıldı. DNA izolasyonu için şu basamaklar takip edildi

- Taze örnekler sıvı azotta iyice ezildi. İşlemin bu basamağı temiz DNA elde etmek için önemlidir.
- 0,1 gr ezilmiş örneklere 700 µL DNA ekstraksiyon çözeltisi eklenip iyice karıştırıldı.
- Örnekler önceden 65°C'ye ayarlanmış su banyosuna bırakıldı. Su banyosunda 1 saat bekletilen örnekler 10'ar dakika aralıklarla ters düz edilerek karıştırıldı.
- Daha sonra su banyosundan çıkarılan örnekler oda sıcaklığında 5-10 dk soğumaya bırakıldı. Soğuyan örneklere 700 µL kloroform-izoamil alkol eklenip beyazımsı bir renk alıncaya kadar vortekslendi.
- 6000 rpm'de + 4 °C'de 15 dk santrifüj edilen örneklerin üst fazı yeni tüplere alınıp üst fazın en az iki katı kadar soğuk izopropanol eklendi. Örnekler vortekslenmeden iyice karıştırıldı.
- Daha sonra en az 45 dk -20°C'de bekletilen örnekler 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edilip tüplerin dibindeki DNA peletlerinin dökülmemesine dikkat edilerek izopropanollerini döküldü.
- Örneklere içerisinde 10 mM amonyum asetat bulunan 30 µL %76'lık etil alkol eklenip karıştırıldı. Bu aşamada DNA'nın çözülmesi sağlandı. Peletin çözülmesi için son aşama 2 kez tekrarlandı.
- Çözülen DNA örneklerinin bulunduğu alkol çözeltisi 1500 rpm'de 2 dk santrifüj edildikten sonra alkol uzaklaştırıldı. Son alkol kalıntılarını ortadan kaldırmak için, DNA peletleri 37°C'de 15 dakika kurumaya bırakıldı.

➤ Örnekler 40 µL TE (pH:8.0) çözeltisinde çözüldü ve 2 µL RNase eklenip tekrar 37°C’de 15 dk bekletildi. Daha sonra +4°C’ye alınarak çalışma süresince saklandı.

DNA örneklerinin saflığını ölçmek için 3µL DNA+747µL TE tamponuna eklenerek spektrofotometrede 260nm ve 280nm dalga boylarında absorbans (A) değerleri okundu. 260/280 değeri 1,1-1,8 arasında olan DNA örnekleri saf DNA olarak etiketlendi. 50 (DNA için multifikasyon katsayısı) x 250 (seyreltme katsayısı) x OD<sub>260</sub> (260nm’de okuma değeri) formülünden faydalanılarak stoktaki DNA miktarı hesaplanıp stok DNA’dan 50ng/µL DNA içeren çalışma solüsyonları hazırlandı.

### **3.2.6. RAPD-PCR protokolü**

PCR işlemi için şu protokol izlenmiştir. Önceden otoklavlanmış 0,5 mL’lik PCR tüpüne 3µL 10x PCR tamponu, (10mg/ mL), 1,2 µL dNTP (10mM), 1,2 µL MgCl<sub>2</sub> (25mM), 3µL DNA (100ng/µL), 1,2 µL primer (25 pmol), 0,4 µL 5Unit/µL *Taq* DNA polimeraz konuldu. Saf su ilave edilerek hacim 30µL’ye tamamlandı (Ağar vd 2010a).

#### **3.2.6.a. RAPD primerleri**

Çalışmada toplam 30 RAPD primeri denendi. Bunlardan amplifikasyon veren 16 primer seçildi. Her primerden 25 pmol olacak şekilde hazırlanan primerlere ait baz dizileri Çizelge 3.4’ te sunuldu.

**Çizelge 3.4.** RAPD’de kullanılan primerler ve DNA sekans bilgileri

No	Primer	Primer Sekansı
1	OPA-13	5'→3' CAGCACCCAC
2	OPH-17	5'→3' CACTCTCCTC
3	OPA-2	5'→3' TGCCGAGCTG
4	OPA-1	5'→3' CAGGCCCTTC
5	OPA-6	5'→3' GGTCCCTGAC
6	OPH-14	5'→3' ACCAGGTTGG
7	OPH-18	5'→3' GAATCGGCCA
8	OPY-6	5'→3' AAGGCTCACC
9	OPY-1	5'→3' GTGGCATCTC
10	OPY-8	5'→3' AGGCAGAGCA
11	OPY-15	5'→3' AGTCGCCCTT
12	OPY-16	5'→3' GGGCCAATGT
13	OPW-1	5'→3' CTCAGTGTCC
14	OPB-8	5'→3' GTCCACACGG
15	OPW-7	5'→3' CTGGACGTCA
16	OPW-5	5'→3' GGCGGATAAG

Bu işlemlerin ardından örnekleri içeren tüpler PCR otomatik thermocycle aletine yerleştirilmiş ve aşağıdaki döngüye tabi tutuldu.

- 1) PCR aleti otomatik olarak 5 dk 94°C tutuldu,
- 2) 4 döngü olacak şekilde her bir döngü sırasıyla,

1 dk 30 sn 94°C

1 dk 30 sn 37°C

3 dk 72°C basamaklarından oluşturuldu.

- 3) 41 döngü olacak şekilde her bir döngü sırasıyla,

1 dk 94°C

1 dk 36°C

1 dk 42°C

3 dk 72°C basamaklarından oluşturuldu.

- 4) Son olarak 7 dk 72°C’de tutarak süreç tamamlandı.
- 5) PCR aletinden çıkarılan örnekler +4°C’de saklandı (Ağar vd 2010a).

### **3.2.6.b. Agaroz jel elektroforezi**

PCR işleminden sonra örnekler önceden hazırlanan %1’lik agaroz jele yüklenerek TBE tamponunda yürütüldü. Bantların jelde görünürlüğü için hazırlanan jele 1 µL Ethidium bromide eklendi. Kuyulara loader boyayla beraber 13 µL PCR ürünü yüklendi. 80 voltta 90 dakika yürütülen jeller görüntüleme sisteminde görüntülendi.

### **3.2.6.c. RAPD analizleri ve genomik kalıp sabitliliğinin (Genomik template stability= GTS) belirlenmesi**

Her bir primer için tüm örneklerde amplifiye olan DNA bantlarının varlığı ve yokluğu, negatif kontrol RAPD profillerine göre bant yoğunluklarındaki azalma ve artmalar agaroz jel görüntüleme cihazı ve Total LAB TL 120 (Nonlinear Dynamics) yazılımıyla belirlendi. Genomik kalıp sabitliliği (%) tüm primer ürünleri için  $100 * 1 - \frac{a}{n}$  formülünden yararlanılarak hesaplandı. Formüldeki *a* her bir uygulama örneği için tespit edilen RAPD polimorfik profillerini, *n* ise ilgili primerle negatif kontrol grubunda elde edilen DNA toplam band sayısı olarak seçildi. Uygulama gruplarına ait RAPD profillerinde gözlenen polimorfizm negatif kontrol grubuna göre yeni bir bandın ortaya çıkması veya mevcut bir bandın kaybolmasını kapsadı. Her bir parametrenin (GTS) hassaslığını karşılaştırmak için, bu parametrelerdeki değişimler kontrollerine (%100’e sabitlenecek) göre yüzde değişim olarak hesaplandı (Cenkçi vd 2009).

### **3.2.7. AFLP protokolü**

Üretici firmanın (AFLP® Analysis System, AFLP® Starter Primer Kit ) önerdiği protokole bağlı kalınarak bazı modifikasyonlarla AFLP tekniği uygulandı. Teknik temelde 4 basamakta oluşturuldu. Uygulama aşağıdaki gibi yapıldı.

### 3.2.7.a. DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesimi

Steril PCR tüplerine aşağıdaki bileşenler eklenip yavaşça karıştırıldı. Daha sonra enzimin spesifik bölgelerden kesim işlemini başlatmak için 37°C'de 3 saat bekletildi.

Test tüpüne konulan bileşenler	25 µL Son hacim
5x reaksiyon tamponu	5µL
Örnek DNA (250 ng)	≤ 18µL
<i>EcoRI/MseI</i>	2µL
dH2O	25 µL'ye tamamlandı.

Kesim enzimlerini inaktif etmek için karışım 15 dk 70°C'de inkübe edildi. Daha sonra tüpler buza konulup ikinci aşamaya geçildi.

### 3.2.7.b. Adaptörlerin eklenmesi

Kesilen yapışkan uçlu DNA'ya kesim enzimlerine spesifik adaptörler eklenip kesilen parçalar kör uçlu hale getirildi. Bu aşama için aşağıdaki bileşenler test tüplerine eklendi.

Test tüpüne konulan bileşenler	50 µL son hacim
Kesilen DNA örnekleri	25 µL
Adaptör ligasyon solusyonu	24 µL
T4 DNA ligaz	1µL

Hazırlanan örnekler yavaşça karıştırılıp içeriğin dipte toplanması 3-5 saniyeliğine santrifüj edildi. Adaptörlerin ligasyonu için karışım 20°C'de±2°C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı. Ligasyonun sonunda karışım 1:10 oranında dilüe edildi. Üçüncü aşamaya geçerken kullanılmayan örnekler -20°C'de saklandı.

### 3.2.7.c. Pre-amplifikasyon reaksiyonları

Önseçici amplifikasyon denilen bu aşamada önceki basamakta elde edilen adaptör eklenmiş DNA parçalarının amplifikasyonu gerçekleştirildi. Bunun için test tüplerine aşağıdaki bileşenler eklendi.

<b>Test tüpüne konulan bileşenler</b>	<b>51 µL son hacim</b>
Dilüe edilen DNA	5 µL
Pre-amp primer mix	40µL
10X PCR buffer +mg	5 µL
Taq DNA Pol (5U/µL)	1µL

Karışım yavaşça karıştırıldıktan sonra tüpün dibinde toplanması için 3-5 saniye santrifüj edildi. Daha sonra PCR şartları aşağıdaki gibi ayarlanarak ön-seçici amplifikasyon başlatıldı.

#### PCR Koşulları:

20 döngü olacak şekilde her bir döngü;

94°C' de 30 saniye,

56°C' de 1 dk,

72°C' de 1 dk

ve son sıcaklık +4°C olarak ayarlandı. PCR'dan çıkan ürünler 1:50 oranında dilüe edildi. PCR ürününden 3 µL alınıp 147 µL TE ile 1,5 mL'lik eppendorf tüpte karıştırıldı.

### 3.2.7.d. Selektif amplifikasyon

Bu aşamada enzimlere spesifik primerlerle bir önceki aşamada elde edilen ürünler seçici amplifikasyonla çoğaltıldı. Her primer çifti için 1. karışım hazırlandı. Çalışmada bu primer çiftlerinden 19 adet karışım ayrı ayrı hazırlandı. Kullanılan primer çiftleri Çizelge 3.5'te sunuldu.

#### **Karışım 1** **50 µL son hacim**

İşaretli <i>Eco</i> RI primer	5µL
<i>Mse</i> I primer (dNTP içeren)	45µL

#### **Karışım 2** **100 µL son hacim**

Distile su	79 µL
10X PCR buffer + Mg	20 µL
Taq DNA polimeraz (5 units/µl)	1 µL

1. ve 2. karışımlar hazırlandıktan sonra aşağıdaki oranlarda test tüpüne eklendi.

#### **Test tüpüne konulan bileşenler** **20 µL son hacim**

Dilüe edilen Kalıp DNA dan	5 µL
Karışım 1 (Primerler/dNTPs)	5 µL
Karışım 2 (Taq /buffer)	10 µL

Örnekler yavaşça karıştırılıp 3-5 saniye santrifüj edildikten sonra PCR cihazına bırakıldı.

PCR şartları aşağıdaki gibi oluşturuldu.

94°C de 30 saniye,

65°C de 30 saniye

72°C de 60 saniyede gerçekleşen 1 PCR döngüsünü takiben annealing sıcaklık touch-down PCR ile her bir döngüde 0,7°C azaltılarak toplam 13 döngü neticesinde 56°C'ye çekildi.

Aynı programda daha sonra,

94°C'de 30 saniye,

56°C'de 30 saniye

72°C'de 60 saniye olacak şekilde 23 döngü yapıldı. ıkan PCR ürünleri -20°C'ye kaldırıldı.

### **3.2.7.e. AFLP primerleri**

Üretici firma (Invitrogen)' nın mısır örnekleri için önerdiği primer kombinasyonlarından en fazla amplifikasyon veren 19 primer çifti seçildi (Çizelge 3.5).



**Çizelge 3.5.** Selektif amplifikasyonda kullanılan AFLP primer kombinasyonları

<b>Primer Kodu</b>	<b>Primer dizisi</b>
<b>Primer 1</b>	E-AAC / M-CAC
<b>Primer 2</b>	E-AAC / M-CAG
<b>Primer 3</b>	E-AAC / M-CTC
<b>Primer 4</b>	E-AAG / M-CAA
<b>Primer 5</b>	E-AAG / M-CAT
<b>Primer 6</b>	E-AAG / M-CTT
<b>Primer 7</b>	E-ACA / M-CTA
<b>Primer 8</b>	E-ACA / M-CTC
<b>Primer 9</b>	E-ACC / M-CAA
<b>Primer 10</b>	E-ACC / M-CTT
<b>Primer 11</b>	E-ACG / M-CTA
<b>Primer 12</b>	E-ACG / M-CTG
<b>Primer 13</b>	E-ACG / M-CAT
<b>Primer 14</b>	E-ACT / M-CAG
<b>Primer 15</b>	E-ACT / M-CTC
<b>Primer 16</b>	E-AGC / M-CAC
<b>Primer 17</b>	E-AGC / M-CAG
<b>Primer 18</b>	E-AGC / M-CTC
<b>Primer 19</b>	E-AGG / M-CTA

### 3.2.8. Jelin dökülmesi ve örneklerinin yüklenmesi

Yukarıda içeriği belirtilen jel hazırlandıktan sonra hızlı bir şekilde karıştırılıp daha önce yıkanıp silinen cam bloklar arasına döküldü ve 12 örneklik taraklar takıldı. Jelin donması için yaklaşık 1 saat beklendi. Jel donduktan sonra taraklar çıkarılıp cam plakalar tanka uygun biçimde yerleştirildi. Jelin iyi sonuç vermesi için 15 dakika 100 V'de %10'luk TBE tamponunda boş yürütüldü.

PCR ürünlerinden 4 µL alınıp içinde 4 µL spot çözeltisi olan eppendorf tüpe aktarıldı. Hızlıca karıştırılıp 95°C'deki su banyosunda 4-5 dk bekletilen örnekler hızlı soğuma için buza alındı. Örnekler bekletilmeden her kuyuya 4 µL yüklendi ve 160 V'de 2-3 saat yürütüldü.

### 3.2.9. Gümüş boyama

Yürütme işleminden sonra jeldeki bantları görünür hale getirmek için gümüş boyama tekniği kullanıldı. Gümüş boyama aşamaları aşağıdaki gibi uygulandı.

- Cam bloklardan ayrılan jel fixing çözeltisine alınıp çalkalayıcıda 70 rpm hızda 20 dk bekletildi. Bu esnada jeli yıkamak için, uygun miktarda otoklavlanmış soğuk distile su hazırlandı.
- Fiksasyon işleminden sonra jel içinde uygun miktarda soğuk saf su bulunan tanklara aktarılıp 2 dakika elde çalkalamak suretiyle yıkandı. Bu aşama toplamda 3 kez tekrarlandı.
- Son yıkamadan önce daha önceden hazırlanmış olan gümüş nitrat çözeltisine uygun miktarda formaldehit eklenip iyice karışması sağlandı ve yıkama işlemi bittikten sonra jel bu solüsyona alınıp karanlık ortamdaki çalkalayıcıda 70 rpm hızda 30 dk boyanmak üzere çalkalandı.
- Boyama işleminin sonuna doğru, daha önceden hazırlanmış ve buzdolabında saklanan Developer çözeltisine uygun miktarlarda formaldehit ve sodyum tiyosülfat eklenip iyice karışması sağlandı.
- Gümüş boyadan çıkarılan jel önce 10 saniye soğuk suda yıkandı.
- Yıkama işleminden sonra Developer bulunan tanka alınan jel yavaşça çalkalanarak bantların görünürlüğü sağlandı.
- Bantlar görünür hale gelince fiksing solüsyonu ortama eklenerek görüntü sabitlendi.
- Boyama işlemi sonunda jeller altı beyaz düz bir zemine uzatılarak Pentax X90 marka fotoğraf makinasıyla fotoğraflandı. Jeller, uzun süre saklanma için asetat arasına konup buzdolabına +4 °C'ye kaldırıldı.

### 3.2.10. Toplam çözümlü protein miktarı tayini

Yaklaşık 200 mg bitki örneği 0,1 mM dithioeritol (DTT) içeren 0,05 M Tris-HCl tamponunda (pH 8.2) soğutulmuş porselen havan içerisinde homojenize edildi. Homojenat, dört katlı gazlı bezden süzöldükten sonra, süzüntüler 1,5 mL eppendorf

tüplerine alınarak 4°C’de 10.000 g’de soğutmalı santrifüjde 1 saat boyunca santrifüj edildi. Homojenat protein miktar tayini için kullanıldı. İnhibisyon değeri (%IR)

$$1 - \frac{x}{y} \times 100$$

eşitliğine göre hesaplandı. “x” her bir örnekte ölçülen protein değerini simgelerken “y” kontrol örneğindeki protein miktarı olarak belirlendi. Toplam çözünür protein miktarı Bradford (1976) metodu kullanılarak belirlendi.

### 3.2.11. SDS-PAGE analizi

#### 3.2.11.a. Proteinlerin izolasyonu

- Protein izolasyonu için Shultz *et al.* (2005) ve Yanmış (2008)’ın belirttikleri protokol izlendi.
- 0,1g bitki örneği tartılıp 2 mL 0,05M Fosfat buffer (pH: 6.5) içeren tüplere eklendi.
- Örnekler iyice karıştırıldıktan sonra 12000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra örneklere 1 mL TCA-Aseton (%90 aseton, %10 TCA, %0,07 BME) eklenip vortekslendi. İyice karıştırılan örnekler -20°C’de 30 dk bekletildi.
- Daha sonra 6,000 rpm’de 6 dk santrifüj edilen örneklerin süpernatant kısmı dökülerek önceden hazırlanmış aseton/BME ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra örnekler etüvde kurutuldu.

Yukarıda bahsedilen oranlarda hazırlanan ayırma jeli hazırlandıktan sonra bekletilmeden önceden hazırlanıp sabitleştirilen cam bloklar arasına döküldü. Hemen ardından üzerine 1 mL soğuk izopropanol eklenerek ayırma jelinin üst zemininin düzelmesi sağlandı. Yaklaşık 1 saat bekledikten sonra izopropanol döküldü. Üzerine taze hazırlanmış yığma jeli çözeltisi eklenip taraklar yerleştirildi. Yığma jelinin kuruması için 20 dk beklendi. Daha sonra taraklar çıkarılarak jel yüklemeye hazır hale getirildi.

### 3.2.12. Numunelerin yüklenmesi ve jellerin boyanması

SDS içeren yükleme tamponu kurutulan ve 40 mg/mL protein içeren örneklere eklenip su banyosunda 95 °C'de 5 dk inkübe edildi. Daha sonra çıkarılan örnekler buz içeren kaba alınıp önceden hazırlanmış SDS-PAGE jeline yüklendi (Laemmli 1970). Yığılma jelde 90 V'de yürütülen örnekler ayırma jeline gelince Voltaj 150'ye çıkarıldı. Yürütme işleminden sonra cam bloklardan ayrılan jel soğuk fiksasyon çözeltisine bırakıldı ve çalkalamadan yaklaşık 45 dk bekletildi. Fiksasyondan çıkarılan jel boyama çözeltisine aktararak yaklaşık 1 saat beklendi. Boyama süresi sonunda jel önce Solüsyon 1 ile sonra da Solüsyon 2 ile 10'ar dakika yıkandı. Bantlar görünür hale gelinceye kadar Solüsyon 2'de bekletildi. İşlem sonunda düz bir zemine alınan jelin Pentax X90 marka fotoğraf makinası ile fotoğrafları çekildi.

### 3.2.13. Hormon ekstraksiyon, saflaştırma ve analiz İşlemleri

#### 3.2.13.a. Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri

Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri Kuraishi vd. (1991) ile Battal ve Tileklioğlu (2001) metotlarına göre üç tekrarlı olarak yapıldı. Derin dondurucudan çıkarılan küçük parçalar halindeki örnekler sıvı azot içerisinde bir havan yardımıyla toz haline getirildi.

Toz haline getirilen örnekler üzerine +4°C'de bekletilen %80'lik metanol ilave edildi ve 10 dakika ultra doku parçalayıcıda (Jencons) homojenize edildi. Numuneler homojenize edildikten sonra, 4°C'de ve karanlıkta 24 saat bekletildi. Örnekler Whatman No:1 filtre kâğıdından süzüldü ve supernatant alındıktan sonra kalan parçalar tekrar aynı işlemlere tabii tutuldu ve sonra her iki supernatant birleştirildi. Birleştirilen supernatantlar tekrar 0,45 µm'lik PTFE filtrelerinden (Milipore) geçirildi ve bir evaporator pompası yardımıyla 35°C'de kurutuldu. Kurutulan ekstraktlar 0,1 M'lık  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH.8) tamponunda tekrar çözüldü. Çözünen ekstraktlarda bulunan yağ asitlerini ayırmak için örnekler 1 saat 4°C'de 5.000 rpm'de sanrifüj edildi. Supernatant otomatik pipetle tüplerden alındı ve bir beher içerisine bırakıldı. Fenolik bileşikleri ve renk maddelerini

ayırmak için her örneğe ait 1'er gramlık çözünmeyen PVPP çözeltisi döküldü ve süpernatantın bulunduğu beher içerisine bırakılarak, iyice karıştırıldı (Hernandez-Miñana 1991; 1984).

PVPP ile karıştırılan süpernatantlar Whatman no:1 filtre kâğıdından süzülerek PVPP'den ayrıldı. Ekstrakt alınarak ya hemen kullanıldı ya da daha sonra kullanılmak üzere -20°C de saklandı (Cheikh and Jones 1994). Daha spesifik ayırma yapabilmek için Sep-Pak C18 (Waters ) kartuşları kullanıldı (Macháčková *et al.* 1993). Kartuşlar kullanılmadan önce aşağıdaki açıklandığı şekilde şartlandırıldı.

**Şartlandırma işlemi:** Kartuşlar önce 2,5 mL %80'lik metanolden geçirildikten sonra, 2,5 mL saf suyla yıkanmak suretiyle kullanıma hazırlandı. Süpernatantlar (dondurulmuşsa çözünmesi beklendikten sonra) 5 mL'lik şırıngalarla şartlandırılmış Sep-Pak C18 kartuşlarından (1 mL /dk) geçirildi. Kartuşlar tarafından adsorbe edilen hormonlar %80'lik metanolde (1 g'lık taze örnekler için 2,5 mL ) çözünmek suretiyle küçük şişelere alındı. Küçük şişelere alınan numuneler HPLC analizleri için kullanıldı.

### **3.2.13.b. Sıvı kromatografi (HPLC) ile analiz şartları**

Çalışmamızda giberelik asit (GA), zeatin (ZA), indol asetik asit (IAA) ve absisik asit (ABA) analizlerinde HPLC kullanıldı (Morris *et al.* 1990). HPLC analizleri aşağıdaki sistemler kullanılarak yapıldı. Araştırmamızda basıncı 5000 psi'ye kadar çıkabilen Waters 6000 A pompa kullanıldı. Dedektör olarak kullanılan Waters marka ve PU 4020 model UV detektörünün en uygun dalga boyunun ise 254 nm olduğu tespit edildi (Erez 2009).

**İzokratik sistem:** Bu sistemde, sabit konsantrasyondaki mobil fazın dakikadaki 2 mL /dk. akış hızı ile beraber maddelerin kolonlardaki alıkonma zamanına bağlı olarak birbirlerinden ayrılabilmesi temeline dayanmaktadır. Çalışmamızda izokratik sistem kullanıldı (Taylor *et al.* 1990).

**Kaydedici:** (Integrator): Dedektörün gönderdiği uyarılar Breze adlı yazılım kullanılarak bilgisayar ortamına kaydedildi.

**Mobil faz:** Çalışmamızda %13'lük asetonitrile (HPLC'ye özgü, Merck ) tampon olarak 40 mM TEAA ilave edildi ve pH'sı 4,98'e ayarlanan mobil faz kullanıldı (Chamberlain 1995).

**Degaze işlemi:** Millipore marka vakum pompası kullanılarak pH'sı ayarlanan mobil fazda oluşan gazlar uzaklaştırıldı (Erez 2009).

#### **3.2.14. İstatistiksel analizler**

Çimlenme oranları, mitotik indeks, çözünebilir protein miktarları ve hormon analizleri üçer kez tekrarlanmış ve elde edilen veriler, SPSS v. 16.0 paket programı kullanılarak istatistiki analizleri (one way ANOVA) yapılmıştır. Veri ortalamaları arasındaki önemli düzeydeki ( $P < 0,05$ ) farklılıklar ise Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. AFLP analizlerinde ise bantların jeldeki bulunma (1) ve bulunmama (0) durumuna göre değerlendirilmiştir. Aynı paket program kullanılarak dozlar arasındaki benzerlik indeksi Jaccard'a göre yapılmış ve yine SPSS v.16.0 yazılımı kullanılarak UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means) yöntemi ile dendogramlar oluşturulmuştur.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Bitkilerden Elde Edilen Esansiyel Yağların İçerikleri

Altı farklı türden elde edilen esansiyel yağların içeriği GC-MS yöntemiyle analiz edildi. Yağların etki mekanizmalarının kolay anlaşılabilmesi için içeriklerin hangi gruba dâhil oldukları Glasby (1991)'ye göre belirlendi.

GC-MS analizleri sonunda *C. nepeta* L.'nin uçucu yağları %97,33 oranında analiz edildi (Çizelge 4.1). Toplam 13 içerikten 9 tanesinin monoterpenlerden oluştuğu ve en fazla bulunan terpenlerin; %48,66 oranıyla cis-piperiton epoksit, %22,08 oranıyla piperitenon oksit ve %13,51 oranıyla limonen olduğu gözlemlendi. Öte yandan germasiren-D (%0,42)  $\alpha$ -terpinol (%0,38) ve borneol (%0,14)'in ise en az bulunan maddeler oldukları belirlendi (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** GC-MS yöntemiyle *C. nepeta* bitkisinden elde edilen uçucu yağların içerik analizleri

No	RI	RT	İçeriğin Adı	(%) oranı	Tanımlama Metodu	Grup Adı
1	1255	25,65	cis-Piperiton epoksit	48,66	GC, MS, RI	Monoterpenoid
2	1369	30,43	Piperitenon oksit	22,08	GC, MS, RI	Monoterpenoid
3	1037	14,29	Limonen	13,51	GC, MS, RI	Monoterpenoid
4	1178	21,87	Terpinen-4-ol	4,55	GC, MS, RI	Monoterpenoid
5	1419	32,24	$\beta$ -karyofilen	2,21	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
6	1296	27,46	Karvakrol	2,13	GC, MS, RI	Monoterpenoid
7	1313	28,33	Dihidrokarveol asetat	1,24	GC, MS, RI	*
8	1579	39,59	Karyofilen oksit	0,80	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
9	995	13,21	3-Oktanol	0,70	GC, MS, RI	Aliphatics
10	1106	18,07	Linalool	0,51	GC, MS, RI	Monoterpenoid
11	1486	34,87	Germasren D	0,42	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
12	1190	22,82	$\alpha$ -Terpinol	0,38	GC, MS, RI	Monoterpenoid
13	1172	21,59	Borneol	0,14	GC, MS, RI	Monoterpenoid

RI: Retention indices (Tutma indisi)

RT: Retention time (Tutunma süresi)

\* Belirlenemedi

Diğer yandan toplamda 12 farklı içerikle %97,69'u analiz edilen *M. longifolia* türünün içeriklerinin 4'ü sesquiterpen olarak belirlenirken 7'si monoterpen olarak belirlendi. İçeriğin büyük bir kısmını, cis-piperiton epoksit (%26,52), piperitenon oksit (%26,40), pulegon (%15,66), piperitenon (%13,57) oluştururken, en az bulunanlar ise menthon (%1,17), spatulenol (%1,16) ve  $\alpha$ -humulen (%0,53) olarak tespit edildi (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** GC-MS yöntemiyle *M. longifolia* bitkisinden elde edilen uçucu yağların içerik analizleri

No	RI	RT	İçeriğin Adı	(%) oranı	Tanımlama Metodu	Grup Adı
1	1255	25,64	cis-Piperiton epoksit	26,52	GC, MS, RI	Monoterpenoid
2	1369	30,54	Piperitenon oksit	26,40	GC, MS, RI	Monoterpenoid
3	1234	24,77	Pulegon	15,66	GC, MS, RI	Monoterpenoid
4	1345	29,49	Piperitenon	13,57	GC, MS, RI	Monoterpenoid
5	1419	32,27	$\beta$ -karyofilen	3,89	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
6	1165	21,17	Izomenton	2,89	GC, MS, RI	Monoterpenoid
7	1579	39,60	Karyofilen oksit	2,37	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
8	1296	27,55	Karvakrol	2,16	GC, MS, RI	Monoterpenoid
9	1197	22,88	cis-dihidro karvon	1,37	GC, MS, RI	*
10	1159	20,74	Menton	1,17	GC, MS, RI	Monoterpenoid
11	1574	39,40	Spatulenol	1,16	MS, RI	Sesquiterpenoid
12	1460	33,81	$\alpha$ -Humulen	0,53	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid

RI: Retention indices (Tutma indisi)

RT: Retention time (Tutunma süresi)

\* Belirlenemedi

%97,5'i analiz edilen *N. nuda* bitkisinden toplamda 23 farklı içerik tespit edildi. Bu içeriklerden 18'inin monoterpen grubuna dahil olduğu, bunlardan en fazla bulunanların 4 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha$ -nepetalacton (%18,10), germasiren (%15,68) ve elemol (%14,38) olduğu, en az bulunan içeriklerin ise 1,8 sineol (%0,29), elemol asetat (%0,19) ve  $\beta$ -oplofenon (%0,29) olduğu belirlendi (Çizelge 4.3).



**Çizelge 4.3.** GC-MS yöntemiyle *N. nuda* bitkisinden elde edilen uçucu yağların içerik analizleri

No	RI	RT	İçeriğin Adı	(%) oranı	Tanımlama Metodu	Grup Adı
1	1391	31,87	4 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Nepetalakton	18,10	GC, MS, RI	Monoterpenoid
2	1484	34,94	Germasiren	15,68	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
3	1548	37,97	Elemol	14,38	MS, RI	Sesquiterpenoid
4	1417	32,28	$\beta$ - karyofilen	8,81	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
5	1577	39,43	Spatulenol	6,14	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
6	1645	43,28	Kubenol	5,10	GC, MS, RI	Triterpenoid
7	1582	39,61	Karyofilen	4,84	GC, MS, RI	Diterpenoid
8	1500	35,47	Bisiklogermasiren	4,24	MS, RI	Sesquiterpenoid
9	1387	30,67	$\beta$ -Borbonen	3,66	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
10	1452	33,81	$\alpha$ -Humulen	3,18	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
11	1513	36,31	$\gamma$ -Kadinen	3,00	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
12	1652	44,25	$\alpha$ -Kadinol	2,80	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
13	1389	30,90	$\beta$ - Elemen	2,01	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
14	1431	32,69	$\beta$ - Gurjunen	1,14	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
15	1630	42,57	$\gamma$ -Eudesmol	0,98	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
16	1608	41,27	Humulen epoksit II	0,88	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
17	1374	30,29	$\alpha$ -copaen	0,58	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
18	1335	28,33	$\delta$ - Elemen	0,50	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
19	1561	38,61	1-nor-Borbonanon	0,45	MS, RI	*
20	1439	33,30	Aromadendren	0,44	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
21	1026	14,54	1,8 Sineol	0,29	GC, MS, RI	Monoterpenoid
22	1680	45,56	Elemol asetat	0,19	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
23	1607	40,86	$\beta$ -Oplofenon	0,11	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid

RI: Retention indices (Tutma indisi)

RT: Retention time (Tutunma süresi)

\* Belirlenemedi

Tamamı analiz edilen *O. rotundifolium* bitkisinden elde edilen içeriğin %80'ini monoterpenler oluşturdu. İçeriğin %84,48'ini karvakrol ve timol oluşturduken en az bulunan bileşik ise %0,22'lik oranıyla aromadendren olarak belirlendi (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4.** GC-MS yöntemiyle *O. rotundifolium* bitkisinden elde edilen uçucu yağların içerik analizleri

No	RI	RT	İçeriğin Adı	(%) oranı	Tanımlama Metodu	Grup Adı
1	1296	27,72	Karvakrol	43,62	GC, MS, RI	Monoterpenoid
2	1289	27,34	Timol	40,86	GC, MS, RI	Monoterpenoid
3	1034	14,21	p-Simen	5,95	GC, MS, RI	Monoterpenoid
4	1172	21,58	Borneol	2,49	GC, MS, RI	Monoterpenoid
5	1419	32,23	$\beta$ -Karyofilen	2,44	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
6	1579	39,58	Karyofilen oksit	1,71	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
7	1067	15,74	$\gamma$ -Terpinen	1,52	GC, MS, RI	Monoterpenoid
8	1178	21,99	Terpinen-4-ol	0,63	GC, MS, RI	Monoterpenoid
9	1079	16,61	cis-Sabinenhidrat	0,56	GC, MS, RI	Monoterpenoid
10	1442	33,05	Aromadendren	0,22	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid

RI: Retention indices (Tutma indisi)

RT: Retention time (Tutunma süresi)

Aynı cinse ait olmalarına rağmen *O. vulgare* bitkisinin analiz edilen toplam 25 içeriğinin 20'si *O. rotundifolium*'un aksine sesquiterpen olarak belirlendi. Toplam analiz edilen % 96,33'lük içerikten en fazla bulunanlar %34,44 oranıyla karyofilen oksit, %20,40  $\beta$ -karyofilen ve %7,02  $\alpha$ -kadinol iken, en az bulunanlar ise %0,17 oranıyla ledol, %0,9 viridifloren ve %0,33 ile  $\alpha$ -muurolen olarak kaydedildi (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5.** GC-MS yöntemiyle *O. vulgare* bitkisinden elde edilen uçucu yağların içerik analizleri

No	RI	RT	İçeriğin Adı	(%) oranı	Tanımlama Metodu	Grup Adı
1	1579	39,63	Karyofilen oksit	34,44	GC, MS, RI	Sesquiterpen
2	1419	32,27	$\beta$ -Karyofilen	20,40	GC, MS, RI	Sesquiterpen
3	1659	44,25	$\alpha$ -Kadinol	7,02	GC, MS, RI	Sesquiterpen
4	1460	33,80	$\alpha$ -Humulen	4,91	GC, MS, RI	Sesquiterpen
5	1508	35,91	$\beta$ -Bisabolen	4,15	MS, RI	Sesquiterpen
6	1383	30,66	$\beta$ -Burbonen	3,76	GC, MS, RI	Sesquiterpen
7	1644	43,41	epi- $\alpha$ -Murolol	3,19	MS, RI	Sesquiterpen
8	1517	36,32	$\delta$ -Kadinen	2,70	MS, RI	Monoterpenoid
9	1609	41,21	Humulen epoksit II	2,01	GC, MS, RI	Sesquiterpen
10	1595	40,29	Viridiflorol	1,86	MS, RI	Sesquiterpen
11	1546	37,98	Elemol	1,66	GC, MS, RI	Sesquiterpen
12	1486	34,87	Germasiren-D	1,42	MS, RI	Sesquiterpen
13	1042	14,52	1,8-Sineol	1,24	GC, MS, RI	Monoterpenoid
14	1702	47,03	Amorpha-4,9-dien-2-ol	1,12	MS, RI	Sesquiterpen
15	1678	45,50	(Z)- $\alpha$ -Santalol	0,99	GC, MS, RI	Sesquiterpen
16	1190	22,81	$\alpha$ -Terpinol	0,98	GC, MS, RI	Monoterpenoid
17	1178	21,95	Terpinen-4-ol	0,90	GC, MS, RI	Monoterpenoid
18	1560	38,62	$\beta$ -Kalakoren	0,70	MS, RI	Sesquiterpen
19	1633	42,64	$\beta$ -Akorenol	0,68	MS, RI	Sesquiterpen
20	1433	32,70	$\beta$ -Gurjunen	0,58	GC, MS, RI	Sesquiterpen
21	1255	25,57	cis-Piperiton epoksit	0,46	GC, MS, RI	Monoterpenoid
22	1622	41,72	Murola-4,10(14)-dien-1- $\beta$ -ol	0,34	MS, RI	Sesquiterpen
23	1501	35,58	$\alpha$ -Murolen	0,33	GC, MS, RI	Diterpenoids
24	1494	35,25	Viridifloren	0,32	GC, MS, RI	Sesquiterpen
25	1605	40,88	Ledol	0,17	MS, RI	Sesquiterpen

RI: Retention indices (Tutma indisi)

RT: Retention time (Tutunma süresi)

Son olarak *S. hortensis* bitkisinin içeriği %99,99 oranında analiz edildi. Toplamda 15 içeriğin belirlendiği bu türde monoterpenlerin çoğunlukta olduğu gözlemlendi. Karvakrol'un %79,17,  $\gamma$ -terpinen'in ise %9,05 oranlarıyla içeriğin büyük bir kısmını oluşturduğu bu türde diterpen olan  $\gamma$ -Murolen (%0,25) ve timol (% 0,1) en az bulunan içerikler olarak tespit edildi (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6.** GC-MS yöntemiyle *S. hortensis* bitkisinden elde edilen uçucu yağların içerik analizleri

No	RI	RT	İçeriğin Adı	(%) oranı	Tanımlama Metodu	Grup Adı
1	1296	27,43	Karvakrol	79,17	GC, MS, RI	Monoterpenoid
2	1067	15,72	$\gamma$ -Terpinen	9,05	GC, MS, RI	Monoterpenoid
3	1034	14,24	p-simen	3,14	GC, MS, RI	Monoterpenoid
4	1347	29,39	Timol asetat	2,24	GC, MS, RI	Monoterpenoid
5	1419	32,25	$\beta$ -Karyofilen	1,48	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
6	1178	21,99	Terpinen-4-ol	0,96	GC, MS, RI	Monoterpenoid
7	1574	39,40	Spatulenol	0,92	MS, RI	Sesquiterpenoid
8	1172	21,61	Borneol	0,64	GC, MS, RI	Monoterpenoid
9	1023	13,75	$\alpha$ -Terpinen	0,55	GC, MS, RI	Monoterpenoid
10	1513	36,33	$\gamma$ -kadinen	0,51	MS, RI	Sesquiterpenoid
11	1494	35,24	Viridifloren	0,35	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
12	983	11,84	$\beta$ -Pinen	0,33	GC, MS, RI	Monoterpenoid
13	1442	33,04	Aromadendren	0,30	GC, MS, RI	Sesquiterpenoid
14	1478	34,60	$\gamma$ -Murolen	0,25	MS, RI	Diterpenoid
15	1289	26,97	Timol	0,10	GC, MS, RI	Monoterpenoid

RI: Retention indices (Tutma indisi)

RT: Retention time (Tutunma süresi)

#### 4.2. Uçucu Yağların Çimlenme Oranları Üzerine Etkisi

Farklı türlerden elde edilen uçucu yağların dört farklı dozda uygulandığı mısır tohumlarının çimlenme oranları Çizelge 4.7’de gösterildi. Genel anlamda uygulanan yağların, çimlenme oranlarında artan doza bağlı olarak inhibisyonlara neden oldukları belirlendi. *C. nepeta*, *M. longifolia*, *O. rotundifolium* ve *S. hortensis* bitkilerinden elde edilen yağlar artan doza bağlı olarak düzenli bir şekilde çimlenme oranlarını düşürürken *N. nuda*, ve *O. vulgare* bitkilerinin yağlarının ise genel olarak çimlenmeyi olumsuz etkilediği fakat bu etkiyi doz artışına bağlı olarak göstermedikleri tespit edildi. Kontrol örneklerinde çimlenme oranları ortalama %91,08 olarak ölçülürken, en düşük çimlenme oranları, 0,8  $\mu$ L/mL dozlarında *C. nepeta* ve *M. longifolia* türlerinde gözlemlendi. Çimlenme oranlarını en yüksek dozda en az etkileyen tür ise 0,8  $\mu$ L/mL dozda %60’lık çimlenme oranıyla *N. nuda* olarak belirlendi (Çizelge 4.7).

**Çizelge 4.7.** Altı farklı türden, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış uçucu yağların mısır tohumlarının çimlenme oranları üzerine (%) etkisi

	<i>C. nepeta</i>	<i>M. longifolia</i>	<i>N. nuda</i>	<i>O. rotundifolium</i>	<i>O. vulgare</i>	<i>S. hortensis</i>
<b>Kontrol</b>	13,66±0,88	13,66±1,33	11,33±0,88	14,00±0,57	11,33±0,66	14,00±1,00
<b>0,1 µL/mL</b>	10,33±1,15	10,00±0,00	11,33±0,33	12,33±0,33	9,00±1,52	10,33±1,33
<b>0,2 µL/mL</b>	7,00±1,20	9,00±0,57	9,33±0,57	9,66±1,33	6,66±0,88	9,00±1,52
<b>0,4 µL/mL</b>	2,66±1,00	5,00±1,52	10,00±1,00	5,33±0,66	5,66±1,20	7,00±0,00
<b>0,8 µL/mL</b>	2,00±0,88	2,00±0,57	9,00±0,88	2,00±1,00	7,33±0,88	6,66±2,02

Duncan's multiple range testine göre  $P \leq 0,05$  seviyesinde önemli

### 4.3. Uçucu Yağların Kök Ucu Hücrelerinin Mitotik İndeksleri Üzerine Etkisi

Dört farklı dozda uygulanan esansiyel yağların tamamının çimlenen mısır tohumlarında mitoz bölünmeyi olumsuz etkilediği belirlendi. Mitoz bölünme frekansının, uygulanan uçucu yağların, artan dozlarına bağlı olarak azaldığı tespit edildi (Çizelge 4.8). Esansiyel yağ uygulanan *Zea mays L.* kök ucu hücrelerinde, mitoz bölünmenin farklı evrelerinde çeşitli kromozomal anormallikler gözlemlendi (Şekil 4.1). *O. rotundifolium*'un 0,1µL/mL dozda meydana getirdiği değişim önemsizken diğer dozlarda artan yağ miktarına bağlı olarak mitotik indeks yüzdesinde azalmalar gözlemlendi. *C. nepeta* ve *N. nuda* bitkilerinin uçucu yağlarının uygulandığı 0,8µL/mL dozlarında, kontrole göre önemli sayılabilecek düzeyde inhibisyon gözlemlendi.

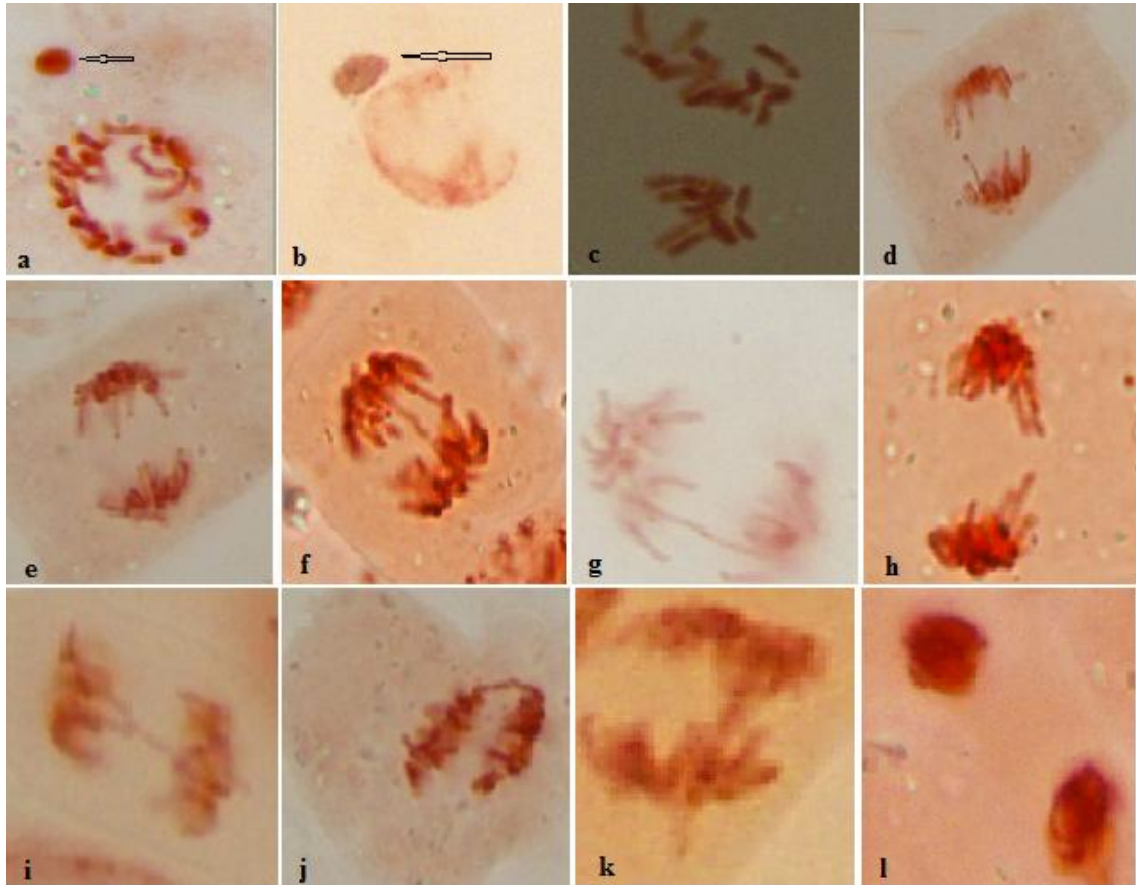
**Çizelge 4.8.** Altı farklı türün esansiyel yağının uygulandığı *Zea mays L.* kök uçlarından hesaplanan mitotik bölünme yüzdeleri

Doz	Mitotik indeks					
	<i>C. nepeta</i>	<i>M. longifolia</i>	<i>N. nuda</i>	<i>O. rotundifolium</i>	<i>O. vulgare</i>	<i>S. hortensis</i>
Kontrol	19,3 <sup>a*</sup>	19,3 <sup>a*</sup>	19,3 <sup>a*</sup>	19,3 <sup>a*</sup>	19,3 <sup>a*</sup>	19,3 <sup>a*</sup>
0,1µL/mL	17,8 <sup>b</sup>	19,1 <sup>a</sup>	18,0 <sup>ab</sup>	18,5 <sup>a</sup>	18,2 <sup>a</sup>	18,8 <sup>a</sup>
0,2µL/mL	13,7 <sup>c</sup>	18,0 <sup>a</sup>	17,5 <sup>b</sup>	16,4 <sup>b</sup>	17,1 <sup>a</sup>	16,1 <sup>b</sup>
0,4µL/mL	13,4 <sup>c</sup>	12,5 <sup>b</sup>	14,2 <sup>c</sup>	13,9 <sup>c</sup>	12,4 <sup>b</sup>	14,6 <sup>b</sup>
0,8µL/mL	11,7 <sup>d</sup>	12,7 <sup>b</sup>	11,9 <sup>d</sup>	13,5 <sup>c</sup>	12,2 <sup>b</sup>	12,0 <sup>c</sup>
Ortalama	15,2	16,3	16,2	16,3	15,8	16,2
F (Doz)	46,65 <sup>**</sup>	30,13 <sup>**</sup>	38,59 <sup>**</sup>	17,54 <sup>**</sup>	17,04 <sup>**</sup>	21,63 <sup>**</sup>
CV %	5,4	6,7	5,3	6,7	8,9	7,0

\* ve \*\* sırasıyla %5 ve %1 önem seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

VK: Varyasyon Katsayısı

Aynı kolondaki aynı harfle ifade edilmiş örnekler arasında önemli fark yoktur (P<0,05)



**Şekil 4.1.** Kromozomal anormallikler.

a,b= mikronükleus, c=düzensiz metafaz, d,e=anafazda geri kalmış kromozom, f,g=anafaz köprüleri, h=telofazda geri kalmış kromozom, i,j,k=telofaz köprüleri, l= telofazda yanlış kutuplaşma

#### 4.4. Uçucu Yağların uygulandığı *Zea mays* L. örneklerinin RAPD Profilleri

Çalışmada altı farklı bitkiden elde edilen esansiyel yağların uygulanmasıyla çimlendirilen mısır tohumlarından elde edilen kök ve gövde sürgünlerinden total genomik DNA izole edilip, RAPD-PCR tekniğiyle bant profilleri değerlendirildi. 16 farklı primer kullanılarak elde edilen jel görüntüleri Total LAB TL 120 bilgisayar yazılımı kullanılarak, bantların baz uzunlukları, polimorfizm oranları ve GTS değerleri ölçüldü.

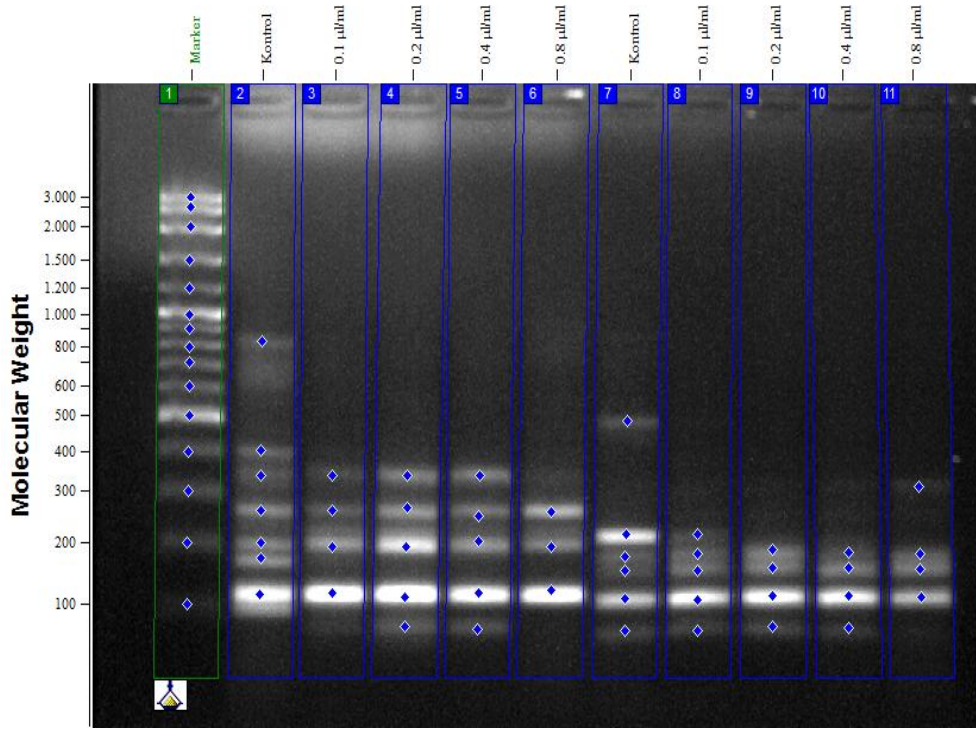
Yağ içeriğinin %48,66'sı cis-piperiton epoksit olan *C. nepeta*'dan elde edilen içeriklerin uygulandığı *Zea mays* L.'in RAPD profillerinde meydana gelen değişiklikler Çizelge 4.9'da sunuldu. Mevcut bantların kaybolması veya yeni oluşan bantlar olarak değerlendirilen polimorfik bantların, artan esansiyel yağın dozuna bağlı olarak arttığı tespit edildi. Buna bağlı olarak GTS değerlerinin doza bağlı olarak sırasıyla %63,05, %52,18, %52,18 ve %44,56 şeklinde azaldığı gözlemlendi (Çizelge 4.9). Buna ilaveten bazı bazı primerlere (OPH-18 ve OPY-6) karşı uçucu yağların farklı dozlarda bant yoğunluklarını da değiştiği belirlendi (Şekil 4.2).

**Çizelge 4.9.** *C. nepeta*'dan elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarının kontrollerinde meydana gelen bantlar ile tüm primerlere karşı elde edilen polimorfik bantların moleküler uzunlukları, GTS ve polimorfizm oranları

Primer	<i>C. nepeta</i>					
	Kontrol		0,1µL/mL	0,2µL/mL	0,4µL/mL	0,8µL/mL
OPA-13	5	+	391	391	391	391
		-	575;556	575;556	575;556	575;556
OPH-17	7	+	ND	541	541	541
		-	710; 595;566;517;491	1429;595;566;517;491	595;566;517;491	1429; 566;517;491
OPA-2	6	+	ND	ND	ND	563;404
		-	1045	1045;825;686	1045;825;686;433;356	1045;825;686
OPA-1	7	+	ND	ND	ND	401
		-	ND	ND	ND	ND
OPA-6	2	+	ND	644;546;373	546;323	546;323
		-	ND	ND	ND	ND
OPH-14	4	+	ND	ND	ND	ND
		-	835;740	835	835	835
OPH-18	7	+	ND	162	162	ND
		-	828;502;273	828;502;273	828;502;273	828;502;273
OPY-6	6	+	ND	ND	ND	411
		-	580	580;314	580;314	580;314;154
OPY-1	7	+	435	ND	435	435
		-	228	545;228	545;260;228;171	545;228;171
OPY-8	7	+	ND	ND	ND	ND
		-	1128;421	1128;421;304;240;216	1128;421;304;240;216	1128;451;421;304;240;216
OPY-15	1	+	ND	ND	ND	ND
		-	ND	ND	ND	ND
OPY-16	6	+	ND	ND	248	678;580;248
		-	1200;466	1200;466	ND	ND
OPW-1	5	+	ND	486	ND	818;486
		-	ND	ND	ND	ND
OPB-8	9	+	284	284	ND	ND
		-	1876;744;587;479;438	1876;744;587;438	1876;744;587;479;438	1876;744;587;479;438
OPW-7	5	+	189	189	ND	ND
		-	907;836	907;836	907;836;509	907;836
OPW-5	8	+	772;329	329	772	772;329
		-	1237;466	1237;466;435	1237;435	1237;466;435
<b>Toplam bant</b>	92		34	44	44	51
<b>Polimorfizm oranı</b>			36,95	47,82	47,82	55,44
<b>GTS oranı</b>			63,05	52,18	52,18	44,56

ND: Belirlenmedi, -:Kaybolan bantlar, +:Oluşan bantlar.





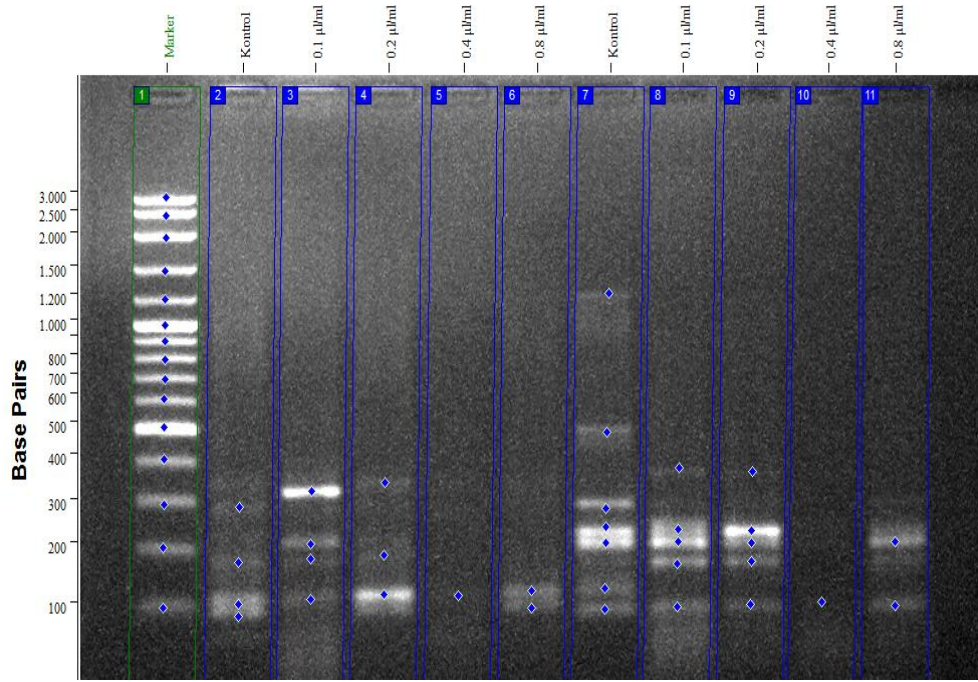
**Şekil 4.2.** *C. nepeta*'dan elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarından elde edilen DNA örneklerinin OPH-18 ve OPY-6 primerlerine karşı gösterdiği amplifikasyon ürünleri

*M. longifolia*'dan elde edilen esansiyel yağların, uygulandıkları mısır tohumlarının RAPD profillerinde meydana getirdikleri değişimler Çizelge 4.10'da sunuldu. Polimorfik bant sayılarının doza bağlı olarak sırasıyla 33, 30, 27, 23 şeklinde azaldığı buna bağlı olarak GTS değerlerinde sırasıyla %64,13, %67,39, %70,65 ve %75 şeklinde arttığı tespit edildi (Çizelge 4.10). Bu türden elde edilen uçucu yağların uygulandığı *Zea mays* L. tohumlarının örnek jel görüntüsü Şekil 4.3'te sunuldu. Uygulamalarda en az polimorfik bantı OPW-5 primeri gösterirken, OPY-15 ve OPY-16 (Şekil 4.3) primerleri is en fazla polimorfik bantlar oluşturan primerler olarak kaydedildi.

**Çizelge 4.10.** *M. longifolia*'dan elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarının kontrollerinde meydana gelen bantlar ile tüm primerlere karşı elde edilen polimorfik bantların moleküler uzunlukları, GTS ve polimorfizm oranları

Primer	<i>M. longifolia</i>						
	Kontrol		0,1µL/mL	0,2µL/mL	0,4µL/mL	0,8µL/mL	
OPA-13	5	+	357	357	357	ND	
		-	462	462	462	462	
OPH-17	7	+	ND	140	ND	140	
		-	387	ND	ND	ND	
OPA-2	6	+	ND	ND	286	286	
		-	384	384	384	384	
OPA-1	7	+	ND	ND	ND	ND	
		-	404	404;61	404;321	404	
OPA-6	2	+	479	ND	ND	ND	
		-	338	ND	ND	ND	
OPH-14	4	+	421	421	421	421	
		-	110	110	110	110	
OPH-18	7	+	ND	ND	ND	ND	
		-	282;81	282;81	282;81	282;81	
OPY-6	6	+	386	386	ND	ND	
		-	114	114	114	ND	
OPY-1	7	+	ND	490	ND	ND	
		-	308	308	ND	ND	
OPY-8	7	+	ND	ND	ND	ND	
		-	428	428	428	428;308;203	
OPY-15	1	+	328; 208	345	ND	ND	
		-	294;85	294	294;170;85	294;170	
OPY-16	6	+	378;168	378;168		168	
		-	1257;484;291;128	1257;484;291;128	1257;484;291;128	1257;484;291;248;128	
OPW-1	5	+	ND	ND	ND	324	
		-	184;159;138	184;159	184;159	184;159	
OPB-8	9	+	ND	ND	ND	ND	
		-	ND	341;217;132	341;217;132	ND	
OPW-7	5	+	494;289;183	494;289	494;289	ND	
		-	313	ND	ND	ND	
OPW-5	8	+	521	ND	521	ND	
		-	ND	ND	ND	ND	
<b>Toplam bant</b>	92		33	30	27	23	
<b>Polimorfizm oranı</b>			45,87	32,61	29,35	25	
<b>GTS oranı</b>			64,13	67,39	70,65	75	

ND: Belirlenmedi, -:Kaybolan bantlar, +:Oluşan bantlar.



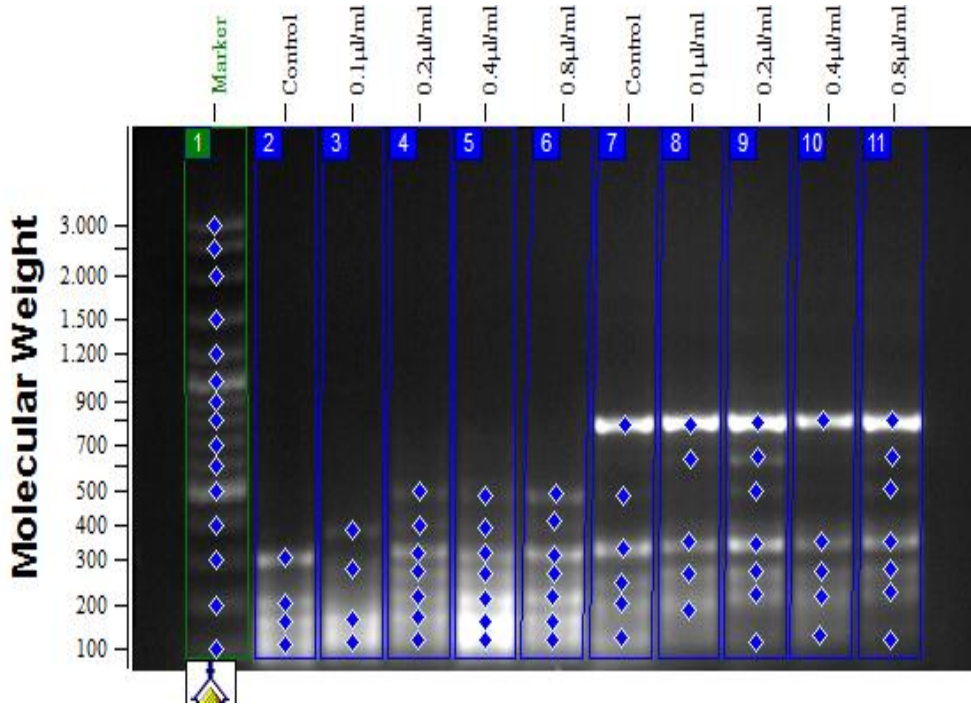
**Şekil 4.3.** *M. longifolia*'dan elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarından elde edilen DNA örneklerinin OPY-15 ve OPY-16 primerlerine karşı gösterdiği amplifikasyon ürünleri

Zengin yağ içeriğine sahip *N. nuda*'dan elde edilen içeriklerin artan dozlarda polimorfizm oranının düşürdüğü (44, 41, 41 ve 37) GTS değerlerinin ise normale yaklaşıyorak %56,43 %59,40, %59,40 ve %63,36 şeklinde arttırdığı gözlemlendi. (Çizelge 4.11, Şekil 4.4).

**Çizelge 4.11.** *N. nuda*'dan elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarının kontrollerinde meydana gelen bantlar ile tüm primerlere karşı elde edilen polimorfik bantların moleküler uzunlukları, GTS ve polimorfizm oranları

Primer	Kontrol	<i>N. nuda</i>			
		0,1µL/mL	0,2µL/mL	0,4µL/mL	0,8µL/mL
OPA-13	5	+ 385; 273	483; 385; 273	483; 385; 273	483; 385; 273
		- 306; 205	ND	ND	ND
OPH-17	7	+ 644,	644	ND	644
		- 483; 124	ND	483	ND
OPA-2	6	+ ND	ND	ND	355;
		- 718; 479; 447; 294	718; 479; 294; 236	718; 479; 294; 236	718; 479; 236
OPA-1	7	+ ND	ND	ND	ND
		- ND	239; 288	577	ND
OPA-6	2	+ 340	340	340	340
		- ND	ND	ND	ND
OPH-14	4	+ ND	855;	ND	929; 729
		- 755; 405	1138; 914	1138; 914; 405	1138
OPH-18	7	+ ND	ND	ND	275;
		- 817; 555; 504; 400	817; 555; 504; 400	817; 555; 504; 400	817; 555; 504
OPY-6	6	+ ND	403	ND	ND
		- 500; 441	ND	686	ND
OPY-1	7	+ 320; 259; 156;	320; 259; 156;	320; 259; 156; 132	320; 259; 156;
		- 216	ND	448;	ND
OPY-8	7	+ ND	ND	ND	ND
		- 1085; 792	1085; 792	1085; 792	1085; 792
OPY-15	1	+ 375;	989; 375;	ND	989; 375;
		- 721; 500; 409	500	721; 500; 409	500
OPY-16	6	+ ND	ND	ND	ND
		- 707	707; 549	707; 549	707; 549
OPW-1	5	+ ND	ND	ND	ND
		- ND	ND	ND	ND
OPB-8	9	+ 485;	485;	485;	ND
		- 451; 131	131	131	131
OPW-7	5	+ 389;	ND	389;	629; 389
		- 693; 543; 358; 310	693; 543; 310	693;	693;
OPW-5	8	+ 721	1388; 800; 721;	389;	1270; 721; 537;
		- 1122; 594; 422; 361; 185	594; 422; 361	1322; 594; 422; 361; 185	1322; 422; 361; 185
<b>Toplam bant</b>	92	44	41	41	37
<b>Polimorfizm oranı</b>		47,83	44,57	44,57	40,22
<b>GTS oranı</b>		52,17	55,43	55,43	59,78

ND: Belirlenmedi, -:Kaybolan bantlar, +:Oluşan bantlar.



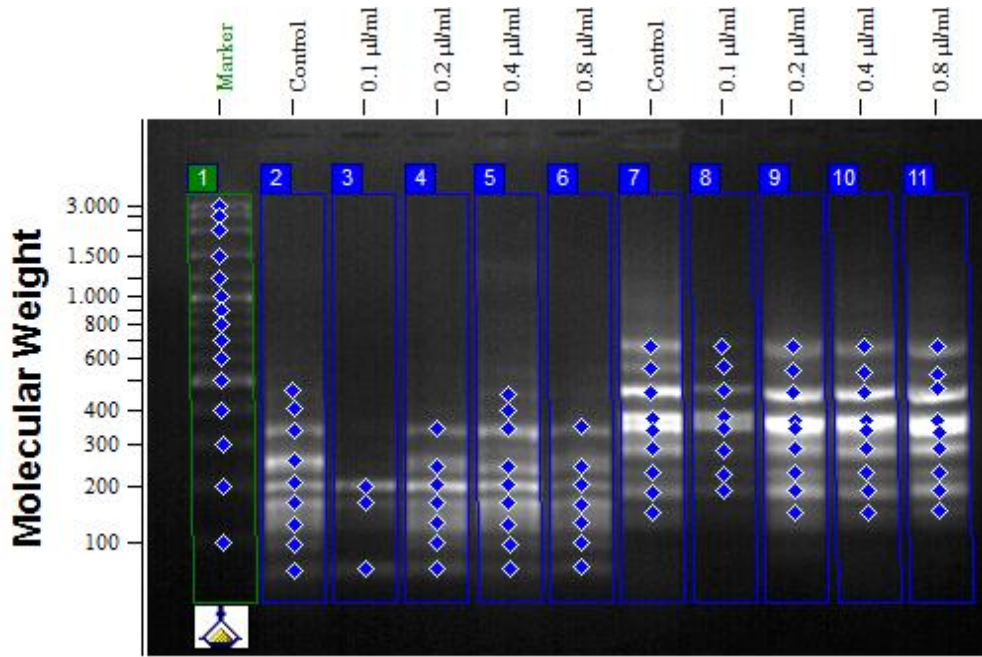
**Şekil 4.4.** *N. nuda*'dan elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarından elde edilen DNA örneklerinin OPA-13 ve OPH-17 primerlerine karşı gösterdiği amplifikasyon ürünleri

*O. rotundifolium* bitkisinin uçucu yağlarının, mısır bitkisinin RAPD profillerinde, son doz hariç artan doza bağlı olarak GTS değerini %52,17, %67,39, %85,86 ve %71,73 oranlarında arttırdığı, polimorfizm oranlarını ise 47,83, 32,61, 14,14, ve 22,26 şeklinde düşürdüğü tespit edildi. Bant yoğunluklarının ve polimorfik bant oluşumunun en fazla olduğu doz birinci (0,1 µL/mL) doz olarak belirlendi. Oluşan 62 polimorfik bandın 15 tanesi yeni oluşurken 47 tanesinin ise kaybolan bantlar olduğu tespit edildi. (Çizelge 4.12, Şekil 4.5).

**Çizelge 4.12.** *O. rotundifolium*'dan elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarının kontrollerinde meydana gelen bantlar ile tüm primerlere karşı elde edilen polimorfik bantların moleküler uzunlukları, GTS ve polimorfizm oranları

Primer	<i>O. rotundifolium</i>					
	Kontrol		0,1µL/mL	0,2µL/mL	0,4µL/mL	0,8µL/mL
OPA-13	5	+	ND	396	ND	ND
		-	358	ND	ND	470
OPH-17	7	+	ND	ND	554	554
		-	1515,495,372	1515,495,372,265	ND	1515
OPA-2	6	+	ND	ND	ND	ND
		-	461,405,341,261,128,94	461,405	ND	461,405
OPA-1	7	+	ND	ND	ND	ND
		-	150	ND	ND	ND
OPA-6	2	+	ND	715,531	715	715
		-	658,350,239	658	239	239
OPH-14	4	+	ND	556	ND	ND
		-	936,831,713,642,520	936,831,642	642	936,831,642
OPH-18	7	+	416	416	934,416	ND
		-	ND	ND	ND	ND
OPY-6	6	+	ND	1027	1027	ND
		-	521,450,370,180,146	ND	ND	ND
OPY-1	7	+	ND	641,497	497	497
		-	565,345	ND	ND	ND
OPY-8	7	+	ND	ND	ND	ND
		-	830,649	830,649	649	649
OPY-15	1	+	ND	ND	ND	ND
		-	724,632	724,632	632	724,632
OPY-16	6	+	572	ND	ND	ND
		-	542,369	369	ND	542
OPW-1	5	+	ND	ND	ND	ND
		-	705,165	705,165	165	165
OPB-8	9	+	ND	ND	628	ND
		-	469,300	469,332,300	ND	469,359,332,300
OPW-7	5	+	ND	ND	ND	ND
		-	517,486,324	517	ND	ND
OPW-5	8	+	ND	728	349	179
		-	582,528,316	ND	ND	582,528,466,424,316
<b>Toplam bant</b>	92		44	30	13	26
<b>Polimorfizm oranı</b>			47,83	32,61	14,14	28,26
<b>GTS oranı</b>			52,17	67,39	85,86	71,73

ND: Belirlenmedi, -:Kaybolan bantlar, +:Oluşan bantlar.



**Şekil 4.5.** *O. rotundifolium*'dan elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarından elde edilen DNA örneklerinin OPA-2 ve OPA-1 primerlerine karşı gösterdiği amplifikasyon ürünleri

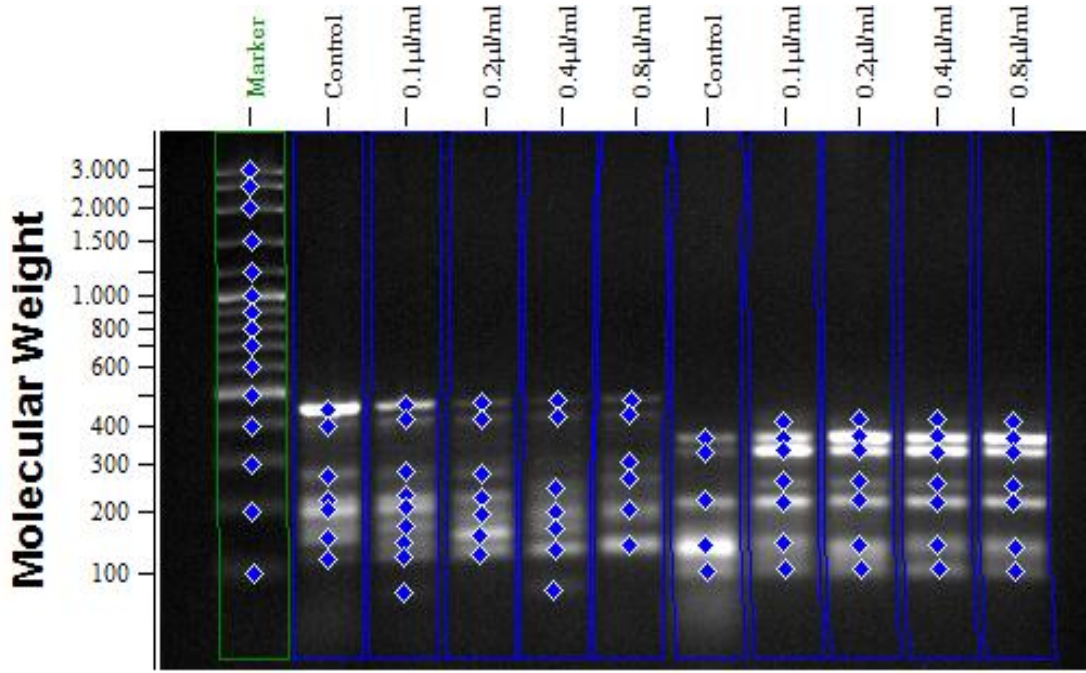
Kimyasal içeriği en çeşitli tür olan *O. vulgare*'nin bu içeriklerinin dört farklı dozda uygulandığı *Zea mays* L.'da meydana gelen değişiklikler Çizelge 4.13'te sunuldu. En fazla polimorfik bant, uygulanan 0,4µL/mL dozunda gözlemlendi. Polimorfik bantların uygulanan ilk 3 dozda arttığı, dördüncü dozda ise bu oranın kısmen de olsa azaldığı gözlemlendi. Buna bağlı olarak GTS değerlerinin 0,1, 0,2, 0,4 ve 0,8 µL/mL için sırasıyla %77,17, %67,39, %63,04 ve %65,21 şeklinde kısmen doza bağlı olarak azaldığı gözlemlendi. Buna ilaveten Şekil 4.6'daki jel görüntüsünden de görüldüğü gibi bant yoğunluklarının da değiştiği gözlemlendi.

**Çizelge 4.13.** *O. vulgare*'den elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarının kontrollerinde meydana gelen bantlar ile tüm primerlere karşı elde edilen polimorfik bantların moleküler uzunlukları, GTS ve polimorfizm oranları

Primer	<i>O. vulgare</i>					
	Kontrol		0,1µL/mL	0,2µL/mL	0,4µL/mL	0,8µL/mL
OPA-13	5	+	ND	425	425	ND
		-	523;271	ND	ND	271
OPH-17	7	+	648;	224	224;134	ND
		-	528	ND	ND	ND
OPA-2	6	+	ND	73	73	73
		-	ND	765; 490;273;184	1428;765; 490;273;184	1428;765; 490;184
OPA-1	7	+	ND	ND	ND	172
		-	ND	ND	ND	495;305
OPA-6	2	+	ND	220	185;131	220;185
		-	ND	ND	ND	ND
OPH-14	4	+	436	436	436;241	436;280
		-	158	158	ND	ND
OPH-18	7	+	ND	ND	ND	ND
		-	ND	ND	ND	ND
OPY-6	6	+	131	366;107	366; 107	366; 107
		-	593;314;153	593; 314;153	593; 314;153	593; 314;153
OPY-1	7	+	ND	ND	214	ND
		-	ND	ND	ND	ND
OPY-8	7	+	251	251	251	251
		-	ND	ND	ND	ND
OPY-15	1	+	400;319;275	275;60	275;60	400; 319; 275
		-	584;452;336;168	;584; 452; 336;202	584; 452; 336	584; 452; 336;168
OPY-16	6	+	ND	186	186;140	ND
		-	ND	547;357;202;168	357;168	547
OPW-1	5	+	204	204	204	204
		-	ND	ND	ND	306
OPB-8	9	+	ND	319	319	ND
		-	ND	ND	ND	229
OPW-7	5	+	ND	ND	ND	ND
		-	ND	ND	400	ND
OPW-5	8	+	270;144	144	144	144
		-	ND	ND	951	647
<b>Toplam bant</b>	92		21	30	34	32
<b>Polimorfizm oranı</b>			22,83	32,61	36,96	34,79
<b>GTS oranı</b>			77,17	67,39	63,04	65,21

ND:None Detection(Tespit edilmedi) -:Kaybolan bantlar +:Oluşan bantlar





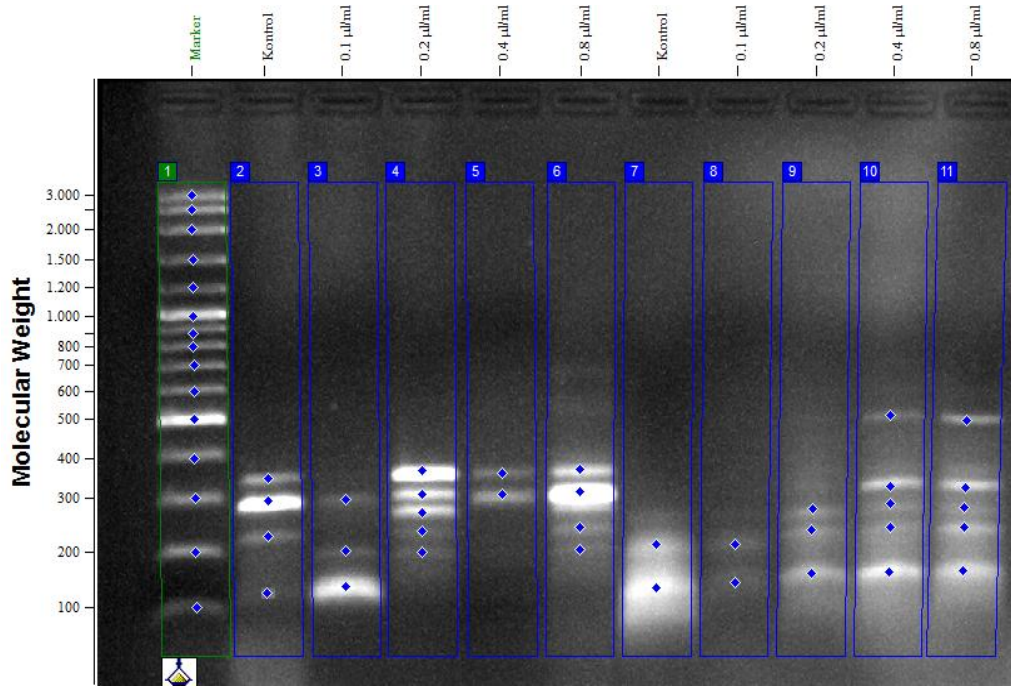
Şekil 4.6. *O. vulgare*'den elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarından elde edilen DNA örneklerinin OPY-1 ve OPY-8 primerlerine karşı gösterdiği amplifikasyon ürünleri

Son olarak polimorfizm oranının genel olarak yüksek görüldüğü *S. hortensis* bitkisinde mısır tohumlarının RAPD bant yoğunluklarının da fark edilir derecede değiştiği gözlemlendi. (Şekil 4.7). Tüm dozlardaki polimorfik bantların sayısı; 24'ü yeni oluşan, 33 ise eksilen bant olmak üzere toplam 67 adet olarak belirlendi. OPW primerinde herhangi bir polimorfizme rastlanmadı. GTS değerleri ise artan doza bağlı olarak sırasıyla; % 65,21, % 56,52, % 58,69 ve % 56,52 olarak belirlendi (Çizelge 4.14).

**Çizelge 4.14.** *S. hortensis*'ten elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarının kontrollerinde meydana gelen bantlar ile tüm primerlere karşı elde edilen polimorfik bantların moleküler uzunlukları, GTS ve polimorfizm oranları

Primer	<i>S. hortensis</i>					
	Kontrol		0,1µL/mL	0,2µL/mL	0,4µL/mL	0,8µL/mL
OPA-13	5	+	249	469;346;249	469;249	469;249
		-	297;260;230	260;230	260;230	260;230
OPH-17	7	+	ND	ND	ND	ND
		-	ND	ND	442;400;274	ND
OPA-2	6	+	335	335	ND	335
		-	715;170	715;170	715;246;170	715
OPA-1	7	+	232	232	232	232
		-	616;30	616;30	616;30	616;30
OPA-6	2	+	ND	ND	ND	ND
		-	601	601	601	601
OPH-14	4	+	194	194	ND	194
		-	892;400	892;400	892	892
OPH-18	7	+	ND	ND	ND	ND
		-	576;397	576;397	576;397	576;397
OPY-6	6	+	260	260	260	260
		-	685	685	685	685
OPY-1	7	+	407;261	407;261	ND	407;261;227
		-	ND	455	455	455
OPY-8	7	+	ND	323;218;197;128	323;218;128	323;218;128
		-	ND	353;105	353;105	353;105
OPY-15	1	+	ND	ND	ND	ND
		-	420;387;262	387;262	387;262;211	387;262
OPY-16	6	+	1292;1058;266	1292;1058;352;266	ND	1292;1058;352;266
		-	655	655	655;383;192	761;655
OPW-1	5	+	301	369;301	ND	301
		-	450;325	238	325;238	238
OPB-8	9	+	ND	376	613;429;376	613;429;376
		-	ND	ND	ND	ND
OPW-7	5	+	ND	ND	ND	ND
		-	ND	ND	ND	ND
OPW-5	8	+	854	854	854	854
		-	237	ND	192	192
<b>Toplam bant</b>	92		32	40	38	40
<b>Polimorfizm oranı</b>			34,79	43,48	41,31	43,48
<b>GTS oranı</b>			65,21	56,52	58,69	56,52

ND: Belirlenmedi, -:Kaybolan bantlar, +:Oluşan bantlar.

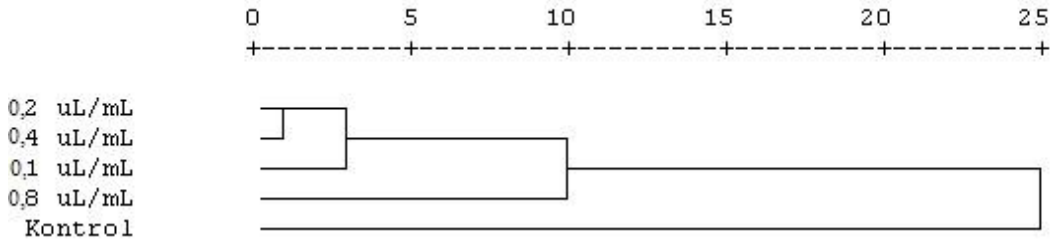


**Şekil 4.7.** *S. hortensis*'ten elde edilen esansiyel yağların uygulandığı mısır tohumlarından elde edilen DNA örneklerinin OPW-1 ve OPB-8 primerlerine karşı gösterdiği amplifikasyon ürünleri

#### 4.5. AFLP Analizleri

Altı farklı bitkiden elde edilen uçucu yağların dört farklı dozda uygulandığı mısır tohumlarından elde edilen DNA örnekleri arasında oluşan genetik farklılıkları tespit etmek için AFLP markırı kullanıldı. Söz konusu moleküler markır kullanılarak elde edilen jel örneklerindeki bantların varlığı için “1” aynı moleküler uzunlukta olmayan bantlar için ise “0” rakamları kullanılarak skorlandı. Bantların baz çifti (bç) uzunluklarını belirlemek amacıyla 50–10000 baz çifti arasındaki bantları içeren DNA markırı kullanıldı. Değerlendirmeye sadece 10-500 bç arasındaki bantlar alındı. Uçucu yağların uygulandığı dozlar arasındaki benzerlik oranının hesaplanması, Jaccard'a göre SPSS V17 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Yine aynı istatistik programı ile UPGMA'ya dayalı dendogramlar oluşturuldu. Örneklere ait dendogram, yakınlık matrisleri ve örnek jel görüntüleri aşağıda sunuldu.

*C. nepeta* uçucu yağlarının uygulandığı örneklerde tüm dozların kontrolden uzaklaştığı ve 0,1, 0,2 ile 0,4  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozlarının bir grupta toplanıp birbirine en yakın dozlar olduğu tespit edildi (Şekil 4. 8).



**Şekil 4.8.** *C. nepeta*'nın uçucu yağlarının farklı dozlarda uygulandığı *Zea mays* L. tohum örnekleri arasındaki yakınlık oranları

Kontrole en yakın doz 0,450 oranıyla 0,1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozu olurken en uzak dozun ise 0,378 oranıyla 0,2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozu olduğu tespit edildi (Çizelge 4.15). Bu türden elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarından örnek jel görüntüsü Şekil 4.9'da sunuldu.

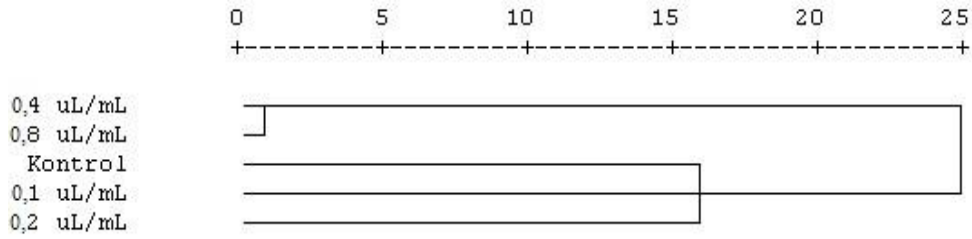
**Çizelge 4.15.** *C. nepeta*'nın uçucu yağlarının uygulandığı *Zea mays* L. tohumları arasındaki genetik benzerlik indeksi

Doz	Kontrol	0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$
Kontrol	1,000				
0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,450	1,000			
0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,378	0,694	1,000		
0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,388	0,689	0,722	1,000	
0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,439	0,640	0,542	0,618	1,000



**Şekil 4.9.** *C. nepeta*'nın uçucu yağlarının uygulandığı *Zea mays* L. tohumlarının E-ACA/ M-CTA ve E-AAG/ M-CTA AFLP primerine karşı oluşturduğu amplifikasyon ürünleri (K=Kontrol A,B,C,D sırasıyla 0,1, 0,2, 0,4, 0,8  $\mu$ L/mL dozlarını temsil etmektedir )

*M. longifolia* uçucu yağlarının uygulandığı örneklerde tüm dozların kontrolden önemli derecede uzaklaştığı 0,4 ile 0,8  $\mu$ L/mL dozlarının bir grupta diğer uygulamaların ise ayrı bir grupta toplanıp birbirine en yakın dozlar olduğu tespit edildi (Şekil 4.10).

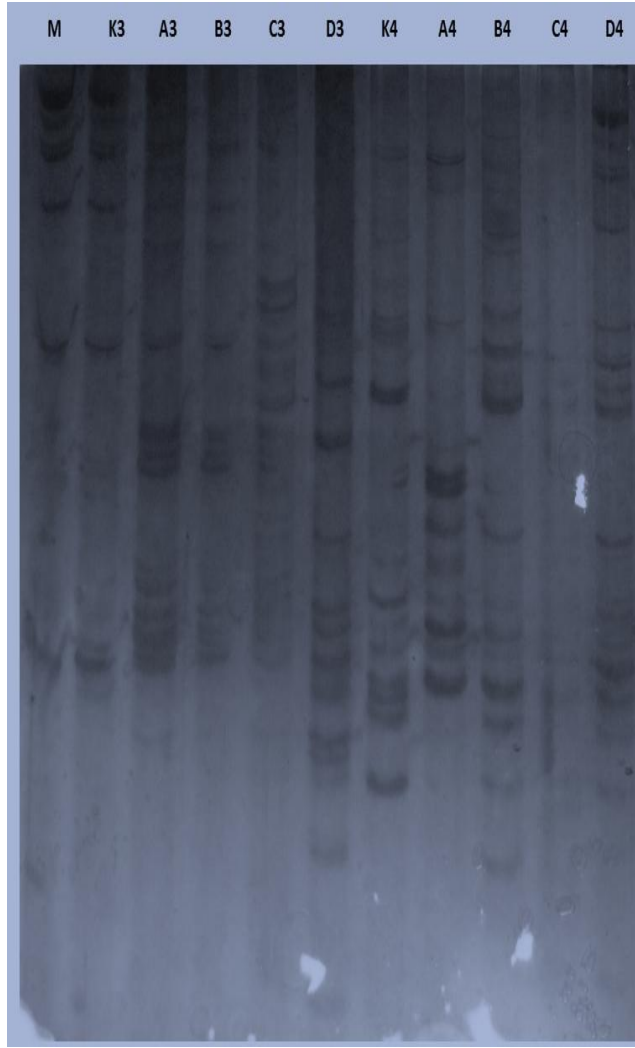


**Şekil 4.10.** *M. longifolia*'nın uçucu yağlarının farklı dozlarda uygulandığı *Zea mays* L. tohum örnekleri arasındaki yakınlık oranları

Kontrole en yakın doz 0,359 oranıyla 0,1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozu olurken en uzak dozun ise 0,272 oranıyla 0,8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozu olduğu tespit edildi (Çizelge 4.16). Bu türden elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarından örnek jel görüntüsü Şekil 4.11'de sunuldu.

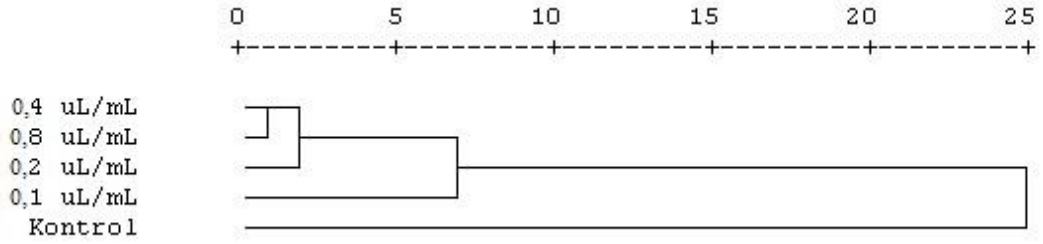
**Çizelge 4.16.** *M. longifolia*'nın uçucu yağlarının uygulandığı *Zea mays* L. tohumları arasındaki genetik benzerlik indeksi

Doz	Kontrol	0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$
Kontrol	1,000				
0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,359	1,000			
0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,356	0,353	1,000		
0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,293	0,306	0,342	1,000	
0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,272	0,273	0,333	0,445	1,000



**Şekil 4.11.** *M. longifolia*'nın uçucu yağlarının uygulandığı *Zea mays* L. tohumlarının E-AAC/ M-CTC ve E-AAG/ M-CAA AFLP primerine karşı oluşturduğu amplifikasyon ürünleri (K=Kontrol A,B,C,D sırasıyla 0,1, 0,2, 0,4, 0,8  $\mu$ L/mL dozlarını temsil etmektedir)

*N. nuda*'dan elde edilen uçucu yağlarının uygulandığı örneklerde tüm dozların kontrolden uzaklaştığı ve 0,2, 0,4 ve 0,8 $\mu$ L/mL dozlarının bir grupta toplandıkları tespit edildi (Şekil 4. 12).



**Şekil 4.12.** *N. nuda*'nın uçucu yağlarının farklı dozlarda uygulandığı *Zea mays* L. tohum örnekleri arasındaki yakınlık oranları

Kontrole en yakın doz 0,442 oranıyla 0,1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozu olurken en uzak dozun ise 0,351 oranıyla 0,8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozu olduğu tespit edildi. Öte yandan en yakın dozlar ise 0,782'lik oranlarıyla 0,4 ve 0,8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozları oldu (Çizelge 4.17). Bu türden elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarından örnek jel görüntüsü Şekil 4.13'te sunuldu.

**Çizelge 4.17.** *N. nuda*'nın uçucu yağlarının uygulandığı *Zea mays* L. tohumları arasındaki genetik benzerlik indeksi

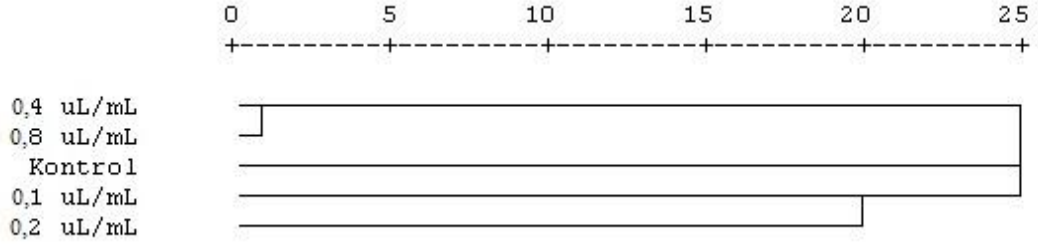
Doz	Kontrol	0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$
Kontrol	1,000				
0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,442	1,000			
0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,415	0,711	1,000		
0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,384	0,713	0,780	1,000	
0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,351	0,627	0,730	0,782	1,000





**Şekil 4.13.** *N. nuda*'nın uçucu yağlarının uygulandığı *Zea mays* L. tohumlarının E-ACA/ M-CTA ve E-ACA/ M-CTC AFLP primerine karşı oluşturduğu amplifikasyon ürünleri (K=Kontrol A,B,C,D sırasıyla 0,1, 0,2, 0,4, 0,8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozlarını temsil etmektedir)

*O. rotundifolium* bitkisinin uçucu yağlarının uygulandığı örneklerde 0,4 ile 0,8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozlarının kontrolden önemli derecede uzaklaştığı ve bir grupta toplanıp birbirine en yakın dozlar oldukları tespit edildi (Şekil 4.14).

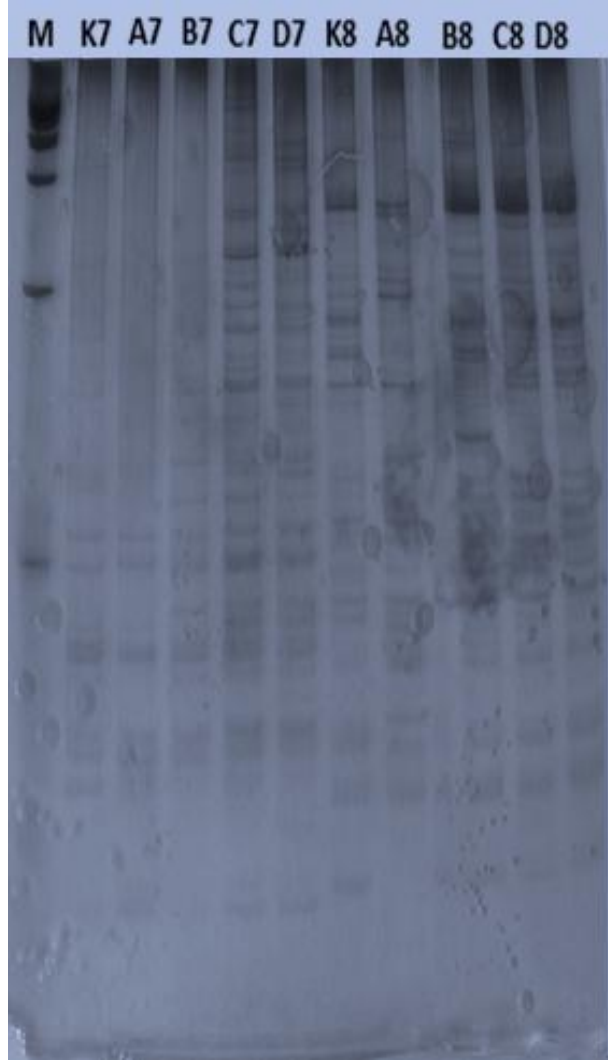


**Şekil 4.14.** *O. rotundifolium*'un uçucu yağlarının farklı dozlarda uygulandığı *Zea mays* L. tohum örnekleri arasındaki yakınlık oranları

Kontrole en yakın doz 0,434 oranıyla 0,1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozu olurken en uzak dozun ise 0,366 oranıyla 0,2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozu olduğu tespit edildi. Birbirine en yakın dozlar ise 0,715'lik oranlarıyla 0,4 ve 0,8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozları oldu (Çizelge 4.18). Bu türden elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarından örnek jel görüntüsü Şekil 4.15'te sunuldu.

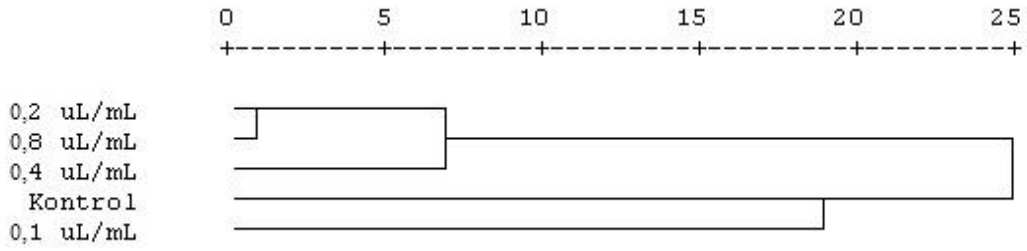
**Çizelge 4.18.** *O. rotundifolium*'un uçucu yağlarının uygulandığı *Zea mays* L. tohumları arasındaki genetik benzerlik indeksi

Doz	Kontrol	0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$
Kontrol	1,000				
0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,434	1,000			
0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,366	0,461	1,000		
0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,400	0,378	0,411	1,000	
0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,406	0,371	0,388	0,715	1,000



**Şekil 4.15.** *O. rotundifolium*'nın uçucu yağlarının uygulandığı *Zea mays* L. tohumlarının E-ACA/ M-CTA ve E-ACA/ M-CTC AFLP primerine karşı oluşturduğu amplifikasyon ürünleri (K=Kontrol A,B,C,D sırasıyla 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 µL/mL dozlarını temsil etmektedir)

*O. vulgare* uçucu yağlarının uygulandığı örneklerin AFLP analizlerinde tüm dozların kontrolden önemli derecede uzaklaştığı gözlemlendi. 0,2, 0,4 ile 0,8 µL/mL dozlarının bir grupta toplandığı tespit edildi (Şekil 4. 16).



**Şekil 4.16.** *O. vulgare*'nin uçucu yağlarının farklı dozlarda uygulandığı *Zea mays* L. tohum örnekleri arasındaki yakınlık oranları

Kontrole en yakın doz 0,451 oranıyla 0,1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozu olurken en uzak dozun ise 0,378 oranıyla 0,8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozu olduğu tespit edildi. Öte yandan birbirine en yakın dozlar ise 0,583'lük oranlarıyla 0,2 ve 0,8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozları oldu (Çizelge 4.19). Bu türden elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarından örnek jel görüntüsü Şekil 4.17'de sunuldu.

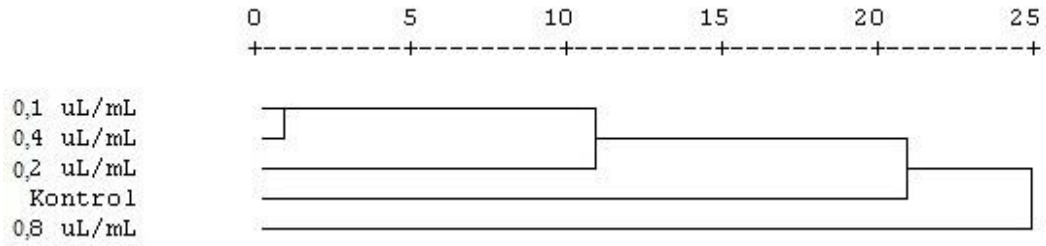
**Çizelge 4.19.** *O. vulgare*'nin uçucu yağlarının uygulandığı *Zea mays* L. tohumları arasındaki genetik benzerlik indeksi

Doz	Kontrol	0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$
Kontrol	1,000				
0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,451	1,000			
0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,381	0,485	1,000		
0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,382	0,372	0,500	1,000	
0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,378	0,413	0,583	0,566	1,000



**Şekil 4.17.** *O. vulgare*'nin uçucu yağlarının uygulandığı *Zea mays* L. tohumlarının E-AAC/ M-CTC ve E-AAG/ M-CAA AFLP primerine karşı oluşturduğu amplifikasyon ürünleri (K=Kontrol A,B,C,D sırasıyla 0,1, 0,2, 0,4, 0,8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozlarını temsil etmektedir)

Son olarak *S. hortensis* uçucu yağlarının uygulandığı mısır örneklerinde 0,1, 0,2 ve 0,4  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozlarının bir grupta toplandığı gözlemlendi (Şekil 4. 18).



**Şekil 4.18.** *S. hortensis*'in uçucu yağlarının farklı dozlarda uygulandığı *Zea mays* L. tohum örnekleri arasındaki yakınlık oranları

Kontrole en yakın doz 0,418 oranıyla 0,1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozu olurken en uzak dozun ise 0,302 oranıyla 0,8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozu olduğu tespit edildi. Benzerlik indeksine göre birbirine en yakın dozlar ise 0,578'lik oranlarıyla 0,1 ve 0,4  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozları oldu (Çizelge 4.20). Bu türden elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarından örnek jel görüntüsü Şekil 4.19'da sunuldu.

**Çizelge 4.20.** *S. hortensis*'in uçucu yağlarının uygulandığı *Zea mays* L. tohumları arasındaki genetik benzerlik indeksi

Doz	Kontrol	0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$
Kontrol	1,000				
0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,418	1,000			
0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,363	0,454	1,000		
0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,393	0,578	0,512	1,000	
0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$	0,302	0,329	0,375	0,383	1,000



**Şekil 4.19.** *S. hortensis*'in uçucu yağlarının uygulandığı *Zea mays* L. tohumlarının E-ACA/ M-CTA ve E-AGC/ M-CTC AFLP primerine karşı oluşturduğu amplifikasyon ürünleri (K=Kontrol A,B,C,D sırasıyla 0,1, 0,2, 0,4, 0,8  $\mu$ L/mL dozlarını temsil etmektedir)

#### 4.6. Uçucu Yağların Çözünabilir Protein Miktarına Etkisi

Toplam çözünür protein konsantrasyonu tayini Bradford (1976)'a göre yapıldı. Protein konsantrasyonları kök ve gövde için ayrı ayrı hesaplandı.

*C. nepeta*'dan elde edilen esansiyel yağların çimlendirilen mısır tohumlarının köklerinde, çözünür protein miktarının artışına neden oldukları, gövde örneklerinde ise 0,2 $\mu$ L/mL dozu dışında azalmaya neden oldukları gözlemlendi. Kök örneklerinde

0,8µL/mL dozu ile kontrol arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu (Çizelge 4.21).

**Çizelge 4.21.** *C. nepeta*'dan elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarında toplam çözümlü protein miktarı (Kök ve gövde ayrı olarak hesaplanmış ve her sütun ayrı değerlendirilmiştir)

ID	Kons [µg/µL]			
	Kök	IR *	Gövde	IR *
Kontrol	52,20 <sup>a</sup>	0	54,00 <sup>a</sup>	0
0,1µL/mL	53,83 <sup>c</sup>	+3,12	52,45 <sup>a</sup>	-2,87
0,2µL/mL	53,21 <sup>b</sup>	+1,93	57,31 <sup>b</sup>	+6,12
0,4µL/mL	53,58 <sup>bc</sup>	+2,64	52,83 <sup>a</sup>	-2,16
0,8µL/mL	52,33 <sup>a</sup>	+0,24	53,34 <sup>a</sup>	+1,22

IR: Protein konsantrasyonundaki artış (+) veya azalış (-)

Aynı kolondaki aynı harfle ifade edilmiş örnekler arasında önemli fark yoktur (P<0,05)

*M. longifolia*'nın yağlarının uygulandığı *Zea mays* L. köklerinden elde edilen çözümlü protein miktarı genelde artış gösterirken bu artışın dozdan bağımsız ve istatistiksel olarak önemli olduğu gözlemlendi. Gövde örneklerinde ise 0,1µL/mL dozu haricinde diğer dozların kontrole kıyasla azalma meydana getirdiği tespit edildi (Çizelge 4.22).

**Çizelge 4.22.** *M. longifolia*'dan elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarında toplam çözümlü protein miktarı (Kök ve gövde ayrı olarak hesaplanmış ve her sütun ayrı değerlendirilmiştir)

ID	Kons [µg/µL]			
	Kök	IR*	Gövde	IR *
Kontrol	52,20 <sup>a</sup>	0	54,00 <sup>b</sup>	0
0,1µL/mL	53,58 <sup>ab</sup>	+2,64	54,95 <sup>a</sup>	+1,75
0,2µL/mL	55,89 <sup>c</sup>	+7,09	53,46 <sup>c</sup>	-1
0,4µL/mL	53,20 <sup>ab</sup>	+1,91	52,59 <sup>d</sup>	-2,61
0,8µL/mL	54,45 <sup>bc</sup>	+4,31	52,34 <sup>d</sup>	-3,04

IR: Protein konsantrasyonundaki artış (+) veya azalış (-)

Aynı kolondaki aynı harfle ifade edilmiş örnekler arasında önemli fark yoktur (P<0,05).



Diğer türlerden farklı olarak *N. nuda* uçucu yağlarının uygulandığı mısır örneklerinde çözümlü protein seviyelerinde kontrole göre düşüş gözlemlendi. Hem kök hem de gövde örneklerinde meydana gelen düşüşün inhibisyon oranlarına da yansıdığı tespit edildi (Çizelge 4.23).

**Çizelge 4.23.** *N. nuda*'dan elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarında toplam çözümlü protein miktarı (Kök ve gövde ayrı olarak hesaplanmış ve her sütun ayrı değerlendirilmiştir)

ID	Kons. [ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]			
	Kök	IR*	Gövde	IR*
Kontrol	52,20 <sup>a</sup>	0	54,00 <sup>a</sup>	0
0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	50,90 <sup>b,c</sup>	-2,5	47,55 <sup>c</sup>	-11,9
0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$	51,80 <sup>a,b</sup>	-0,8	47,10 <sup>c</sup>	-12,8
0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$	48,25 <sup>d</sup>	-7,6	50,90 <sup>b</sup>	-5,7
0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$	50,55 <sup>c</sup>	-3,2	50,35 <sup>b</sup>	-6,8

IR: Protein konsantrasyonundaki artış (+) veya azalış (-)

Aynı kolondaki aynı harfle ifade edilmiş örnekler arasında önemli fark yoktur ( $P < 0,05$ ).

Çizelge 4.24'de de görüldüğü gibi *O. rotundifolium* uçucu yağlarının uygulanması sonucunda çimlenen örneklerden alınan kök ve gövde örneklerindeki çözümlü protein miktarlarının değişiklik gösterdiği belirlendi. Kök örneklerinin tümünde çözümlü protein miktarında artış gözlenirken, gövde örneklerinde kontrole göre 0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$  ve 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozlarında azalma, 0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$  ile 0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozlarında ise artış kaydedildi.

**Çizelge 4.24.** *O. rotundifolium*'dan elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarında toplam çözümlü protein miktarı (Kök ve gövde ayrı olarak hesaplanmış ve her sütun ayrı değerlendirilmiştir)

ID	Kons [ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]			
	Kök	IR*	Gövde	IR*
Kontrol	52,20 <sup>a</sup>	0	54,00 <sup>c</sup>	0
0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	54,20 <sup>b</sup>	+3,83	52,34 <sup>a</sup>	-3,07
0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$	53,86 <sup>b</sup>	+3,18	53,21 <sup>b</sup>	-1,46
0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$	55,88 <sup>c</sup>	+7,04	55,19 <sup>d</sup>	+2,20
0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$	54,52 <sup>b</sup>	+4,44	55,32 <sup>d</sup>	+2,44

IR: Protein konsantrasyonundaki artış (+) veya azalış (-)

Aynı kolondaki aynı harfle ifade edilmiş örnekler arasında önemli fark yoktur ( $P < 0,05$ ).

*O. vulgare*'den elde edilen uçucu yağların mısır tohumlarına uygulanıp bu tohumların çimlendirilmesi sonucu elde edilen kök ve gövde sürgünlerinin çözümlü protein miktarları Çizelge 4.25'de sunuldu. Gövde proteinlerinde 0,1µL/mL dışındaki dozlarda değişim gözlenirken kök örneklerinin hepsinde artış meydana geldiği belirlendi. Değişimlerin doza bağımlı olmadığı, inişli çıkışlı bir grafik sergiledikleri tespit edildi. Örneğin; kök örneklerinde çözümlü protein miktarının en az 0,8 µL/mL dozunda, en fazla ise 0,4 µL/mL dozunda olduğu belirlendi. Öte yandan, gövde örneklerinde ise en fazla çözümlü protein miktarı 0,2µL/mL dozunda, en az ise 0,1µL/mL dozunda elde edildi.

**Çizelge 4.25.** *O. vulgare*'den elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarında toplam çözümlü protein miktarı (Kök ve gövde ayrı olarak hesaplanmış ve her sütun ayrı değerlendirilmiştir)

ID	Kons [µg/µL]			
	Kök	IR*	Gövde	IR*
Kontrol	52,20 <sup>a</sup>	0	54,00 <sup>b</sup>	0
0,1µL/mL	55,18 <sup>c</sup>	+5,71	53,44 <sup>a</sup>	-1,04
0,2µL/mL	55,52 <sup>c</sup>	+6,36	56,49 <sup>e</sup>	+4,61
0,4µL/mL	57,13 <sup>d</sup>	+9,44	54,43 <sup>c</sup>	+0,80
0,8µL/mL	53,83 <sup>b</sup>	+3,12	55,93 <sup>d</sup>	+3,57

IR: Protein konsantrasyonundaki artış (+) veya azalış (-)

Aynı kolondaki aynı harfle ifade edilmiş örnekler arasında önemli fark yoktur (P<0,05).

*S. hortensis*'ten elde edilen uçucu yağların mısır tohumlarına uygulanıp bu tohumların çimlendirilmesi sonucu elde edilen kök ve gövde sürgünlerinin çözümlü protein miktarlarının kökte 0,1µL/mL ve 0,2µL/mL dozlarında arttığı diğer dozlarda ise düştüğü gözlemlendi. Gövde örneklerinin tüm dozlarında ise düşüş tespit edildi (Çizelge 4.26).

**Çizelge 4.26.** *S. hortensis* 'ten elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarında toplam çözümlü protein miktarı (Kök ve gövde ayrı olarak hesaplanmış ve her sütun ayrı değerlendirilmiştir)

ID	Kons [µg/µL]			
	Kök	IR*	Gövde	IR*
Kontrol	52,20 <sup>c</sup>	0	54,00 <sup>a</sup>	0
0,1µL/mL	54,20 <sup>a</sup>	+3,83	49,62 <sup>d</sup>	-8,11
0,2µL/mL	52,84 <sup>b</sup>	+1,22	49,50 <sup>d</sup>	-8,33
0,4µL/mL	51,72 <sup>c</sup>	-0,91	51,11 <sup>b</sup>	-5,35
0,8µL/mL	50,11 <sup>d</sup>	-4,00	50,19 <sup>c</sup>	-7,05

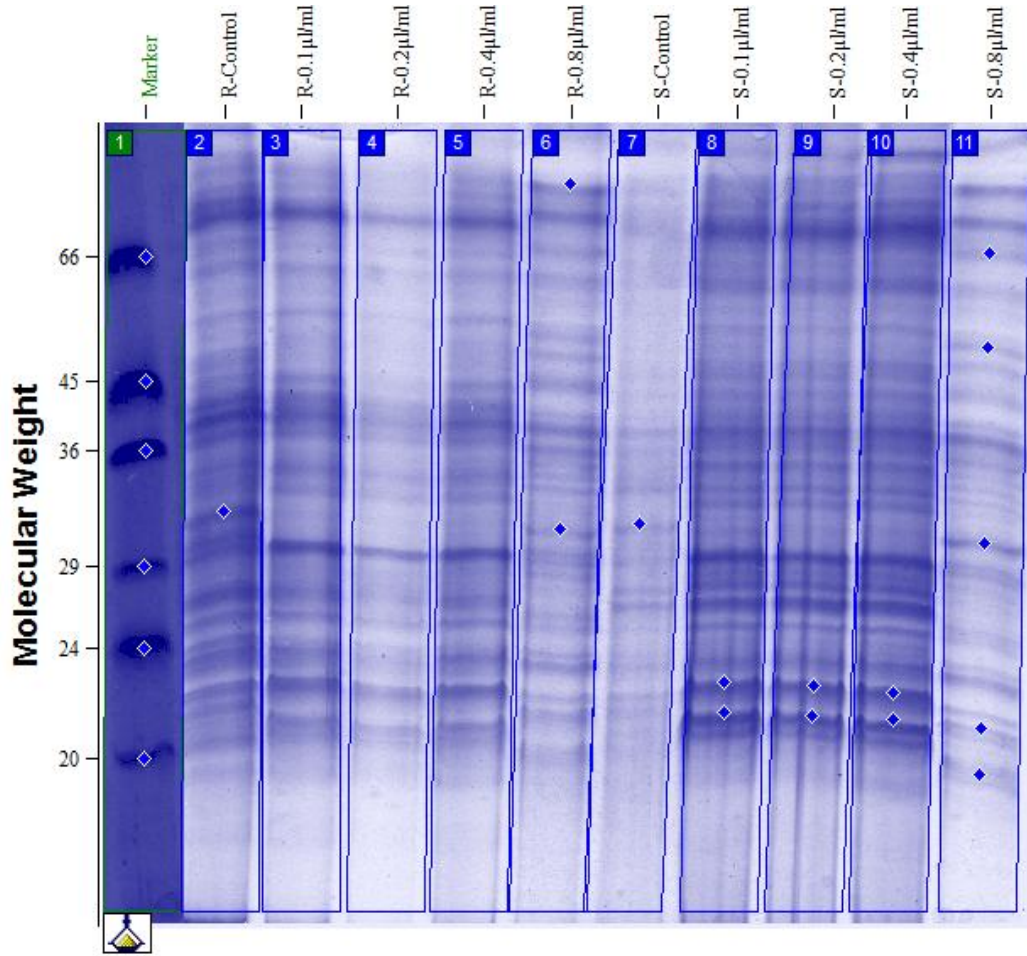
IR: Protein konsantrasyonundaki artış (+) veya azalış (-)

Aynı kolondaki aynı harfle ifade edilmiş örnekler arasında önemli fark yoktur (P<0,05).

#### 4.7. Uçucu Yağların Uygulandığı *Zea mays* L. Örneklerinin SDS-PAGE Profilleri

Yapısal ve düzenleyici proteinlerdeki değişimi gözlemek için, çözümlü protein örneklerinin SDS-PAGE analizleri yapıldı. Ayrı ayrı elektroforeze tabi tutulan her türün kök ve gövde örneklerinin bant profilleri kontrolleriyle kıyaslanarak değerlendirildi. Elektroforezde ayrılan proteinler 14 kDa ile 81 kDa arasında varyasyon gösterdi. Eşit yoğunlukta (50 µg) protein yüklenen poliakrilamid jelde polimorfik bant oluşumunun yanı sıra bazı bantlarda yığılmalar gözlemlendi.

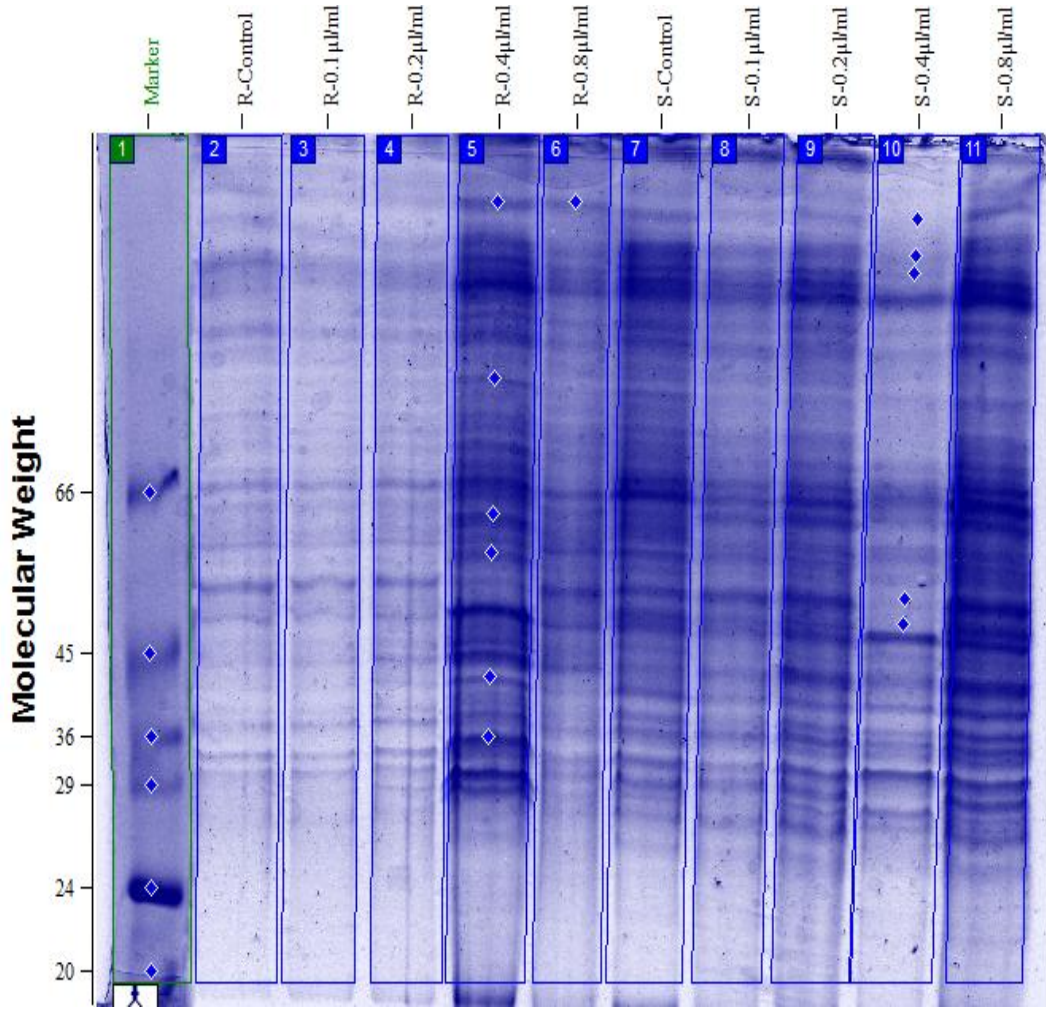
*C. nepeta* türünden elde edilen uçucu yağlar, mısır tohumlarının SDS-PAGE profillerinde hem polimorfik bantlar oluşturduğu hem de bant yoğunluklarında artış veya azalmalara neden olduğu belirlendi (Şekil 4.20).



**Şekil 4.20.** *C. nepeta*'dan elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarının SDS-PAGE protein profilleri

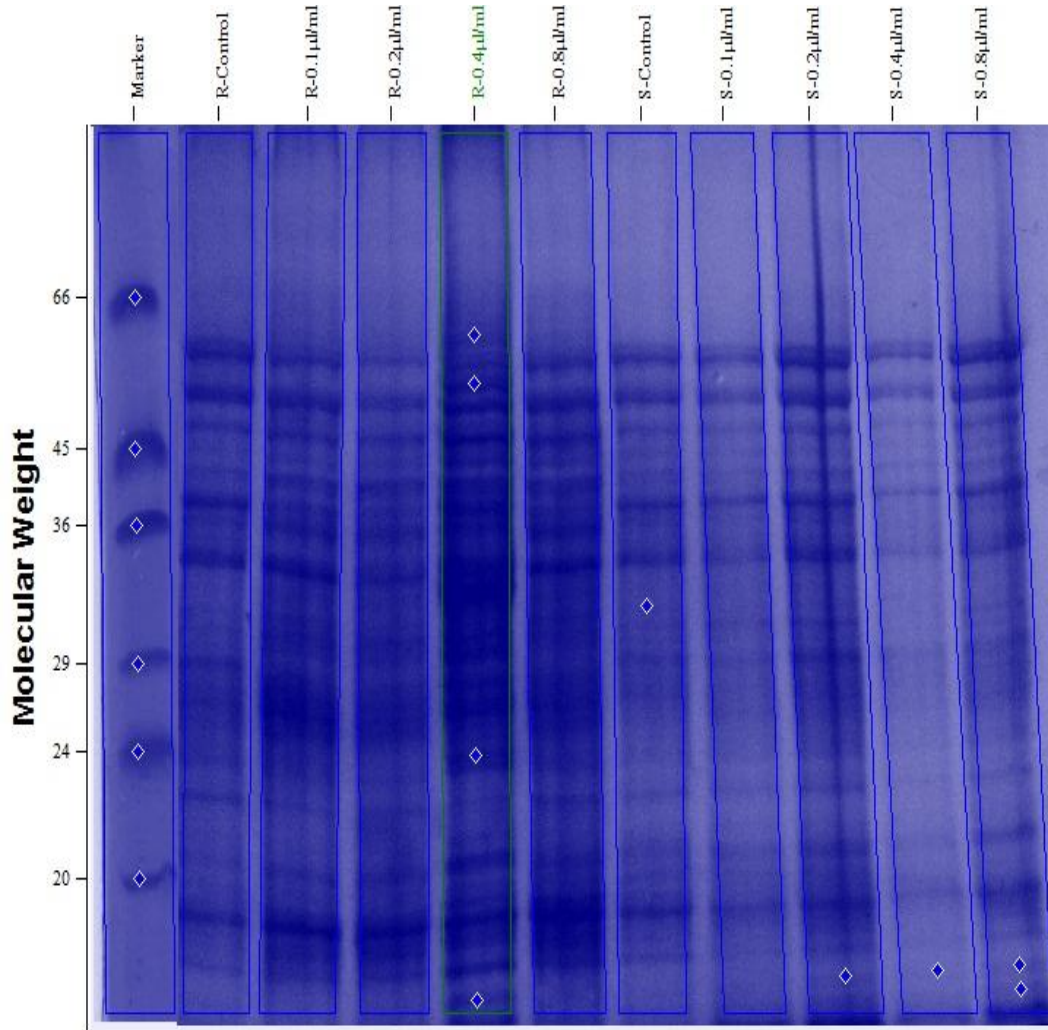
(R: Kök, S: Gövde; sadece Markır ve polimorfik bantların bir kısmı işaretlenmiştir)

*M. longifolia* yağları uygulanan örneklerin SDS-PAGE profillerinde meydana gelen değişim protein yığılmaları ve kısmi bant kayıpları ya da oluşumları şeklinde olduğu gözlemlendi. Bantlardaki değişimlerin, çoğunlukla kök ve gövdenin 3. dozunda ( $0,4\mu\text{L}/\text{mL}$ ) meydana geldiği tespit edildi (Şekil 4.21).



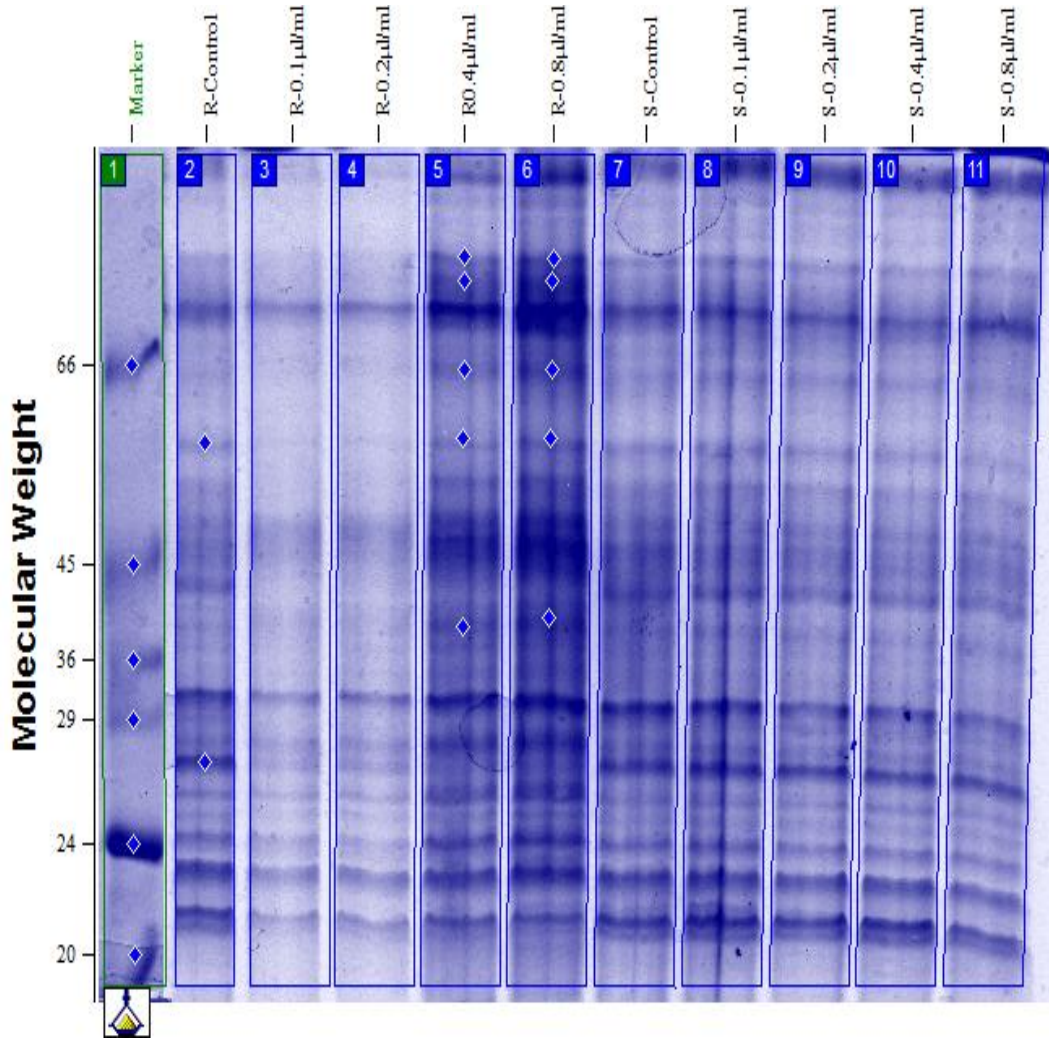
**Şekil 4.21.** *M. longifolia*'dan elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarının SDS-PAGE protein profilleri  
(R: Kök, S: Gövde; sadece Markır ve polimorfik bantların bir kısmı işaretlenmiştir)

*N. nuda* uçucu yağı uygulanan mısır örneklerinin protein profillerinde, diğer örneklerde olduğu gibi bant yoğunluklarındaki artış ve azalışlar gözlemlendi. Şekil 4.22'de de belirtildiği gibi polimorfik bantların yanı sıra fazla ifade edilen bantlara rastlandı.



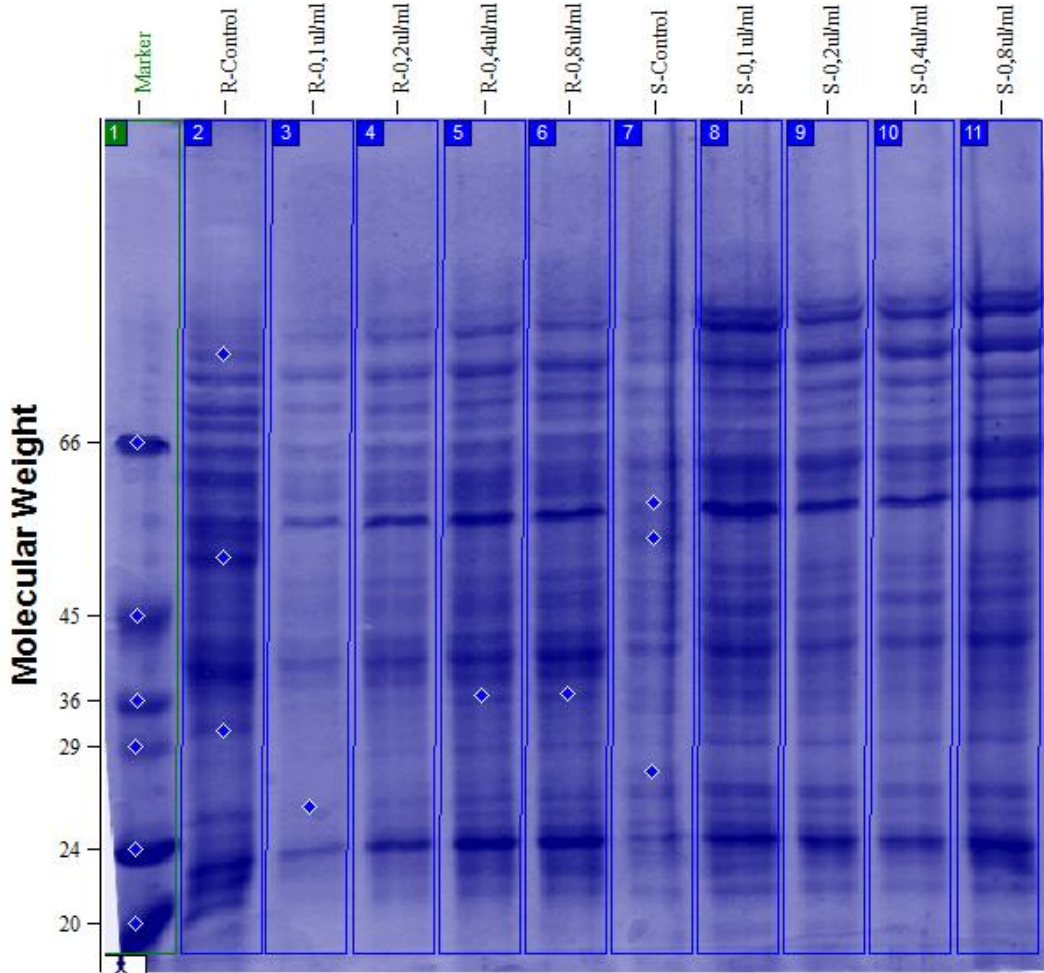
**Şekil 4.22.** *N. nuda*'dan elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarının SDS-PAGE protein profilleri  
(R: Kök, S: Gövde; sadece Markır ve polimorfik bantların bir kısmı işaretlenmiştir)

*O. rotundifolium* SDS-PAGE profillerinde de yığılmalar ve bant yoğunluklarındaki değişiklikler dışında önemli değişiklikler gözlenmedi. (Şekil 4.23).



**Şekil 4.23.** *O. rotundifolium*'dan elde uçucu edilen yağların uygulandığı mısır tohumlarının SDS-PAGE protein profilleri  
(R: Kök, S: Gövde; sadece Markır ve polimorfik bantların bir kısmı işaretlenmiştir)

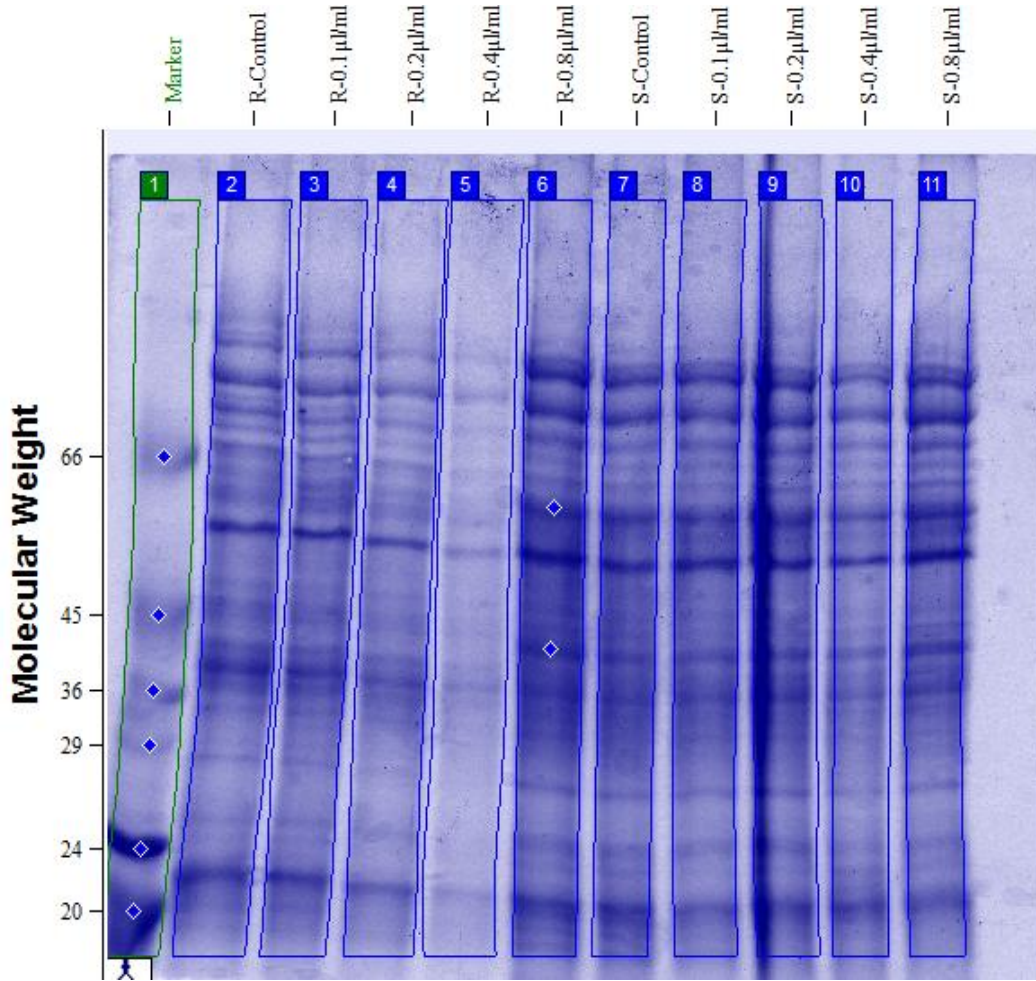
*O. vulgare* yağlarının uygulandığı mısır tohumlarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE profilleri Şekil 4.24’de gösterildi. Bazı dozlarda bant kayıplarının yanısıra bant yoğunluklarında azalma veya artışlar tespit edildi.



**Şekil 4.24.** *O. vulgare*’den elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarının SDS-PAGE protein profilleri  
(R: Kök, S: Gövde; sadece Markır ve polimorfik bantların bir kısmı işaretlenmiştir)

*S. hortensis* yağlarının uygulandığı mısır tohumlarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE profillerinde ise yığılmalar ve polimorfik bant oluşumları gözlemlendi. Özellikle kök örneklerinde doza bağlı olarak protein yoğunluklarının azaldığı tespit edildi (Şekil 4.25).





**Şekil 4.25.** *S. hortensis*'ten elde edilen yağların uygulandığı mısır tohumlarının SDS-PAGE protein profilleri  
(R: Kök, S: Gövde; sadece Markır ve polimorfik bantların bir kısmı işaretlenmiştir)

#### 4.8. Uçucu Yağların Uygulandığı *Zea mays* L. Örneklerinin Hormon Analizleri

Hormon analizi için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi yöntemi kullanıldı. Altı farklı bitkiden elde edile uçucu yağların uygulandığı her bir örneğe ait GA, ZA, IAA ve ABA miktarı belirlenip, SPSS 17.0 istatistik programında One Way ANOVA testi kullanılarak standart sapmaları ve ortalamaları hesaplanmış,  $P \leq 0,05$  seviyesinde önem durumu belirlenmiştir.

Tüm örnekler ele alındığında *M. longifolia* 'nın  $0,4 \mu\text{L}/\text{mL}$  dozu dışındaki bütün örneklerin tüm dozlarında GA hormon seviyesinin düştüğü belirlendi. ZA miktarı ise *C.*

*nepeta* ve *M. longifolia* uçucu yağlarının uygulandığı mısır örneklerinde kontrole göre düzensiz değişimler gösterirken, diğer bütün türlerde kontrole karşılaştırıldığında azaldığı gözlemlendi. Öte yandan IAA miktarlarının ise kararlı bir yapı göstermediği ve aynı türün farklı dozlarında farklı konsantrasyonlarda bulunduğu belirlendi. ABA miktarının ise *M. longifolia* ve *S. hortensis* bitkilerinin esansiyel yağlarının uygulandığı dozlarda genelde artış gösterdiği belirlenirken, diğer türlerde önemli derecede düştüğü gözlemlendi. Altı türün uçucu yağlarının uygulandığı mısır tohumlarında meydana gelen hormonal değişimler Çizelge 4.27- 4.32’de sunuldu.

**Çizelge 4.27.** *C. nepeta*’nın uçucu yağlarının uygulandığı mısır örneklerinde GA, ZA, IAA ve ABA hormonlarının seviyelerinde meydana gelen değişimler

	Büyümeyi Teşvik Edenler			Büyümeyi İnhibe Eden
	GA (µg/mL)	ZA (µg/mL)	IAA (µg/mL)	ABA (µg/mL)
Kontrol	575,20 ± 1,27 <sup>c</sup>	3,20 ± 0,05 <sup>b</sup>	36,40 ± 0,11 <sup>c</sup>	8,89 ± 0,05 <sup>b</sup>
0,1µL/mL	535,30 ± 0,46 <sup>d</sup>	3,68 ± 0,14 <sup>b</sup>	36,69 ± 0,05 <sup>c</sup>	15,05 ± 0,52 <sup>d</sup>
0,2µL/mL	253,59 ± 0,15 <sup>b</sup>	2,17 ± 0,29 <sup>a</sup>	31,69 ± 0,17 <sup>b</sup>	6,94 ± 0,16 <sup>a</sup>
0,4µL/mL	230,88 ± 0,23 <sup>a</sup>	2,18 ± 0,20 <sup>a</sup>	23,47 ± 0,06 <sup>a</sup>	7,50 ± 0,05 <sup>a</sup>
0,8µL/mL	390,01 ± 0,57 <sup>c</sup>	4,62 ± 0,20 <sup>c</sup>	39,35 ± 0,12 <sup>d</sup>	13,20 ± 0,15 <sup>c</sup>

\*Aynı sütunda, aynı karakterle ifade edilmiş örnekler arasında önemli fark yoktur (P<0,05).

**Çizelge 4.28.** *M. longifolia*’nın uçucu yağlarının uygulandığı mısır örneklerinde GA, ZA, IAA ve Absisik asit hormonlarının seviyelerinde meydana gelen değişimler

	Büyümeyi Teşvik Edenler			Büyümeyi İnhibe Eden
	GA (µg/mL)	ZA (µg/mL)	IAA (µg/mL)	ABA (µg/mL)
Kontrol	575,20 ± 1,27 <sup>d</sup>	3,20 ± 0,05 <sup>a</sup>	36,40 ± 0,11 <sup>b</sup>	8,89 ± 0,05 <sup>e</sup>
0,1µL/mL	398,31 ± 0,23 <sup>a</sup>	2,92 ± 0,23 <sup>a</sup>	30,94 ± 0,23 <sup>a</sup>	7,41 ± 0,20 <sup>d</sup>
0,2µL/mL	405,99 ± 0,51 <sup>b</sup>	4,11 ± 0,30 <sup>b</sup>	44,51 ± 0,35 <sup>d</sup>	9,70 ± 0,23 <sup>c</sup>
0,4µL/mL	641,50 ± 0,28 <sup>e</sup>	4,60 ± 0,11 <sup>b</sup>	53,90 ± 0,10 <sup>e</sup>	16,27 ± 0,27 <sup>b</sup>
0,8µL/mL	468,59 ± 0,57 <sup>c</sup>	6,09 ± 0,05 <sup>c</sup>	43,37 ± 0,06 <sup>c</sup>	13,31 ± 0,05 <sup>a</sup>

\*Aynı sütunda, aynı karakterle ifade edilmiş örnekler arasında önemli fark yoktur (P<0,05).

**Çizelge 4.29.** *N. nuda*'nın uçucu yağlarının uygulandığı mısır örneklerinde GA, ZA, IAA ve ABA hormonlarının seviyelerinde meydana gelen değişimler

	Büyümeyi Teşvik Edenler			Büyümeyi İnhibe Eden
	GA (µg/mL)	ZA (µg/mL)	IAA (µg/mL)	ABA (µg/mL)
Kontrol	575,20 ± 1,27 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,05 <sup>c</sup>	36,40 ± 0,11 <sup>d</sup>	8,89 ± 0,05 <sup>e</sup>
0,1µL/mL	239,02 ± 0,49 <sup>b</sup>	2,18 ± 0,12 <sup>a</sup>	19,96 ± 0,26 <sup>b</sup>	7,41 ± 0,17 <sup>d</sup>
0,2µL/mL	259,94 ± 0,26 <sup>d</sup>	2,55 ± 0,08 <sup>b</sup>	21,98 ± 0,32 <sup>c</sup>	6,23 ± 0,31 <sup>c</sup>
0,4µL/mL	310,61 ± 0,95 <sup>e</sup>	2,36 ± 0,08 <sup>ab</sup>	19,58 ± 0,14 <sup>b</sup>	4,95 ± 0,34 <sup>b</sup>
0,8µL/mL	245,77 ± 0,75 <sup>c</sup>	2,33 ± 0,14 <sup>ab</sup>	14,95 ± 0,35 <sup>a</sup>	3,65 ± 0,03 <sup>a</sup>

\*Aynı sütunda, aynı karakterle ifade edilmiş örnekler arasında önemli fark yoktur (P<0,05).

**Çizelge 4.30.** *O. rotundifolium*'un uçucu yağlarının uygulandığı mısır örneklerinde GA, ZA, IAA ve ABA hormonlarının seviyelerinde meydana gelen değişimler

	Büyümeyi Teşvik Edenler			Büyümeyi İnhibe Eden
	GA (µg/mL)	ZA (µg/mL)	IAA (µg/mL)	ABA (µg/mL)
Kontrol	575,20 ± 1,27 <sup>e</sup>	3,20 ± 0,05 <sup>b</sup>	36,40 ± 0,11 <sup>c</sup>	8,89 ± 0,05 <sup>b</sup>
0,1µL/mL	318,71 ± 0,69 <sup>c</sup>	1,90 ± 0,26 <sup>a</sup>	37,88 ± 0,78 <sup>d</sup>	7,31 ± 0,05 <sup>a</sup>
0,2µL/mL	220,29 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,97 ± 0,29 <sup>a</sup>	30,20 ± 0,05 <sup>a</sup>	7,08 ± 0,17 <sup>a</sup>
0,4µL/mL	253,33 ± 0,59 <sup>b</sup>	2,31 ± 0,26 <sup>a</sup>	29,43 ± 0,54 <sup>a</sup>	8,37 ± 0,40 <sup>b</sup>
0,8µL/mL	439,87 ± 0,46 <sup>d</sup>	3,56 ± 0,20 <sup>b</sup>	32,92 ± 0,32 <sup>b</sup>	11,27 ± 0,31 <sup>c</sup>

\*Aynı sütunda, aynı karakterle ifade edilmiş örnekler arasında önemli fark yoktur (P<0,05).

**Çizelge 4.31.** *O. vulgare*'nin uçucu yağlarının uygulandığı mısır örneklerinde GA, ZA, IAA ve ABA hormonlarının seviyelerinde meydana gelen değişimler

	Büyümeyi Teşvik Edenler			Büyümeyi İnhibe Eden
	GA (µg/mL)	ZA (µg/mL)	IAA (µg/mL)	ABA (µg/mL)
Kontrol	575,20 ± 1,27 <sup>d</sup>	3,20 ± 0,05 <sup>b</sup>	36,40 ± 0,11 <sup>c</sup>	8,89 ± 0,05 <sup>d</sup>
0,1µL/mL	176,85 ± 0,66 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,14 <sup>a</sup>	39,15 ± 0,57 <sup>d</sup>	10,79 ± 0,37 <sup>c</sup>
0,2µL/mL	438,91 ± 0,10 <sup>c</sup>	2,58 ± 0,03 <sup>a</sup>	36,08 ± 0,20 <sup>c</sup>	3,58 ± 0,14 <sup>a</sup>
0,4µL/mL	323,09 ± 1,24 <sup>b</sup>	2,19 ± 0,32 <sup>a</sup>	32,58 ± 0,26 <sup>b</sup>	6,37 ± 0,17 <sup>c</sup>
0,8µL/mL	321,22 ± 0,75 <sup>b</sup>	2,39 ± 0,05 <sup>a</sup>	13,95 ± 0,69 <sup>a</sup>	5,24 ± 0,08 <sup>b</sup>

\*Aynı sütunda, aynı karakterle ifade edilmiş örnekler arasında önemli fark yoktur (P<0,05).

**Çizelge 4.32.** *S. hortensis*'in uçucu yağlarının uygulandığı mısır örneklerinde GA, ZA, IAA ve ABA hormonlarının seviyelerinde meydana gelen değişimler

	Büyüme Teşvik Edenler			Büyüme İnhibe Eden
	GA (µg/mL)	ZA (µg/mL)	IAA (µg/mL)	ABA (µg/mL)
Kontrol	575,20 ± 1,27 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,05 <sup>c</sup>	36,40 ± 0,11 <sup>b</sup>	8,89 ± 0,05 <sup>a</sup>
0,1 µL/mL	348,05 ± 0,17 <sup>c</sup>	2,79 ± 0,05 <sup>b</sup>	41,46 ± 0,33 <sup>d</sup>	11,41 ± 0,23 <sup>b</sup>
0,2 µL/mL	354,59 ± 1,15 <sup>b</sup>	2,79 ± 0,11 <sup>b</sup>	37,25 ± 0,26 <sup>c</sup>	10,79 ± 0,69 <sup>b</sup>
0,4 µL/mL	320,58 ± 0,28 <sup>d</sup>	2,60 ± 0,05 <sup>b</sup>	36,68 ± 0,08 <sup>b,c</sup>	14,48 ± 0,17 <sup>c</sup>
0,8 µL/mL	348,99 ± 0,11 <sup>c</sup>	2,28 ± 0,08 <sup>a</sup>	19,95 ± 0,46 <sup>a</sup>	14,79 ± 0,11 <sup>c</sup>

\*Aynı sütunda, aynı karakterle ifade edilmiş örnekler arasında önemli fark yoktur (P<0,05).

## 5. TARTIŞMA SONUÇ

Bitkilerin fitokimyasal ve biyoaktif içerik bakımından zengin canlılar oldukları bilinmektedir. Salgıladıkları sekonder metabolitler, bitkilerin metabolik faaliyetleri dışında, diğer canlılar üzerinde oldukça etkili bileşenlerdir. Bu bileşenlerin bir kısmını oluşturan esansiyel yağlar, çeşitli biyolojik aktiviteleri olan doğal bitki metabolitleridir. Uçucu karaktere sahip ve aynı zamanda aromatik olan esansiyel yağların, genellikle monoterpenler, sesquiterpenler, diterpenler, benzenoidler ve fenil propanoidlerden oluşup, (Başer ve Buchbauer 2009) çeşitli ekolojik fonksiyonlara sahip oldukları bilinmektedir. Bu fonksiyonlardan bazıları bileşenlerin internal haberci olmaları, herbivorlara karşı savunma yapmaları, cezbedici kokularından dolayı polinasyon aracı olarak kullanılmalarıdır (Franz and Novak 2009). Kelime anlamı “karşı koyma”, “etkileme” olan allelopatik etkinin temelinde bitkiler tarafından salınan ve yukarıda bahsedilen uçucu yağlar gibi sekonder metabolitler bulunmaktadır. Bitkiler, genellikle aynı habitatı paylaştıkları diğer organizmalara (bitkiler, bakteriler, mantarlar) karşı bu metabolitlerini kullanmaktadırlar. Bitkilerin barındırdıkları bu allelokimyasalların etkileri, diğer canlılara karşı çoğunlukla olumsuz bazen de olumlu yönde olabilmektedir. Bu durum allelokimyasalın çeşidine, uygulandığı konsantrasyona, etki ettiği organizmanın türüne ve maruz bırakılma süresine bağlı olarak değişebilmektedir. Bitkide savunma elemanı olarak kullanılan ve allelopatik etkiye sahip olan bu bileşiklerin, günümüzde tarım, gıda, kozmetik, tıp gibi birçok alanda aktif olarak kullanımları, etki mekanizmalarının açıklanmasını gerektirmiştir. Uçucu yağların allelopatik etkilerinin tam olarak anlaşılması için sitolojik, genetik ve fizyolojik testlerin beraber yürütülmesinde fayda vardır. Bu çalışmada benzer bir yol takip edilmiş olup, farklı parametrelerle uçucu yağların toksik etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Hücre bölünme frekansını yansıtan ve büyüme gelişme oranını belirlemede önemli bir parametre olarak kullanılan MI testi (Gönen 2007), sitolojik ölçümler için kullanılmıştır. Genetik toksikoloji ölçümleri için, son zamanlarda sıkça kullanılan RAPD tekniği, AFLP, SSR gibi güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği yüksek olan testlerle beraber kullanılmaya başlanmıştır (Cenkçi vd 2009; Pamidimarri *et al.* 2009; Kanchanaketu *et al.* 2012). Bu tezde de test sistemlerinden AFLP ve RAPD teknikleri, uçucu yağların

neden oldukları genetiksel değişimleri belirlemek için kullanılmıştır. RAPD tekniği ile polimorfizm oranlarıyla genomik stabilite ölçülürken AFLP ile genetik benzerlik ve dozlar arasındaki yakınlık oranları ölçülmüştür. Ayrıca örneklerin çözüner protein konsantrasyonları ile SDS-PAGE profilleri de uçucu yağların genotoksik etkilerini belirlemede kullanılmıştır. Öte yandan, uçucu yağların neden oldukları genotoksik etkinin üzerine analiz edilen hormon miktarlarının etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Çalışmamızda sunulan verileri değerlendirmeden önce vurgulanması gereken konu; allelopati gibi bitki-organizma etkileşimlerinin tek yönlü düşünülmemesi gerektiğidir. Laboratuvar gibi stabil olmayan doğal şartlarda, allelopatik olayların gerçekleşmesinde birçok ekolojik, edafik ve mikrobiyal şartlar etkili rol oynamaktadır. Dış etkilerin yanı sıra bitkinin fenolojik yaşı, tolerans sınırı ve genetik yapısı da allelopati potansiyelini etkileyebilmektedir (Erez 2009). Laboratuvar koşullarında bu durumun bir kısmı göz ardı edilerek çalışma yürütülmüştür.

Yağ içeriğinin büyük bir çoğunluğunu monoterpenlerin (%48,66 oranıyla cis-piperiton epoksit, %22,08 oranıyla piperitenon oksit ve %13,51 oranıyla limonen) oluşturduğu *C. nepeta*'nın uçucu yağlarının, uygulandıkları mısır tohumlarında çimlenme oranlarını doza bağlı olarak düşürdükleri gözlenmiştir. Kontrol örneklerinde %91,06 olan çimlenme yüzdesi, uçucu yağların 0,8 µL/mL dozda uygulandığı tohum örneklerinde %13,33 olarak belirlenmiştir. Çimlenen tohumların meristematik uç bölgelerinden alınan örneklerin mitotik bölünme yüzdeleri incelendiğinde artan doza bağlı olarak azalma gözlenmiştir. RAPD profilleri incelendiğinde Mİ sonuçlarında olduğu gibi doza bağlı değişim gözlenmiştir. Çimlenme oranlarına bakıldığında bu oranların mitotik indeks ve RAPD verileriyle örtüştüğü gözlenmiştir. Örneğin; Çizelge 4.8'de 0,2, 0,4 µL/mL dozlarındaki bölünme oranları sırasıyla %13,7 ve %13,4 olup aralarındaki fark önemsiz olarak tespit edilmiştir. Benzer etki RAPD sonuçlarında da gözlenmiştir. GTS değeri hem 0,2 hem de 0,4µL/mL dozları için 52,18 olarak belirlenmiştir. Polimorfizm oranları buna bağlı olarak artan uçucu yağ dozuyla beraber artmıştır. AFLP sonuçlarında da RAPD sonuçlarından farklı sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4.8'deki

dendograma göre 0,2 ve 0,4 $\mu$ L/mL dozlarının birbirlerine en yakın dozlar olduğu gözlenmiştir. Benzerlik indeksine (Jaccard) göre de bu iki dozun birbirine en yakın dozlar olduğu gözlenirken, aynı zamanda sırasıyla 0,378 ve 0,388 oranlarıyla kontrole en uzak dozlar olmuşlardır (Çizelge 4.15). Çözünür protein miktarlarının kök örneklerinin tümünde, kontrole kıyaslandığında azaldığı gözlenmiştir. Gövde örneklerinde ise; 0,2  $\mu$ L/mL dozunda 6,12'lik çözünür protein miktarında artış gözlenmiş ve istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir. SDS-PAGE protein profillerinde özellikle gövde örneklerinin 0,8  $\mu$ L/mL'lik dozunda polimorfik protein bantlarına rastlanmıştır. Aynı türün uçucu yağları, çimlenen mısır tohumlarının hormon seviyelerinde de değişimlere neden olmuştur. GA miktarı ilk üç dozda azalırken son dozda kontrolden az olmak kaydıyla artmıştır. ZA miktarı 0,2 ve 0,4 $\mu$ L/mL dozlarında azalmış, diğer dozlarda ise kontrole göre miktarının arttığı gözlenmiş ve 0,8 $\mu$ L/mL dozundaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. IAA ve ABA miktarları da 0,2 ve 0,4 $\mu$ L/mL dozlarında kontrole göre azalırken diğer dozlarda arttığı gözlenmiştir. Bu durum uygulanan uçucu yağların belli dozlarda organizmada geri dönüşümsüz hasarlara neden olup metabolik olayları durdurması veya hormonların hücrede inaktif öncül maddeler (aminoasit, şeker esterleri veya konjugatlar) şeklinde depolanabilme özelliklerinden kaynaklanabilir (Osborne and McManus 2005). Triptofan aminoasidinden oluşan IAA ile adenin türevi ZA hormonlarının seviyelerindeki düzensizliklerin, uçucu yağların hücre siklusunda veya DNA molekülünde meydana getirdikleri hasardan dolayı aminoasitlerin veya adenin gibi azotlu organik bazların sentezlenememesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. RAPD, AFLP ve protein profillerinde meydana gelen değişimler de bu durumu desteklemektedir. Kloroplastlarda izo pentildifosfattan oluşan ve sesquiterpen türevi olan GA ve ABA hormonlarının seviyesindeki değişimler ise öncül maddelerinin inaktif oluşuyla, biyosentezlerinin durdurulmasıyla veya çimlenme sırasında örneklerde oluşan kloroplast organellerinin sayısındaki değişimlerle açıklanabilir (Osborne and McManus 2005; Kocaçalışkan 2010).

Genel itibariyle *C. nepeta* uçucu yağlarının, kullanılan parametrelerin çoğunda 0,2 ve 0,4 $\mu$ L/mL dozlarında önemli değişimlere neden olduğu söylenebilir. Literatürde

*C.nepeta*'nında içinde bulunduğu 17 farklı türün ekstralarının olası herbisit özelliklerini belirlemek için Araniti *et. al* (2012)'ın yapmış olduğu çalışmada bu bitkinin model bitki *Lactuca sativa* L.'nin çimlenmesi ve kök gelişimi üzerine kuvvetli allelopatik etki gösterdiği vurgulanmıştır. Bir diğer çalışmada marul, domates ve salatalık bitkileri üzerine aynı türün uçucu yağlarının, bu bitkilerin özellikle hipokotil bölgelerinde nekrotik lezyonlara sebep oldukları belirlenmiştir (Alonso-Amelot *et al.* 2006). Çalışmamız yukarıda bahsedilen çalışmalarla paralellik göstermiştir. Buna ilaveten bu türden elde edilen uçucu yağların bazı iltihaplı hücrelerde apoptotik hücre ölümlerine neden olduğu bildirilmiştir (Amira *et al.* 2012). Yağ içeriği olarak ise literatürde, mevcut çalışmamıza benzer içeriklerin tespit edildiği çalışmaların yanı sıra (Yaşar vd 2011; Miladinovic *et al.* 2012) farklı içeriklerin bulunduğu çalışmalara da rastlanmıştır (Demirci vd 2011). Bu farklılığın sebebi; kullanılan türün farklı coğrafik bölgelerde bulunmasından, çiçeklenme dönemlerinin farklı oluşundan veya farklı zamanlarda hasat edilmesinden kaynaklanabilir. Bu türle ilgili literatürde yapılan çalışmaların büyük bir kısmını antimikrobiyal, antifungal çalışmalar oluşturmaktadır. Çalışmamızda yapılan sitotoksik, genotoksik ve fizyolojik çalışmalara benzer herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. *C. nepeta*'dan elde edilen uçucu yağların tohum gelişiminin her aşamasında etkili olduğu görülmüştür. Her ne kadar allelokimyasalların büyük bir bölümünün etki mekanizması tespit edilmişse de, çalıştığımız uçucu yağların da bulunduğu bir grup allelokimyasalın etki mekanizması hakkında literatürde yeterince bilgi bulunmamaktadır. Çoğunluğunu monoterpenlerin oluşturduğu bu içeriklerin lipofilik özelliklerinden dolayı hücre zarından kolaylıkla geçebildikleri ve membran permeabilitesini bozabilecekleri önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Duke and Oliva 2004). *C.nepeta* içeriğinin büyük bir kısmını oluşturan piperitone türevleri uygulandıkları hücrelerde K<sup>+</sup> kanallarının açılmasını Ca<sup>2+</sup> kanallarının ise kapanmasını sağlayarak zar potansiyelini değiştirdikleri ve böylece hücre içi ve hücreler arası madde geçişini engelledikleri belirtilmiştir (Sousa *et al.* 1997). Bu bitkide en fazla bulunan içeriklerden monosiklik monoterpen grubuna ait olan limonenin ise benzer şekilde sitotoksik olduğu ve solunumda görevli olan Co-A redüktaz ile bazı proteinleri inhibe ettiği bilinmektedir. Ayrıca *C. nepeta*'da bulunan limonen ve karvakrol lipofilik etkilerinden dolayı hücre membranında yığılmalara ve ATP enerjisinin boşalmasına neden oldukları belirtilmiştir (Ultee *et al.* 1999; Duarte and Figueira 2009). Çeşitli



monoterpenlerin, çentikleyici ve yeniden kapatıcı enzimler olarak bilinen DNA topoizomerazları inhibe ederek DNA'da tek zincir kırıklarına neden oldukları da bilinmektedir. Dolayısıyla tüm içeriğin uygulandığı örneklerde yukarıda bahsedilen etkilerin tümünü görmek mümkün olacaktır. Çalışmamızda çimlenme oranları, mitotik hücre bölünmesi ve protein yapılarında görülen değişimler bahsedilen içeriklerin sahip olduğu özelliklerden kaynaklanmış olabilir. Uçucu yağlar, çimlenme esnasında zar potansiyelini değiştirmek suretiyle, tohumun su alımını engellemiş veya bölünme için gerekli ATP ve proteinlerin sentezini bloke etmek suretiyle bölünmeyi, dolayısıyla çimlenmeyi engellemiş olabilirler. DNA işlenmesinde çeşitli basamaklarda görevli enzimleri bloke etme yeteneğine sahip bileşiklerin varlığı, DNA'da oluşacak mutasyonların onarılmasını engelleyebilir. Dolayısıyla oluşacak hasarların, genomun stabilitesini değiştirmekle kalmayıp oluşacak ürünlerin miktar ve yapısını da değiştirebileceği söylenebilir. RAPD ve AFLP analizlerinde gözlenen değişimler uçucu yağ içeriğinin benzer özelliklerinden kaynaklanabilir. Ancak gözlenen genetik değişimlerin sadece mutasyonlardan kaynaklandığı söylenemez. Bu kadar yüksek oranda mutasyon meydana gelmesi morfolojik olarak farklı değişimleri de beraberinde getirmelidir. Oysa SDS-PAGE profillerinde çok az miktarda değişim gözlenmesi ve elde edilen protein bantlarında farklı bant yoğunluklarının gözlenmesi, bu değişime mutasyonlar dışında metilasyon gibi mekanizmaların da rol alabileceğini göstermiştir. Çünkü DNA metillenmesinin özellikle gen ifadesini düşürebileceği belirtilmiştir (Tollefsbol 2004). Öte yandan düşük çimlenme oranlarının görüldüğü dozlarda fazla sentezlenmesi gereken ABA hormonunun az sentezlenmesi ise yukarıda bahsedilen limonen türevi bileşiklerin varlığından kaynaklandığı düşünülebilir. Zira ABA sesquiterpen yapısında bir hormondur, dolayısıyla Asetil Co-A'dan mevalonik asit yoluyla sentezlendiği bilinmektedir (Creighton 1999). Asetil Co-A inhibitörleri bu hormonun sentezini de düşürecektir. Gelişim aşamasındaki bitkilerde yüksek dozlarda bulunması gereken büyümeyi teşvik eden hormonlar (GA, ZA, IAA) tohumun bu stres durumundan etkilenmiş ve miktarları düşük dozlarda düşük seviyelerde seyretmiştir. Son dozlardaki artış ise artan GA miktarına bağlı olarak organizmada oluşan stres durumunu ortadan kaldırmaya yönelik olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada kullanılan diğer bir bitki *M. Longifolia*, içerik olarak monoterpen ve diterpenlerden oluşmuştur. İçeriğin büyük bir kısmını, Piperitenon türevleri ve Pulegon gibi monoterpenler ile karyofilen türevi sesquiterpenler oluşturmuştur. Çimlenen tohum oranları bu türde de *C. nepeta*'da olduğu gibi doza bağlı olarak azalmıştır. Mitotik indeks oranlarında ise kontrol ile 0,1 ve 0,2µL/mL dozları arasındaki fark önemsizken 0,4 ve 0,8µL/mL dozlarda sırasıyla %12,5 ve %12,7'ye düşerek kontrolden önemli bir şekilde uzaklaşmıştır. Düşük çimlenme ve bölünme oranlarına rağmen RAPD sonuçlarında en yüksek polimorfizm oranı beklenenin aksine 0,1µL/mL dozunda gözlenmiştir. Doza bağlı olarak polimorfizm oranı azalırken GTS ise normale yaklaşım artan doza bağlı olarak sırasıyla %64,13, %67,39, %70,65 ve %75 olarak belirlenmiştir. Bu bağlamda RAPD sonuçlarının önceki parametreleri desteklemediği gözlenmiştir (Çizelge 4.10). AFLP analizlerinden elde edilen ve şekil 4.10'da belirtilen dendograma göre ise 0,4 ve 0,8µL/mL dozları bir grup oluşturup en yakın dozlar olarak belirlenirken, kontrol ve diğer dozlar birbirlerine oldukça yakın diğer bir grup olarak belirlendi. Genetik benzerlik indeksine göre de 0,4 ve 0,8µL/mL dozları 0,445 oranıyla en yakın dozlar olarak belirlenmiştir. Kontrole en uzak doz ise 0,272 oranıyla 0,8µL/mL dozu olmuştur. Bu değerlerden de anlaşılacağı gibi AFLP sonuçları RAPD sonuçlarını tam olarak desteklememiş fakat çimlenme oranları ile mitotik indeks oranlarını desteklemiştir. Öte yandan çözümlü protein miktarları kök örneklerinde kontrole göre artmış ancak bu artış doza bağlı bir artış olmamıştır. Gövde örneklerinde ise 0,1µL/mL dozu hariç diğer dozlarda, artan doza bağlı olarak çözümlü protein miktarlarında azalmalar tespit edilmiştir (Çizelge 4.22). Bu durum SDS-PAGE protein profillerine de yansımıştır. Protein profilleri diğer parametreleri destekler nitelikte değişimler sergilemiştir. Özellikle kök ve gövde örneklerinin 0,4µL/mL dozlarında gözle görülür değişimler kaydedilmiştir. Değişimler; yeni protein polimerlerinin oluşması, kaybolması ve yoğunluklarının değişmesi şeklinde kendini göstermiştir (Şekil 4.21). Hormon seviyelerinde ise yine dozlardan bağımsız olarak azalma ve artışlar söz konusu olmuştur. Özellikle GA'nın ilk iki dozda kontrole göre azaldığı gözlenirken 0,4µL/mL dozunda kontrolden fazla sentezlenmiş olup 0,8µL/mL dozunda ise yine kontrole aynı seviyelere düşmüştür. ZA, IAA ve ABA miktarları 0,1µL/mL dozunda kontrole göre azalırken diğer dozlarda artış göstermiştir. Tüm dozlardaki artışın önemli seviyelerde olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.28). Uygulanan uçucu yağların ilk dozunda hormon

seviyelerinde meydana gelen azalmanın, tohumların strese girmesine bağlanmıştır. Yüksek dozlarda ise tohumların oluşan bu olumsuz koşullardan sıyrılmak için homeostatik mekanizmalarını devreye soktuğu, bundan dolayı hormon seviyelerinde artış meydana geldiği düşünülmektedir.

Literatürde *M. longifolia* ile ilgili birçok çalışmaya rastlanmıştır. *M. longifolia*'dan elde edilen farklı ekstraktlardan özütler elde edilmiş ve bu özütlerin mutajenik, komutajenik ve antimutajenik potansiyele sahip oldukları belirlenmiştir (Orhan 2010). Bazı özütlerinin toksik serbest radikalleri süpürücü özelliğe sahip olduğu (Ahmad *et al.* 2012b) kuvvetli sitotoksik oldukları, herbisit olarak kullanımları için yapılan çalışmalarda test bitkilerinin çimlenmesi üzerinde kuvvetli inhibitör etki yarattıkları (Khan *et al.* 2011), test edilen hücre zarlarında  $Ca^{2+}$  kanallarını bloke ettikleri (Shah *et al.* 2010) önceki çalışmalarda belirtilmiştir. P-simen veya  $\alpha$ -terpinen ile sinerjik etki gösteren karvakrol'un, uygulandıkları bitkilerde çimlenmeyi inhibe ederken kök ve gövde uzamasını etkilemedikleri gözlenmiştir (Vokou *et al.* 2003). Dolayısıyla total olarak uygulanan uçucu yağların allelopatik etkilerini gösterme biçimlerine, içeriklerin sinerjik veya antagonistik etkileşimlerini de eklemek mümkündür. İçerik olarak literatürdeki çoğu çalışmayla uyum gösteren *M. longifolia*'nın uçucu yağ içeriği, miktar olarak bölgesel ve genetiksel farklılıklardan dolayı değişiklik göstermiştir (Hajlaoui *et al.* 2009; Mkaddem *et al.* 2009). Çok sayıda içerik bulundurduklarından dolayı, uçucu yağların tamamı için spesifik hücresel bir hedeften bahsedilemez. Bileşenleri tek tek incelendiğinde ise farklı etkilere sahip oldukları görülmüştür. Örneğin, *M. longifolia*'da en fazla bulunan ve monoterpen grubuna dahil olan piperiton türevlerinin önceki çalışmalarda hücresel deformasyonlara neden oldukları bildirilmiştir (Tripathi *et al.* 2004). Sitoplazmik zarı kolaylıkla geçip membran geçirgenliğini değiştiren bu bileşenlerin hücrelerin protoplazmik muhteviyatını da önemli derecede etkiledikleri söylenebilir. Yapısal ve fonksiyonel olarak değişiklik gösteren terpenoidler farklı görevler üstlenmek için değişikliklere uğramışlardır. Özellikle üreme, büyüme, gelişme ve savunma sistemlerinin vazgeçilmez unsurları haline gelmişlerdir (Gershenzon and Kreis 1999). Monoterpen, diterpen ve sesquiterpen gruplarının dâhil olduğu  $C_5$ - $C_{20}$  grubu terpenler GA ve ABA'nın da dahil olduğu terpen grubudur (Thomas *et al.* 2005).

Dolayısıyla uygulanan uçucu yağlardan bu gruba dahil olan içeriklerin bahsi geçen hormonlara benzer etkinlikler göstermesi beklenebilir. Schempp *et al.*(2005)'ın da belirttiği gibi stres faktörlerinin biyolojik olanlarından biri de allelokimyasallardır. Uygulandıkları veya maruz bırakıldıkları bitkilerde strese neden olan bu kimyasallar bitkide avoidans, adaptasyon veya savunma içerikli farklı mekanizmaların devreye girmesine neden olurlar (Schempp *et al.* 2005), dolayısıyla bitkide olası fizyolojik değişimler gözlemek mümkün olacaktır. Allelokimyasallar uygulandıkları hedef bitkide bazı genleri etkilemek suretiyle çeşitli enzimlerin sentezini inhibe ettikleri bilinmektedir (Mao *et al.* 2006). Karyofilen türevlerinin çeşitli reseptörlere bağlanmak suretiyle farklı dozlarda mutajenik veya antimutajenik etkiyi gösterdikleri bilinmektedir (Dutra *et al.* 2012). Bu bağlamda DNA'da meydana gelen değişimler ise; genomda şekillenen delesyon, insersiyon veya primerlenme bölgelerindeki ya da bölgeler arasındaki nükleotid dizilimin farkından kaynaklanabilir (Devrim ve Necati 2006). RAPD profillerindeki değişimler, uygulanan uçucu yağların neden olduğu stres durumundan kaynaklanabilir. GTS değerlerinin artan doza bağlı olarak normale yaklaşması, uygulanan uçucu yağların düşük konsantrasyonda mutasyonlara neden olabileceğini, yüksek dozlarda ise sahip oldukları antimutajenik etkiyle veya uçucu yağların uygulandığı bitki örneklerinin, karşılaştıkları olumsuz koşullara hızlı bir şekilde cevap vermeleriyle açıklanabilir. Uygulanan yağ içeriğinin farklı sayıda ve miktarda bileşen içermesi, uygulanan doza bağlı olarak etkiler gösterebilir. Örneğin; esansiyel yağlardan kaynaklanan hücreler arası redoks potansiyelleri ve mitokondriyal işlev bozukluklarının farklı dozlarda uygulanan bu bileşenlerin antigenotoksik etkilerinden kaynaklanabilir (Bakkali *et al.* 2008b). Ancak AFLP profillerinde, RAPD sonuçlarından farklı olarak tespit edilen değişimler, genomda meydana gelen değişimlerin sadece mutasyonlarla değil epigenetiksel modifikasyonlardan DNA metilasyonu yoluyla genlerin susturulmasıyla da mümkün olabileceğini gösterir (Anonim 2012). Çalışmamızda kök örneklerinde kontrole göre artış gösteren çözünür protein miktarları, stres şartlarında bitkinin verdiği tepki olarak değerlendirilebilir. Farklı stres koşullarında bitkide çözünür proteinlerin çözünürlüğünü artıran prolin aminoasidinin artışı buna örnek olarak verilebilir (Öncel ve Keleş 2002). Bu durum koruma amaçlı bir uyum olup bitkiden bitkiye farklılıklar gösterebilir (Greenway and Munns 1980). Kök örneklerinde çözünür proteinler artış gösterirken gövde örneklerinde azalma tespit edilmiştir. Bu durumun;

çimlenen tohumun stres faktörlerine maruz kalan ve tohumdan çıkan ilk kısmın radikula oluşundan kaynaklandığı düşünülmektedir. SDS-PAGE profillerinde, önceki parametrelerdeki gibi yüksek oranlarda inhibisyon görülmemesinin sebebi, meydana gelen değişimlerin DNA'nın fonksiyonel olmayan bölgelerinde meydana gelmiş olabileceğinin göstergesidir.

Yağ içeriğinin %78,26'ini sesquiterpenler geri kalan kısmını ise monoteren, diterpen ve triterpenlerin oluşturduğu *N. nuda* bitkisinden toplamda 23 farklı içerik tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Kontrol ile kıyaslandığında uçucu yağların uygulandığı tüm dozların çimlenme oranında düşüş gözlenmiştir. Mİ sonuçlarına göre 0,1µL/mL ve kontrol ile 0,1 ve 0,2 µL/mL dozları arasındaki farkın önemsiz olduğu, 0,4 ve 0,8 µL/mL dozları ile kontrol örnekleri arasındaki farkın ise önemli bulunmuştur (Çizelge 4.8). *N. nuda*'nın uçucu yağlarının uygulandığı mısır tohumlarının RAPD profilleri, çimlenme oranları ve Mİ sonuçlarına paralellik göstermemiştir. Artan doza bağlı olarak polimorfizm oranlarının azaldığı ve genetik kalıp stabilitesinin artan esansiyel yağ oranıyla beraber normale yaklaştığı gözlenmiştir (Çizelge 4.11). Buna bağlı olarak AFLP analizlerine göre dozlar arasındaki yakınlık oranının en fazla 0,4 ile 0,8 µL/mL dozları arasında olduğu ve RAPD sonuçlarını desteklemediği görülmüştür. Genetik benzerlik indeksine göre de 0,4 ve 0,8 µL/mL dozları 0,782 oranıyla birbirine en yakın dozlar olarak belirlenmiştir. Kontrole en uzak doz ise 0,351oranıyla 0,8µL/mL dozu olmuştur. Kök ve gövde çözümler proteinlerinin kontrole göre inhibisyona uğradıkları tespit edilmiş ancak bu azalmanın doza bağlı olmadığı tespit edilmiştir. Çözünür protein miktarı gövde örneklerinde 0,2µL/mL dozunda 12,8'lik inhibisyon oranı gösterirken gövde örneklerinde ise 0,4µL/mL dozunda 7,6 oranında inhibisyon gözlenmiştir. Çözünür protein miktarındaki dalgalanmaların protein profillerine yansımadağı belirlenmiştir. Bu sonuçlar strese giren mısır tohumlarının genetiksel değişimlere uğradığının göstergesidir. Uçucu yağların gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimleri gözlemek için ise SDS-PAGE ile protein profilleri incelenmiş ve meydana gelen değişimin önemli olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.22). Bütün hormonların; kontrole kıyaslandığında miktarlarının azaldığı ZA dışındaki değişimlerin istatistiksel olarak önemli olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.29). Bu durum benzer şekilde

önceki çalışmalarda da tespit edilmiştir (Eom *et al.* 2006). Uygulanan uçucu yağların sinerjik çalışabileceklerini veya aktivasyondan ziyade inhibisyona neden olduklarını düşündürmektedir. Kocaçalışkan (2006)'nın da belirttiği gibi allelokimyasalların hormon sentezini, metabolik reaksiyonlardaki enzimleri veya enzim aktivitelerini etkilemek suretiyle engelledikleri de düşünülebilir. Osborne ve McManus (2005) bu durumu ABA'nın; i) GA sentezinden sorumlu  $\alpha$ -amilaz enzimini bloke ederek bu enzimin sentezini durdurabileceği veya ii) DNA'nın replikatif formunda inhibisyona neden olabileceği ile açıklamışlardır.

Önceki çalışmalarda *Raphanus sativus* L. ve *Lepidium sativum* L. bitkilerine uygulanan *N. nuda* uçucu yağ içeriğinin, bu türlerin kök gelişimlerini büyük ölçüde inhibe ettiği sonucuna varılmıştır (Mancini *et al.* 2009). Benzer etki bu çalışmada da görülmüş, mısır tohumları artan dozla beraber inhibisyona uğramıştır. Nostro *et. al* (2001) yapmış oldukları çalışmada, *Nepeta* türünden elde edilen ekstraların, bazı bakteri türlerinin enzimatik aktivitelerini düşürdüğü, DNAz, termonükleaz ve lipaz gibi enzimleri inhibe ettiklerini belirlemişlerdir. Böyle bir etki, DNA başta olmak üzere çeşitli metabolik olaylarda düzensizliklere neden olmaktadır. Sesquiterpenler monoterenlerle beraber en kuvvetli allelopatik ajanlardır (Macias *et al.* 1999). Ancak sayısal çoğunlukları ve yapısal farklılıkları, çoğunun etki mekanizmasının aydınlatılmasını engellemiştir. Literatürde özellikle mikrobiyal genotoksisite testleriyle yapılan çalışmalara rastlamak mümkündür. Örneğin; Kılıç (2005)'ın bildirdiğine göre, TA 97, TA 98, TA 100, TA 102 suşlarında, *Salmonella*/ mikrozom testi ile mutajenik etkisi araştırılan monoterenlerden sitral, sitronelal, ( $\pm$ ) kamfor, 1,8 – sineol ve (-) mentol mutajenik etki göstermezken, terpinol TA 102 suşunda revertant oluşumunu arttırarak mutajene karşı etkili olmuştur. Benzer çalışmalar ökaryotik organizmalarda da denenmiş ve uçucu yağ olan eugenol bileşiğinin antimutajenik, antikanser, antigenotoksik olduğu vurgulanmıştır (Jaganathan and Supriyanto 2012). Kamfor, sineol gibi bileşiklerin DNA molekülünde önemsenmeyecek lezyonlara neden oldukları ancak bunun yanında DNA onarımını stimüle ederek biyoantimutajenik etki gösterdikleri belirtilmiştir (Nikolic *et al.* 2011). DNA örneklerinde GTS değerlerinin belirli dozlarda normale dönmesi allelokimyasalların sahip oldukları bu etkiye bağlanmıştır.

Gkinis vd. (2010) yapmış oldukları çalışmada *N. nuda* bitkisinin yapraklarında, yüksek oranda antioksidan özelliğe sahip ve bu çalışmadaki içeriklere benzer uçucu yağlar tespit etmişlerdir. Bu içeriklerden özellikle Nepetalakton türevlerinin toksik etki gösterdikleri belirlenmiştir (Gkinis *et al.* 2003). Yapılan bir diğer çalışmada ise 1,8-sineole, ve 4aa,7β,7α-nepetalakton'nun büyük kısmını oluşturduğu uçucu yağların, genetiği değiştirilmiş çim ve marul tohumları üzerine kuvvetli fitotoksik etki yarattıkları belirtilmiştir (Kobaisy *et al.* 2005). Çalışmamızda benzer etkinin görülmesi, bu aktif doğal bileşenlerin genetik ve/veya fizyolojik etkilerinden kaynaklandığını göstermektedir. Membran bütünlüğünü bozarak makromoleküllerin hücreden çıkışına, aynı zamanda sitoplazmanın koagüle olmasına neden olan uçucu yağlar, sitotoksik etkiye neden olup hücrel proteinleri ve lipitleri deforme etmek suretiyle fizyolojik hasarlara neden olmaktadır (Hussain 2009b). Örneğin; sinmetilin herbisidinin geliştirilmesinde kullanılan allelopatik etkisi belirlenen kuvvetli monoterpen 1,8 sineol uygulandığı bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz etkilemiştir (Duke *et al.* 1999). *N. nuda*'da da az da olsa bu bileşenin bulunması benzer aktivite göstermesinin nedeni olabilir. *N. nuda*'dan elde edilen ve mısır tohumlarına uygulanan farklı yapı ve sayıdaki uçucu yağların stres faktörleri gibi davranarak tohum çimlenmesini, hücre bölünmesini, genomu etkilemek suretiyle yapısal ve fonksiyonel proteinlerin biyosentezini olumsuz yönde etkiledikleri söylenebilir.

İçeriğinin %84,48'ini karvakrol ve timol'un oluşturduğu *O. rotundifolium* bitkisinden elde edilen uçucu yağların toplam 10 farklı içerikten oluştuğu tespit edilmiştir. Bu bileşenlerin %80'i monoterpen, kalan kısmı ise sesquiterpen olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Çimlenme oranlarında bariz bir şekilde doza bağlı olarak düşüş tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Mİ testinde ise yine artan uçucu yağların dozuna bağlı olarak bölünen hücre sayısının azaldığı gözlenmiştir. Kontrol örneklerinde 19,3 olarak belirlenen bölünen hücre yüzdesi 0,1µL/mL dozda %18,5, 0,8µL/mL dozunda ise 13,5 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Kromozomal aberasyonlar, mikronükleus ve hücrel deformasyonlar da yine artan doza bağlı olarak görülmüştür (Şekil 4.1). RAPD sonuçlarına göre artan uçucu yağların dozuna bağlı olarak polimorfizm oranlarında azalmalar tespit edilmiştir. 0,1µL/mL dozunda 47,83 olarak belirlenen polimorfizm

oranının 0,4 $\mu$ L/mL dozunda 10,83'e düştüğü 0,8 $\mu$ L/mL dozunda ise tekrar yükseldiği gözlenmiştir. GTS değerleri ise yine 0,4 $\mu$ L/mL dozunda 85,86 ile normale en yakın doz olarak belirlenmiştir. *N. nuda*'da olduğu gibi bu türde de RAPD sonuçları diğer parametrelerle korelatif bir değişim göstermemiştir. Genetik toksikolojide, nokta mutasyonlar, delesyon, insersiyon, poliploidi ve yeniden düzenlemeler gibi genomda meydana gelen değişimleri ölçmek için kullanılan RAPD tekniği (Liu Wan *et al.* 2005) bu çalışmada da benzer sonuçlar vermiş ancak diğer parametrelerin tersine artan dozla beraber genom stabilitesinin arttığını göstermiştir. Bu durum iki şekilde açıklanabilir: 1) Sitotoksik etki gösteren uçucu yağlar, DNA replikasyon hatalarını engellemek suretiyle artan uçucu yağ dozuna bağlı olarak oluşacak hasarın düşük seviyelerde kalmasını sağlamış olabilir 2) Tekrarlanabilirliğinin düşük olması (Santos *et al.* 1994) düşük sayıda bant profili oluşturması ve kullanılan primerlerin, uygulanan türe özgü olmaması gibi tekniğin dezavantajlarından kaynaklanabilir. Öte yandan AFLP analizlerinden elde edilen dendograma göre, 0,4 ile 0,8  $\mu$ L/mL dozları birbirlerine en yakın dozlar olarak belirlendi. Genetik benzerlik indeksine göre ise 0,715 oranıyla 0,4 ve 0,8  $\mu$ L/mL dozları birbirlerine en yakın dozlar olurken, kontrole en uzak doz 0,366 oranıyla 0,2  $\mu$ L/mL dozu olarak belirlendi. AFLP sonuçları da RAPD sonuçlarına benzer şekilde dozdan bağımsız etki göstermiştir. Farklı dozlarda uygulanan uçucu yağların yapısal ve sayısal farklılıkları, dozdan bağımsız değişimlere neden olmuştur. Bu etkinin çözünür protein miktarlarına da yansıdığı gözlenmiştir. Kök örneklerinin tümünde kontrole göre artış gözlenirken, kontrole göre en fazla değişim gösteren doz 55,88  $\mu$ g/mL ile 0,4  $\mu$ L/mL dozu olmuştur. Gövde örneklerinde ise 0,1 ile 0,2  $\mu$ L/mL dozlarında azalan çözünür protein miktarları diğer iki dozda artış göstermiştir (Çizelge 4.24). SDS-PAGE profillerinde ise özellikle köklerden elde edilen protein profillerinde, bazı bantların kaybolması veya zayıflaması ve bant yoğunluklarında artış şeklinde değişimler gözlenirken gövde örneklerinde herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır. Bu durum RAPD sonuçlarını destekler nitelikte olmuştur. Çünkü RAPD profillerine göre genomik stabilite en düşük 0,1 $\mu$ L/mL dozunda %52,17 iken normale en yakın dozda (0,4 $\mu$ L/mL) %85,86 olarak ölçülmüştür. AFLP sonuçlarında ise genetik benzerlik indeksinin bazı dozlar arasında normale (0,715) yaklaşması kısmen bu durumu destekler niteliktedir. Elde edilen hormon verilerine göre ise ZA ve ABA hormonlarının 0,8 $\mu$ L/mL dozunda kontrole göre arttıkları diğer dozlarda ise azaldıkları belirlenmiştir. IAA'nın ise kontrole



göre sadece 0,1 $\mu$ L/mL dozunda arttığı saptanırken GA'nın tüm dozlarda kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.30). Yukarıda belirtildiği gibi mısır tohumlarında ölçülen bölünme yüzdelerinin ve genetik değişimlerin kontrole yakın olması hormon seviyelerinde değişimlere neden olmuştur. Hücre zarı yapısını bozmayıp strese neden olmak kaydıyla, organizmada hormon ve protein seviyelerinin değişmesine neden olan uçucu yağlar, doğrudan veya dolaylı olarak mitotik bölünmeyi veya hücre döngüsünün ilerlemesini etkileyebilir. Bu etki, hormonların veya uçucu yağların, siklin veya sikline bağlı kinazlar (CDK) denilen hücre döngüsünde çeşitli proteinlerin fosforilasyonuna yol açarak aktivite kazandıran bileşikleri (Hunter and Pines 1991) bloke etmesinden kaynaklanabilir. Örneğin; hücrelerin bölünme aşamalarından S (sentez) evresine geçişi ve hücre döngüsünü tamamlayabilmesi için çeşitli genlerin ifade edilmesine gereksinim vardır. Protein ve hormon sentezi için görevli organellerin yeterli sayıda olması bahsi geçen genlerin işlevlerine bağlıdır. Sitokin gibi bazı hormonların ökaryotik organizmalarda bu genlerin ifadesini etkiledikleri önceki çalışmalarda belirtilmiştir. Uçucu yağlar gibi büyüme regülatörü sayılabilecek bileşiklerin benzer etki göstererek hormon seviyelerinin farklı dozlarda değişiklikler göstermesine neden olduğu düşünülmektedir. Protein ya da hormon miktarındaki değişimler yukarıda bahsedilen mekanizmayla değil aynı zamanda tohumların stres şartlarına karşı farklı tepki (direnç) göstermesinden de kaynaklanabilir.

İçerik analizleri ile ilgili yapılan literatür çalışmaları bulgularımızı destekler nitelikte sonuçlar vermiştir (Dikbaş vd 2010). Bazı çalışmalarda ise içerik olarak benzer ama miktar olarak farklı sonuçlara rastlanmıştır (Göze vd 2009). Bu durum genetiksel ve coğrafik farklılıklarla hasat zamanının farklılığından kaynaklanmaktadır. *O. rotundifolium* bitkisinden elde edilen içeriklere bakıldığında yapılan çalışmalarda antimutajenik özellikleri öne çıkmıştır. Örneğin; karvakrolun, insan lenfosit kromozomlarında, pozitif bir mutajenle indüklenmiş kardeş kromatit değişimini önemli ölçüde azaltarak, antimutajenik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (İpek vd 2003). Kılıç (2005)'in bildirdiğine göre, timol, karvakrol ve  $\gamma$ -terpinenin insan lenfosit hücrelerinde DNA hasarlarını indükleyen 2-amino-3- methylimidazo (IQ) ve mitomycin C (MMC) gibi mutajenlere karşı antimutajenik etkileri test edilmiş ve timol ile  $\gamma$ -terpinenin 0,1

mM'den düşük konsantrasyonlarında IQ ve MMC'ye karşı antijenotoksik etki gösterdiği, ancak 0,2 mM'den yüksek konsantrasyonlarında ise bu iki maddenin DNA kırıkları şeklinde genetik hasara sebep oldukları saptanmıştır. Bu durumun karvakrol için de geçerli olduğu belirlenmiş, ancak etkili dozların timole göre daha düşük konsantrasyonlar olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı içeriğin belirli dozlarda antimitojenik bazı dozlarda ise DNA hasarlarına neden olmaları bu çalışmada da desteklenmiştir. 0,4µL/mL dozunda GTS değerlerini normale yaklaştırması, olası DNA değişimlerini azaltmak suretiyle gerçekleştirmiştir. Çimlenme yüzdelerinde, kontrole göre azalmaların gözlenmesi ise uçucu yağların uygulandıkları mısır tohumlarında strese neden olmalarıyla ilişkilendirilmiştir. Allelopatik etkisi bilinen karvakrol (Vokou *et al.* 2006) ile yapılan başka bir çalışmada bu bileşenin uygulandığı organizmaların hücrelerinde yağ asidi profilini etkileyerek membran akışkanlığını değiştirdikleri belirtilmiştir (Di Pasqua *et al.* 2006). Öte yandan Büyükleyla ve Rencüzoğulları (2009)'nin yapmış olduğu çalışmada *timol*'ün insan periferik lenfosit hücrelerinde SCE ve mikronükleusu arttırdığı mitotik bölünme oranını ise düşürdüğünü belirtmişlerdir. Bu çalışmalar da yaptığımız çalışmayı destekler niteliktedirler. Milos ve Makota (2012)'nin yapmış olduğu bir çalışmada bu iki kimyasal bileşenin beraber uygulandıkları canlıda sinerjik bir etkiyle beraber antioksidan özellik göstermiştir. Yine bu iki kimyasal içeriğin kuvvetli antimikrobiyal (Pirbalouti *et al.* 2011) antifungal (Numpaque *et al.* 2011) olduğu belirtilmiştir. Bir diğer çalışmada, antioksidan özelliklerinden dolayı koruyucu özellikleri araştırılan karvakrol ve timolün düşük dozlarda memeli lenfositlerinde antimitojenik oldukları ve yüksek dozlarda ise DNA hasarına ve zincir kırıklarına neden oldukları belirlenmiştir (Slamenova *et al.* 2007).

Çözünür protein seviyeleri, hormon miktarları ve protein profillerinde meydana gelen değişimlerin sebebi; tohumların strese girmelerine ve buna bağlı olarak meydana gelen fizyolojik ve genetiksel değişimlere bağlanmıştır. Allelokimyasalların benzer etkileri önceki çalışmalara da yansımıştır. Fenolik bir madde olan ve dışsal bir uyarıcı olarak (hormon gibi) kullanılan salisilik asitin bazı stres koşullarında uygulandığı domates bitkisinin kök örneklerindeki protein miktarını arttırdığı görülmüştür (Wasti *et al.* 2012). Uygulandığı zaman hücre bölünmesini etkileyerek IAA ve GA hormonlarının

seviyesini düşüren allelokimyasallar da mevcuttur (Tomaszewski and Thimann 1966). Benzer durum çalışmamızda belirlenmiştir. Uygulanan uçucu yağlar mısır tohumlarında strese neden olmuş kök proteinlerinin seviyesi artmış buna karşın gövde proteinlerinde azalmalar saptanmıştır. Bitkide allelokimyasallarla karşılaşan ilk kısım olan kökler; avoidans, tolerans gibi mekanizmalarını harekete geçirmek suretiyle bitkiyi koruduğu bilinmektedir (Kocaçalışkan 2010). Bundan dolayı bitkinin bu bölgelerinde diğer bölgelere nazaran biyosentez olayları artabilir. Hormon seviyelerindeki düşüş ise allelokimyasalların solunum gibi sentez basamaklarını bloke etmesinden veya hormon sentezini sağlayan gen bölgelerinin baskılanmasından kaynaklanabilir (Osborne and McManus 2005). SDS-PAGE profillerinde kök örneklerinde değişim görülürken gövde örneklerinde herhangi bir değişimin olmaması diğer parametrelerden elde edilen verileri desteklemektedir. Bu durum aynı zamanda AFLP ve RAPD teknikleriyle belirlenen ve DNA’da meydana gelen genetiksel değişimlerin, genellikle fonksiyonel olmayan bölgelerde meydana geldiğini düşündürmüştür.

İçerik bakımından en zengin tür olarak belirlenen *O. vulgare*’de yoğun olarak bulunan içerikler sesquiterpen yapısında olan karyofilen oksit (%34,44), ve  $\beta$ -karyofilen (%20,44) olmuştur. Bu içeriklerin %76’sını sesquiterpenler oluştururken geriye kalan kısım ise monoteren ve az miktarda bulunan diterpenlerden oluşmuştur. Çimlenme oranlarında özellikle ilk üç dozda kontrole göre önemli azalmalar gözlenirken, 0,8 $\mu$ L/mL dozunda tekrar artış gözlenmiştir. Mİ sonuçlarında da doza bağlı azalmalar gözlenirken 0,4 ve 0,8  $\mu$ L/mL dozları arasındaki fark önemsiz olarak belirlenmiştir. RAPD sonuçlarında ise polimorfizm oranları 0,4 $\mu$ L/mL doza kadar artış gösterirken 0,8 $\mu$ L/mL dozda bir önceki doza göre azalma gösterip çimlenme sonuçlarına paralellik göstermiştir. Buna bağlı olarak GTS değerleri 0,1 $\mu$ L/mL dozunda 77,17, 0,2 $\mu$ L/mL dozunda 67,39, 0,4 $\mu$ L/mL 63,04 ve 0,8 $\mu$ L/mL dozunda ise 65,21 olarak belirlendi (Çizelge 4.13). AFLP verilerinin analizi ile elde edilen Şekil 4.22’deki dendograma göre kontrole en uzak doz 0,378 oranıyla 0,8  $\mu$ L/mL dozu olmuştur. Çözünür protein seviyeleri kök örneklerinde dozdan bağımsız artarken kontrole en yakın doz, 0,8  $\mu$ L/mL olarak belirlenmiştir. Gövde örneklerinde ise kontrole en yakın doz olarak belirlenen 0,1 $\mu$ L/mL dozu dışındaki dozlarda kontrole göre artış saptanmıştır. Özellikle kök

örneklerindeki protein profillerinde ise kaybolan, yoğunluğu azalan veya artan bantlar gözlenmiştir. Gövde örneklerinde ise kontrole göre yoğunluğu değişen bir bant ile kaybolan bantlar saptanmıştır. Hormon analizleri incelendiğinde ise IAA ve ABA'nın 0,1 µL/mL dozları haricindeki diğer dozlarda kontrole göre dozdan bağımsız azalma tespit edilmiştir.

*O. vulgare*, çalıştığımız türler arasında, literatürde en fazla biyolojik aktivitesi çalışılan tür olmuştur. Ancak çalışmaların çoğu antiviral (Orhan vd 2012), antibakteriyel (Çakır vd 2011), antifungal (Mendes *et al.* 2012) antioksidan (Miguel *et al.* 2008), nematisidal (Menkissoglu-Spiroudi *et al.* 2010), kovucu (Kwon *et al.* 2010) ve anti-tümör (Güvenalp vd 2010) aktiviteleri üzerine yoğunlaşmış, türden elde edilen uçucu yağların genotoksik etkilerine ise rastlanmamıştır. Bazı allelopati çalışmalarında da kullanılan bu türün uçucu yağları *Aspergillus flavus*'a karşı mısır tohumlarını koruma amaçlı olarak mısıra uygulanmış ve mısırı etkilemeyen ancak mantar gelişimini engelleyen dozlar elde etmişlerdir (Montes-Belmont and Carvajal 1998). Economou *et al.* (2007)'ın *O. vulgare*'nin kök, gövde ve yapraklarıyla laboratuvar koşullarında gerçekleştirdikleri allelopati çalışmalarında, bitki ekstrelerinin uygulanan model bitkilerin yaş ağırlıklarında önemli derecede inhibisyona neden olduklarını dolayısıyla bu ekstrelerin fotosentez inhibitörleri olabileceklerini savunmuşlardır. Diğer bir çalışmada da çalışmamıza yakın sonuçlar elde edilmiş, *O. vulgare*'ninde içinde bulunduğu bitki ekstrilerinin, uygulandıkları bitkinin gelişimini engellediği ve kök uzamasını inhibe ettiğini tespit etmişlerdir (de Almeida *et al.* 2010). Özellikle herbisitlere alternatif olarak kullanılmak istenen uçucu yağlardan olumlu sonuçlar alınmış ancak sebep oldukları hasarlar tam olarak belirlenmemiştir. Bu amaçla yola çıkan Dhima *et al.* (2009) tarımsal alanlarda yaptıkları çalışmada *O. vulgare*'ninde içinde bulunduğu bir bitki grubundan elde edilen uçucu yağların mısır gelişimini engelleyen bazı yabancı otlara karşı kuvvetli inhibitör etki gösterdiklerini belirtmişlerdir. Bu durum, β-karyofilen oksit gibi sesquiterpen bileşenlerin farklı hücre tiplerinde sitotoksik etkiye neden olmasına bağlanmıştır (Jun *et al.* 2011). Çimlenme oranları ve bölünme yüzdelerinde meydana gelen inhibisyon bileşenlerin yukarıda bahsedilen özelliklerinden kaynaklanmıştır. Allelokimyasalların uygulandıkları canlılarda etki ettikleri ilk kısmın hücre zarları

olduğu daha önce belirtilmiştir. Bu etki, hücre zarında geri dönüşümsüz bir geçirgenlikle beraber iyon akışını ve köklerin hidrolik akışını etkilemek şeklinde oluşmaktadır. Membranlarda meydana gelen bu değişiklikler, beraberinde iyon miktarındaki değişimler, bitki-su ilişkisi, stomal fonksiyonlar, fotosentez ve solunum gibi bir dizi fizyolojik sorunu beraberinde getirmektedir (Einhellig 2004). Sitotoksik etki gösterirken sebep oldukları kromozomal anormallikler ve hasarlar bu etkiden kurtulan hücrede fizyolojik ve genetiksel bozukluklara neden olacaktır. RAPD ve AFLP sonuçlarında karşılaşılan polimorfizmlerin nedeni, uçucu yağların yukarıda da bahsedilen etkilerinden kaynaklanabilir. Öte yandan hormon ve protein miktarlarında meydana gelen değişimlerin yine uygulanan içeriklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bulgularımız literatürce desteklenmektedir. Örneğin; bazı sesquiterpenlerin uygulandıkları canlılarda hücreler arası boşluklarda  $Ca^{2+}$  iyonlarının yoğunluğunu değiştirmek suretiyle canlının bazı hormon seviyelerinde düşüslere neden oldukları önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Zamaraeva *et al.* 1999). 1,8-sineol, terpinen-4-ol ve karyofilen türevlerinin uygulandıkları mikroorganizmalarda ölümcül oldukları (Kordali *et al.* 2006) bazı canlılarda ise mitokondride elektron taşıma sistemini etkilemek suretiyle ATP'nin metabolizmasını değiştirdikleri (Monzote *et al.* 2009) ve böylece çeşitli hasarlara neden oldukları belirtilmiştir. Protein polimerlerinde gözlenen ve göz ardı edilebilecek orandaki değişimler ise, uçucu yağların neden olduğu genetiksel değişimlerin junk DNA denilen fonksiyonel olmayan bölgelerde meydana geldiğini göstermektedir.

İçeriğinin tamamına yakını analiz edilen *S. hortensis* bitkisinden elde edilen içeriklerin %60'ı monoterpen kalan kısmı ise sesquiterpen ve diterpen grubuna dahil olan yağlar olarak belirlenmiştir. Miktar olarak en fazla bulunan karvakrol (%79,17)'ün çeşitli enzimleri inhibe ettiği (Anderson and Coats 2012), kromozomal aberasyonlara, mikronükleus oluşumuna, apoptotik ve nekrotik hücre ölümlerine neden olduğu önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Gül vd 2012). Bu bitkiden elde edilen uçucu yağların uygulandığı mısır tohumlarının çimlenme oranlarında açık bir şekilde doza bağlı inhibisyon tespit edilmiştir. Benzer etki Mİ yüzdelere de yansımış kontrol örneklerinde 19,3 olarak ölçülen mitotik bölünme yüzdesi artan uçucu yağların dozuna

bağlı olarak düşmüştür. RAPD profillerinde ise 0,1 ve 0,2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozlarında polimorfizm oranları artarken 0,4  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozunda ilk iki doza nazaran azalmış ve 0,8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozda tekrar artmıştır (Çizelge 4.14). RAPD sonuçları, önceki parametrelerle paralellik göstermiştir. AFLP analizlerinde ise önceki parametrelerle kısmen benzer sonuçlar elde edilmiştir. Genetik benzerlik indeksine göre kontrole en uzak doz 0,8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozu olmuştur. Şekil 4.18 ve Çizelge 4.20'de de görüldüğü gibi AFLP sonuçlarının büyük çoğunluğunun RAPD sonuçlarını desteklemediği görülmüştür. Çözünür protein miktarları 0,1 ve 0,2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozlarında kontrole göre artış gösterirken 0,4  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ve 0,8  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dozlarında ise düşüş gözlenmiştir. Gövde örneklerinde ise kontrole göre bütün dozlarda inhibisyon gözlenmiştir. Çözünür protein seviyelerindeki değişimin doza bağımlı azalış veya artış olmadığı tespit edilmiştir. SDS-PAGE profillerinde ise önemli değişimler gözlenmemiştir. Çözünür protein seviyeleri, hormon miktarları ve protein profillerinde meydana gelen değişimlerin sebebi; yukarıda bahsedilen stres koşullarına bağlı olarak meydana gelen fizyolojik ve genetiksel değişimlere bağlanmıştır.

İçerik olarak bazı çalışmalarla benzerlik gösteren (Mihajilov-Krstev *et al.* 2009) bazılarıyla ise önemli derecede farklılıklar gösteren (Kızıl 2009) *S.hortensis*'ten elde edilen uçucu yağların *Salmonella enteritidis*'e karşı antibakteriyel etki gösterdiği, bu bakterilerin doymuş ve doymamış yağ asitlerinde değişimlere neden olduğu önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Kotan vd 2012). Özellikle allelokimyasallardan monoterpenlerin; kuvvetli fitotoksik oldukları, uygulandıkları bitkilerde anatomik ve fizyolojik değişimlere neden oldukları, sitoplazmik lipidlerin kümelenmesine neden oldukları, mitokondri başta olmak üzere çeşitli organelleri indirgedikleri, DNA sentezini inhibe ettikleri ve hücre içinde çekirdek ve mitokondri gibi zarlı yapıların bozulmasına neden oldukları bilinmektedir (Angelini *et al.* 2003; Zunino and Zygadlo 2004). Bu türde en fazla miktarda bulunan karvakrolun benzer etkileri önceki çalışmalarda açıklanmaya çalışılmıştır (Azırak ve Karaman 2008).

Önceki çalışmalarda, farklı allelokimyasalların hücre zarının geçirgenliğini bozarak hücre muhteviyatına özellikle mitokondri ve kloroplastı etkiledikleri belirtilmiştir

(Einhellig 2004). Allelokimyasallardan özellikle uçucu yağların bu özellikleri, daha önceden bahsedilen antimikrobiyal, antifungal, insektisidal gibi özelliklerini açıklamaya yardım edecektir. Allelopatinin tanımına paralel olarak literatürde bu bileşenlerin hem olumlu hem de olumsuz etkilerine rastlamak mümkündür. Örneğin; bahçelerde yabancı olarak yetişen *Cogongrass* denilen bir bitkiden elde edilen metanol, metil kronit ve su ekstralarının uygulandıkları marul bitkisi üzerine önemli inhibitör etkileri gözlenmezden, aynı türün uçucu yağlarının önemli derecede inhibisyona neden olduğu belirtilmiştir (Cerdeira *et al.* 2012). Ya da perillyl alkol olarak bilinen esansiyel yağın farelerde tümör oluşumunu %58 oranında inhibe ettiği mevcut tümörleri de %22 oranında azalttığı gözlenmiştir (Buchbauer 2009). Öte yandan *U. Reflexa*'nın uçucu yağlarının ise *Actinocyclus*, *Palmellosis*, *Spirotaenia*, *Microcystis*, ve *Marssionella* gibi cinslerde pozitif bir ilişki sergiledikleri belirtilmiştir (Chia *et al.* 2012). Bir diğer çalışmada da Spiassi *et al.* (2011)'in mısır tohumlarına uyguladıkları farklı bitki ekstralarından aspir ve kanola bitkisinin pozitif etki gösterdiklerini, şalgam, yulaf gibi bitkilerin ise negatif etki gösterdiklerini belirtmişlerdir. Özellikle uçucu yağların biyolojik aktivitelerini belirlemek amacıyla literatürde benzer çalışmalara sıklıkla rastlanmaktadır. Schmidt-Silva *et al.* (2011) çalışmalarında yıldızçiçeğigillerden elde ettikleri uçucu yağın soğan kökleri üzerinde sitotoksik etki yarattığını belirtmiş ve bu toksik etkinin yapışık kromozomlar, c-mitozis, mikronükleus ve anafaz köprüleri gibi kromozomal aberasyonlar şeklindeki açığa çıktığını belirtmişlerdir.

Genel anlamda esansiyel yağların uygulandıkları tohumlarda hücre zarının yapısını bozarak, bitki gelişimi için gerekli fitohormonlar, enzimler ve özel proteinlerin metabolik etkilerini inhibe ettikleri bilinmektedir. Sitoplazmik membrandan kolaylıkla geçebilen uçucu yağlar, zar yapısını bozduktan sonra geçirgenliğini değiştirmek suretiyle birçok sitoplazmik olayı etkileyebilmektedirler (Ultee *et al.* 1999; Hussain 2009b). Bu durum çalışmamızda görülen çimlenme oranı düşüklüğü ve mitotik indeks yüzdesindeki azalmanın nedeni sayılabilir. Mısır tohumlarına uygulanan uçucu yağların bölünme periyodundaki hücrelerin nükleik asit metabolizmasını, enzim ve protein sentezi gibi temel metabolik olaylarını etkiledikleri, böylece test bitkisinin mitotik aktivite, hücre döngüsü ve kromozom davranışlarını değiştirdikleri söylenebilir. Bu

durum daha önceki çalışmalarla desteklenmektedir (Lambert *et al.* 2001; Cox *et al.* 2001; Hussain 2009b). Uçucu yağların özellikle zarsı yapıları etkilemesi, ökaryotik organizmalardaki hücre zarı dışındaki zarsı organelleri de etkileyebileceğini göstermektedir. Nitekim Bakkali *et al.* (2008a) ve Novgorodov *et al.* (1996)'ın yapmış oldukları çalışmada uçucu yağların mitokondriyal zarların depolarizasyonunu stimüle ederek membran potansiyelini düşürerek,  $Ca^{2+}$  ve diğer iyonların iyonik kanallarını etkileyerek ortamın pH'sını düşürdüklerini vurgulamışlardır. Bu durumun, oksidatif stres durumunda çeşitli iyonların, proteinlerin ve ETS elemanlarının zarlardan uzaklaşmasına dolayısıyla hücrenin ölümüne neden olacağı, hücrede başlayan protein DNA ve hormon sentezinin düzensiz artmasını veya azalmasını tetikleyeceği düşünülmektedir (Armstrong 2006). Literatür çalışmaları, uçucu yağların sitotoksik etkilerini, zar sistemlerinde sebep oldukları deformasyonlara bağlamaktadırlar. Aynı zamanda sitotoksisite ile beraber petite mutasyon denilen küçük mutasyonlar ve oksidatif metabolizmada bozulma gibi durumlar ortaya çıkmaktadır (Ferguson and Von Borstel 1992). Organizmada meydana gelen bu değişimlerin durağan hücrelerden ziyade metabolik olarak aktif olanlarda meydana geldiği belirtilmiş ve bu durumun uçucu yağların aktif hücrelere daha kolay bağlanabileceğinden kaynaklandığı savunulmuştur (Bakkali *et al.* 2005). Dolayısıyla, uçucu yağların bitkinin promeristem kısımlarını daha kolay etkileyeceği bunun da mitotik indekste görülen değişimlerin sebep olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca RAPD ve AFLP analizlerinde görülen değişimlerin yukarıda bahsedilen küçük DNA mutasyonlarıyla bağlantılı olabileceği düşünülmüştür.

RAPD markırının kullanıldığı genetik toksikoloji çalışmalarında büyük çoğunlukla artan etken madde dozuna bağlı olarak GTS değerlerinde azalma, polimorfizm oranlarında ise artış gözleendiği belirtilmiştir (Liu W. *et al.* 2005; Cenkçi vd 2010b). Ancak mevcut çalışmada bazı örneklerde benzer etkinin olmaması farklı sayı ve yapıdaki uçucu yağların total olarak uygulanmasından kaynaklanmaktadır. Daha önce de belirtildiği gibi saf olarak elde edilen bazı uçucu yağların test organizmasına tek başına uygulandıklarında meydana getirdikleri etki ile farklı içeriklerle beraber uygulandıklarında sebep oldukları etkinin farklı oluşu bu durumu açıklamaktadır.



Dolayısıyla, total olarak uygulanan içeriklerin bazılarının sinerjik ya da antagonistik etki yaratarak etki mekanizmalarını güçlendirdikleri söylenebilir.

Allelopatinin tanımında da belirtildiği gibi allelokimyasalların hücreyi ya da organizmayı inhibe edici veya aktive edici içeriklere sahip oldukları bilinmektedir (Molisch and Magyar 1937). RAPD profillerindeki genomik stabilitenin veya polimorfizm oranlarının bazı içeriklerde dozlardan bağımsız ve düzensiz bir şekilde değişmesi farklı içeriklerin bir arada uygulanmasından kaynaklanmıştır.

Uçucu yağlar uygulandıkları bitkilerde strese neden olmaktadır. Organizma bu durumdan kurtulmak için farklı protein veya hormonların sentezini gerçekleştirebilir veya genom bazında farklı savunma mekanizmalarını çalıştırabilir. Bu etkiye sahip bileşenler, organizmada DNA metil transferaz enzimlerinin aktivitesini etkilemek suretiyle metilasyon veya demetilasyona neden olabilirler (Tollefsbol 2004). Bao Qi *et al.* (2010)'nin de belirttiği gibi canlıların, farklı stres koşullarına uyum sağlayabilmek için harekete geçirdikleri genomik savunma mekanizmalarından biri de DNA metilasyonudur. Bu mekanizma her ne kadar MSAP gibi AFLP temelli tekniklerle belirlense de bazı çalışmalarda uygun enzimler AFLP tekniğiyle kullanılarak yüksek bitkilerde 5'-C<sup>m</sup>CGG-3' şeklindeki internal metilasyonların ölçülebileceği belirtilmiştir (Vroh-Bi *et al.* 2010). Çalışmamızda da benzer şartların oluşturulduğu dolayısıyla bahsi geçen metilasyonların gerçekleşmiş olabileceği düşünülmüştür. RAPD profillerine benzer şekilde dozdan bağımsız değişimlerin saptanması yine farklı sayı ve yapıdaki içeriklerin total olarak uygulanmasından kaynaklanmaktadır. Bu durumun içeriklerden bazılarının negatif diğer bir kısmının ise pozitif etki göstermesinden de kaynaklanabilir. Literatürde uçucu yağlarla yapılan özellikle mikrobiyal genotoksisite testlerinde bu içeriklerin genotoksik veya antigenotoksik olabilecekleri, bazı mutajen ajanların sebep oldukları mutasyonların oranını düşürdükleri ve hatta engelledikleri oksidatif hasara karşı DNA'yı korudukları belirtilmiştir (Mimica-Dukic *et al.* 2010; Vicuna *et al.* 2010; Silva *et al.* 2011; Sinha *et al.* 2011; Slamnova *et al.* 2011; Soeur *et al.* 2011). Bunun yanı sıra bazı çalışmalarda ise uçucu yağların nükleer DNA'ya ulaşmadan hücre organelleri ve zarsı yapıları bozmak suretiyle sitotoksisiteye neden oldukları ve hücre

ölümlerine neden oldukları savunulmuştur (Bakkali *et al.* 2005). DNA'ya ulaşan sekonder metabolitlerden bazıları ise nükleik asitlerle etkileşebilmektedir. Bu etkileşim, nükleik asitlerin negatif yüklü fosfat gruplarıyla birçok alkaloidin pozitif yüklü heterosiklik azotu arasında iyonik bağ oluşumuyla meydana gelir (Bakkali *et al.* 2008b)

Öte yandan çözünür protein seviyesindeki dalgalı değişimlerin de oluşan stres durumundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Protein bantlarında yığılma dışında polimorfik bantların azlığı oluşan DNA hasarının büyük bir kısmının eksprese olmayan junk DNA bölgelerinde meydana geldiğini göstermiştir. AFLP ve RAPD sonuçlarında gözlenen ve istatistiksel olarak önemli olan değişimlerin, SDS-PAGE profillerinde benzer etki göstermemesi bu durumu kanıtlar niteliktedir. Gelişim döneminde bitkisel hormonlardan GA, IAA ve ZA gibi büyümeyi artıran hormonların artması beklenirken çalışmada uygulanan içeriklerin çoğunun bu hormonların sentezini düşürdükleri gözlenmiştir. Bunun tersine çalışmamızda büyüme inhibitörü olan ABA'nın ise seviyesinde artışlar beklenirken birkaç doz dışında sürekli azalmalar göstermesi uçucu yağların; bu hormonların sentez aşamalarını bloke ettiğini, hormon sentezi için gerekli öncül maddelerin reaksiyona girmelerini engellediği veya enzim aktivitesini etkileyerek reaksiyonların gerçekleşmesini engellediklerini göstermektedir. Artıp azalan protein ve hormon miktarlarının düzensizliği allelokimyasalların sayısal fazlalığı ve yapılarından kaynaklanmıştır. Örneğin, allelokimyasallardan fenolik asidin ABA'nın sentezini arttırdığı, *naringenin* maddesinin IAA oksidazı stimule ederek IAA seviyesinde azalmaya neden olduğu bilinmektedir (Watanabe *et al.* 1982). Bir diğer çalışmada çalışmamıza benzer şekilde sesquiterpen lakton türevlerinin antigiberellin olarak aktivite gösterdikleri belirtilmiştir (Komai *et al.* 1981). Uçucu yağlar, hormon sentezinin öncül maddelerini, sentezlerinden sorumlu enzimleri etkilemek suretiyle hormon miktarını değiştirebilirler. Örneğin oksin hormonu olan IAA triptofan aminoasidinden tüvelendiği bilinmektedir (Osborne and McManus 2005). Aa seviyesinde meydana gelen değişimler bu hormonun sentezini de etkileyecektir. Öte yandan sentetik olarak üretilen ve türevlerinin herbisit olarak kullanımı hızla artan giberallinler yapı olarak sesquiterpen olup geranildifosfat bileşiğinden metabolize olurlar. Yine ABA'da izopiren halkası taşıyan sesquiterpen grubu bileşiklerdendir.

Bilindiği gibi uçucu yağlardan terpenler (mono, di, sesquiterpenler vb.) hücresel solunum basamağında Asetil Co-A'dan meydana gelmektedirler. Benzer şekilde terpen grubu bazı hormonlar da bu aşamada meydana geleceklerdir (Osborne and McManus 2005). Hücrede bu bölgede meydana gelecek inhibisyonlar bu bileşiklerin sentezini de etkileyecektir. Uçucu yağların mitokondri ve zarlarını etkilediği bilindiğine göre bu durum solunumda oluşan yan ürünlerin (hormon gibi) oluşumunu olumsuz yönde etkileyeceği söylenebilir. Bu durumda uçucu yağların, büyüme düzenleyici hormonlar gibi davranabilecekleri gerçeğini güçlendirmektedir.

Sonuç olarak; altı farklı bitkiden elde edilen uçucu yağların, uygulandıkları mısır tohumlarının gök ve gövde gelişimini, mitotik bölünme yüzdelerini, genomik stabilitesini, çözünür protein miktarını, protein profillerini ve hormon seviyelerini önemli derecede etkiledikleri tespit edilmiştir. Çimlenme oranlarını en fazla düşüren türler sırasıyla *C. nepeta*, *M. longifolia* ve *O. rotundifolium* olarak belirlenirken diğer türler daha az etki bırakmışlardır. Mİ oranını en fazla düşüren türler *M. longifolia* ve *O. rotundifolium* iken en az etki eden türler ise *O. vulgare* ve *C. nepeta* olarak ölçülmüştür. RAPD sonuçlarına göre *C. nepeta*, *N. nuda* ve *S. hortensis* en fazla polimorfizme neden olan türlerken en az etkili olan tür ise *O. vulgare* ile *O. rotundifolium* olarak tespit edilmiştir. AFLP analizleri sonucunda genetik uzaklığı en fazla arttıran türler *C. nepeta*, *O. rotundifolium* ve *N. nuda* iken daha az etkileyen türler ise *S. hortensis* ve *M. longifolia* olmuştur. Kök ve gövde proteinlerinden birbirine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen verilere göre protein seviyelerindeki ortalama artış az olandan çok olana doğru sırasıyla *N. nuda*, *S. hortensis*, *C. nepeta*, *M. longifolia*, *O. rotundifolium* ve *O. vulgare* olmuştur. Hormon analizlerinde ise *N. nuda*'nın genellikle türler arasında en fazla hormon inhibisyonuna neden olan tür olduğu belirlenirken *M. longifolia*'nın ise değerlendirilen tüm hormon seviyelerinde en yüksek orana sahip olduğu belirlenmiştir.

Türlerden AFLP ve RAPD sonuçlarına göre en fazla etki gösterip Mİ sonuçlarında ise en az etkiye sebep olan *C. nepeta* türünün daha çok genetiksel hasarlara neden olduğu için kullanımının kontrollü bir şekilde yapılması gerekmektedir. Özellikle biyoherbisit

olarak kullanımları söz konusu olan bu türlerden *C. nepeta*'nın meydana getirebileceği hasarlardan dolayı, bu amaçla kullanımı önerilmemektedir.

Öte yandan mitotik bölünme yüzdesini oldukça azaltmasına rağmen RAPD ve AFLP markırlarında en az hasar verenler arasında bulunan *M. longifolia*'nın ise sebep olduğu DNA hasarının diğer türlere oranla daha düşük olması, kontrollü çalışmalarla birlikte çeşitli alanlarda kullanılabileceğini göstermektedir.

### 5.1. Öneriler

Bu çalışmamızda herbisit olarak kullanımları önerilen ve son yıllarda sentetik kimyasalların yerini alan doğal bitki bileşenlerinden uçucu yağların biyolojik aktiviteleri belirlenmeye çalışılmıştır. Allelopatik etkiye sahip olan, çimlenmeyi etkileyen, sitotoksik karaktere sahip bu bileşenlerin DNA dizisinde de değişimlere neden oldukları belirlenmiştir. Ancak bu değişimlerin ekspresyon ürünlerine yansımaları sentetik kimyasallara alternatif olarak kullanımlarına neden olabilir. Kolay metabolize olup uygulandıkları canlılarda belli bir süre sonra yıkılmaları ise bu bileşenlerin en büyük avantajı olarak öne çıkmaktadır. Çoğunluğunu monoterpenlerle sesquiterpenlerin oluşturdukları bu bileşenlerin güvenli kullanımı için saf olarak ekstre edilmesi ve bu bileşenlerin tek tek veya kombine bir biçimde laboratuvar ve takiben tarla denemelerinin yapılması önerilmektedir.

**KAYNAKLAR**

- Ağar, G., Aksakal, Ö., Bozarı, S., Sunar, S., Ertürk, F. A., Yıldırım, N. ve Sevsay, S., 2010a. Genetic variation within and among three populations of *Vicia canescens* L. (Fabaceae) as revealed by RAPD and FAMES analysis. *Romanian Biotechnological Letters*, 15 (4), 5384-5391.
- Ağar, G. ve Alpsoy, L., 2005. Antagonistic effect of selenium against aflatoxin G(1) toxicity induced chromosomal aberrations and metabolic activities of two crop plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46 (4), 301-305.
- Ağar, G., Güllüce, M., Aslan, A., Bozarı, S., Karadayı, M. ve Orhan, F., 2010b. Mutation preventive and antigenotoxic potential of methanol extracts of two natural lichen. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (20), 2132-2137.
- Ağar, G., Türker, M., Battal, P. ve Erez, M. E., 2006. Phytohormone levels in germinating seeds of *Zea mays* L. exposed to selenium and aflatoxines. *Ecotoxicology*, 15 (5), 443-450.
- Ağar, G., Bozarı, S., Adıguzel, A., Barış, O., Güllüce, M., Şengul, M. and Şahin, F., 2009. Phenotypic and genetic variation among *Astragalus* species from Turkey. *Romanian Biotechnological Letters*, 14 (2), 4267-4274.
- Ahmad, N., Fazal, H., Ahmad, I. and Abbasi, B. H., 2012a. Free radical scavenging (DPPH) potential in nine *Mentha* species. *Toxicol Ind Health*, 28 (1), 83-89.
- Ahmad, N., Fazal, H., Ahmad, I. and Abbasi, B. H., 2012b. Free radical scavenging (DPPH) potential in nine *Mentha* species. *Toxicology and Industrial Health*, 28 (1), 83-89.
- Albano, S. M. and Miguel, M. G., 2011. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 33 (2), 338-343.
- Alim, A., Göze, I., Çetin, A., Ataş, A. D., Çetinus, S. A. ve Vural, N., 2009. Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Nepeta nuda* L. subsp *Albiflora* (Boiss.) gams. *African Journal of Microbiology Research*, 3 (8), 463-467.
- Alizadeh-Salteh, S., Arzani, K., Omidbeigi, R. and Safaie, N., 2010. Essential Oils Inhibit Mycelial Growth of *Rhizopus stolonifer*. *European Journal of Horticultural Science*, 75 (6), 278-282.
- Alonso-Amelot, M. E., Usubillaga, A., Avila-Nunez, J. L., Oliveros-Bastidas, A. and Avendano, M., 2006. Effects of *Mintostachys mollis* essential oil and volatiles on seedlings of lettuce, tomato, cucumber and *Bidens pilosa*. *Allelopathy Journal*, 18 (2), 267-275.
- Amira, S., Dade, M., Schinella, G. and Rios, J. L., 2012. Anti-inflammatory, anti-oxidant, and apoptotic activities of four plant species used in folk medicine in the Mediterranean basin. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25 (1), 65-72.
- Amzazi, S., Ghoullami, S., Bakri, Y., Idrissi, A. I., Frih-Tetouani, S. and Benjouad, A., 2003. Human immunodeficiency virus type 1 inhibitory activity of *Mentha longifolia*. *Therapie*, 58 (6), 531-534.

- Anderson, J. A. and Coats, J. R., 2012. Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102 (2), 124-128.
- Angelini, L. G., Carpanese, G., Cioni, P. L., Morelli, I., Macchia, M. and Flamini, G., 2003. Essential oils from mediterranean Lamiaceae as weed germination inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (21), 6158-6164.
- Anonim. 2012. Metilasyon. [http://tr.wikipedia.org/wiki/Metilasyon-\(22.07.2012\)](http://tr.wikipedia.org/wiki/Metilasyon-(22.07.2012)).
- Anonim. 2012. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml-\(03.07.2012\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml-(03.07.2012)).
- Araniti, F., Sorgona, A., Lupini, A. and Abenavoli, M. R., 2012. Screening of Mediterranean wild plant species for allelopathic activity and their use as bio-herbicides. *Allelopathy Journal*, 29 (1), 107-123.
- Argyropoulos, E. I., Eleftherohorinos, I. G. and Vokou, D., 2008. In vitro evaluation of essential oils from Mediterranean aromatic plants of the Lamiaceae for weed control in tomato and cotton crops. *Allelopathy Journal*, 22 (1), 69-78.
- Armstrong, J. S., 2006. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays*, 28 (3), 253-260.
- Arora, R., 2010. Herbal drugs: a cancer chemopreventive and therapeutic perspective. Jatpee Brothers Medical Publishers (P) Ltd., New Delhi, India.
- Ayaz, A. ve Yurttagül, M., 2008. Beslenme ve Diyetetik. Ankara, Ankara, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi.
- Aydın, S. Ö., 2004. RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) Belirleyicileri ve Bitki Sistematiği. *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6 113-130.
- Azirak, S. ve Karaman, S., 2008. Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 58 (1), 88-92.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M., 2008a. Biological effects of essential oils-a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2), 446-475.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M., 2008b. Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2), 446-475.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A. and Idaomar, A., 2005. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 585 (1-2), 1-13.
- Barış, O., Güllüce, M., Şahin, F., Özer, H., Kılıç, H., Özkan, H., Sökmen, M. ve Özbek, T., 2006. Biological Activities of the Essential Oil and Methanol Extract of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Turkish Journal of Biology*, 30 65-73.
- Barış, O., Karadayı, M., Yanmış, D., Güvenalp, Z., Bal, T. and Güllüce, M., 2011. Isolation of 3 Flavonoids from *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp *longifolia* and Determination of Their Genotoxic Potentials by Using the E. coli WP2 Test System. *Journal of Food Science*, 76 (9), T212-T217.
- Basile, A., Cobianchi, R. C., Rigano, D., Senatore, F., Bruno, M., Rosselli, S., Conte, B. and Sorbo, S., 2011. Potential allelopathic activity of *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oil. *Plant Biosystems*, 145 (1), 241-247.
- Başer, K. H. C. and Buchbauer, G., 2009. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. CRC.

- Battal, P. and Tileklioğlu, B., 2001. The effects of different mineral nutrients on the levels of cytokinins in maize (*Zea mays* L.). *Turkish Journal of Botany*, 25 123-130.
- Bayel, İ., 2006 Terbinafin'in insan lenfosit kültürlerindeki etkilerinin kardeş kromatid değişimi (sister chromatid exchange) yöntemi ile in vitro araştırılması. Yüksek Lisans, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin
- Bhatti, H. N., Waseem Ul, A. and Jabbar, A., 2010. Total Phenolics and Antioxidant Activity of Horsemint (*Mentha Longifolia*). *Asian Journal of Chemistry*, 22 (6), 4629-4636.
- Birkett, M. A., Hassanali, A., Hoglund, S., Pettersson, J. and Pickett, J. A., 2011. Repellent activity of catmint, *Nepeta cataria*, and iridoid nepetalactone isomers against Afro-tropical mosquitoes, ixodid ticks and red poultry mites. *Phytochemistry*, 72 (1), 109-114.
- Boyraz, N. ve Özcan, M., 2006. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 107 (3), 238-242.
- Bozari, S., Açar, G., Aksakal, Ö., Ertürk, F. A. ve Yanmış, D., 2012. Determination of chemical composition and genotoxic effects of essential oil obtained from *Nepeta nuda* on *Zea mays* seedlings. *Toxicol Ind Health*.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- Bradford, M. M., 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- Buchbauer, G., 2009. Biological activities of essential oils. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* 235.
- Bustos, A. P., Pohlen, H. A. J. and Schulz, M., 2008. Interaction between coffee (*Coffea arabica* L.) and intercropped herbs under field conditions in the Sierra Norte of Puebla, Mexico. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics*, 109 (1), 85-93.
- Büyükleyla, M. ve Rencüzoğulları, E., 2009. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (3), 943-947.
- Çakir, A., Dadaşoğlu, F., Aydın, T., Kotan, R., Özer, H., Kordalı, S., Çakmakçı, R., Dikbaş, N. and Mete, E., 2011. Antibacterial Activities of Extracts and Essential Oils of Three *Origanum* Species against Plant Pathogenic Bacteria and Their Potential Use as Seed Disinfectants. *Journal of Plant Pathology*, 93 (2), 271-282.
- Can Başer, K., 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*, 14 (29), 3106-3119.
- Cavalieri, A. and Caporali, F., 2010. Effects of essential oils of cinnamon, lavender and peppermint on germination of Mediterranean weeds. *Allelopathy Journal*, 25 (2), 441-451.

- Cenkçi, S., Yıldız, M., Ciğerci, I. H., Bozdağ, A., Terzi, H. ve Terzi, E. S., 2010a. Evaluation of 2,4-D and Dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73 (7), 1558-1564.
- Cenkçi, S., Yıldız, M., Ciğerci, I. H., Bozdağ, A., Terzi, H. ve Terzi, E. S. A., 2010b. Evaluation of 2,4-D and Dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73 (7), 1558-1564.
- Cenkçi, S., Yıldız, M., Ciğerci, I. H., Konuk, M. ve Bozdağ, A., 2009. Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Chemosphere*, 76 (7), 900-906.
- Cerdeira, A. L., Cantrell, C. L., Dayan, F. E., Byrd, J. D. and Duke, S. O., 2012. Tabanone, a New Phytotoxic Constituent of Cogongrass (*Imperata cylindrica*). *Weed Science*, 60 (2), 212-218.
- Çetin, B., Çakmakçı, S. ve Çakmakçı, R., 2011. The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35 (2), 145-154.
- Chamberlain, J., 1995. The analysis of drugs in biological fluids. CRC.
- Chaves-Lopez, C., Martin-Sanchez, A. M., Fuentes-Zaragoza, E., Viuda-Martos, M., Fernandez-Lopez, J., Sendra, E., Sayas, E. and Alvarez, J. A. P., 2012. Role of Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oil as a Surface Fungus Inhibitor on Fermented Sausages: Evaluation of Its Effect on Microbial and Physicochemical Characteristics. *Journal of Food Protection*, 75 (1), 104-111.
- Cheikh, N. and Jones, R. J., 1994. Disruption of maize kernel growth and development by heat stress (role of cytokinin/abscisic acid balance). *Plant Physiology*, 106 (1), 45-51.
- Chengxu, W., Mingxing, Z., Xuhui, C. and Bo, Q., 2011. Review on Allelopathy of Exotic Invasive Plants. *Procedia Engineering*, 18 240-246.
- Chia, M. A., Adelanwa, M. A., Ladan, Z., Iortsuun, D. N., Adanyi, S. E. and Stephen, B. J., 2012. Interactions of *Ipomoea aquatica* and *Utricularia reflexa* with phytoplankton densities in a small water body in northern Nigeria. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 41 (2), 39-47.
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Gustafson, J. E., Warmington, J. R. and Wyllie, S. G., 2001. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. *Molecules*, 6 (2), 87-91.
- Creighton, T. E., 1999. *Encyclopedia of molecular biology*. John Wiley and Sons.
- Dadaşoğlu, F., Aydın, T., Kotan, R., Çakır, A., Özer, H., Kordali, S., Çakmakçı, R., Dikbaş, N. and Mete, E., 2011. Antibacterial Activities of Extracts and Essential Oils of Three *Origanum* Species Against Plant Pathogenic Bacteria and Their Potential Use as Seed Disinfectants. *Journal of Plant Pathology*, 93 (2), 271-282.
- Davis, P. H., 1988. *Flora of Turkey and the East Aegean Island (Supplement)*. Edinburg, Edinburg, University Press.
- de Almeida, L. F. R., Frei, F., Mancini, E., De Martino, L. and De Feo, V., 2010. Phytotoxic Activities of Mediterranean Essential Oils. *Molecules*, 15 (6), 4309-4323.
- de Azeredo, G. A., Stamford, T. L. M., de Figueiredo, R. and de Souza, E. L., 2012. The Cytotoxic Effect of Essential Oils from *Origanum vulgare* L. and/or *Rosmarinus officinalis* L. on *Aeromonas hydrophila*. *Foodborne Pathogens And Disease*, 9 (4), 298-304.



- De Martino, L., Mancini, E., de Almeida, L. F. R. and De Feo, V., 2010. The Antigerminative Activity of Twenty-Seven Monoterpenes. *Molecules*, 15 (9), 6630-6637.
- De Mastro, G., Fracchiolla, M., Verdini, L. and Montemurro, P. 2006. Proceedings of the 1st International Symposium on the Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation, Cervelli, C., Ruffoni, B., Guda, C. D., & Minuto, G. 335-345.
- Demirci, B., Temel, H. E., Portakal, T., Kirmizibekmez, H., Demirci, F. and Baser, K. H. C., 2011. Inhibitory effect of *Calamintha nepeta* subsp *glandulosa* essential oil on lipoxygenase. *Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi*, 36 (4), 290-295.
- Demirel, S. ve Zamani, A. G., 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Derg*, 12 (3), 123-127.
- Devrim, A. K. ve Necati, K., 2006. RAPD Tekniği ve Biyokimya Altimela Kullanımı. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 12 (1), 97-101.
- Dhima, K. V., Vasilakoglou, I. B., Gatsis, T. D., Panou-Philotheou, E. and Eleftherohorinos, I. G., 2009. Effects of aromatic plants incorporated as green manure on weed and maize development. *Field Crops Research*, 110 (3), 235-241.
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G. and Mauriello, G., 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (7), 2745-2749.
- Dias, J. D. G., Miguel, O. G. and Miguel, M. D., 2009. Composition of essential oil and allelopathic activity of aromatic water of *Aster lanceolatus* Willd. (Asteraceae). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45 (3), 469-474.
- Dikbaş, N., Bağcı, E., Kotan, R., Çakmakçı, R., Ozer, H., Mete, E. ve Erdoğan, G., 2010. Comparative antibacterial activities and chemical composition of some plants' oils against *Salmonella enteritidis*. *Research on Crops*, 11 (1), 118-124.
- Duarte, M. and Figueira, G., 2009. Anti-Candida activity of extracts and essential oils from native and exotic medicinal plants in Brazil. *Novel Therapeutic Agents from Plants* 123-166.
- Dudai, N., Poljakoff-Mayber, A., Mayer, A., Putievsky, E. and Lerner, H., 1999. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *Journal of Chemical Ecology*, 25 (5), 1079-1089.
- Duke, S. and Oliva, A., 2004. Mode of action of phytotoxic terpenoids. *Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals*. CRC Press, Florida.
- Duke, S., Rimando, A., Duke, M., Paul, R., Ferreira, J. and Smeda, R., 1999. Sequestration of phytotoxins by plants: implications for biosynthetic production. *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals*: Cutler, HG and SJ Cutler (Eds.), CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA 127-136.
- Dutra, R. C., Bortolini Simão da Silva, K. A., Bento, A. F., Marcon, R., Paszcuk, A. F., Meotti, F. C., Pianowski, L. F. and Calixto, J. B., 2012. Euphol, a tetracyclic triterpene produces antinociceptive effects in inflammatory and neuropathic pain: The involvement of cannabinoid system. *Neuropharmacology*.

- Economou, G., Travlos, I. S., Folinas, A. and Karamanos, A. J., 2007. Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp *hirtum*) as allelopathic plant. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 5 (1), 348-351.
- Einhellig, F., 2004. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. *Allelopathy, chemistry and mode of action of allelochemicals* 217-239.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J. C. and Pieters, R., 2002. Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 40 (2-3), 193-236.
- Emre, I., Kürşat, M., Yılmaz, O. ve Erecevit, P., 2011. Some biological compounds, radical scavenging capacities and antimicrobial activities in the seeds of *Nepeta italica* L. and *Sideritis montana* L. subsp *montana* from Turkey. *Grasas Y Aceites*, 62 (1), 68-75.
- Eom, S. H., Yang, H. S. and Weston, L. A., 2006. An evaluation of the allelopathic potential of selected perennial groundcovers: foliar volatiles of catmint (*Nepeta x faassenii*) inhibit seedling growth. *Journal of Chemical Ecology*, 32 (8), 1835-1848.
- Erez, M. E., 2009 *Lepidium draba* L., *Acroptilon repens* (L.) DC., *Thymus kotchyanus* Boiss&Hohen. var. *kotchyanus*, *Inula peacockiana* (Aitch.&Hemsl.) Koravin, *Salvia kronenburgei* Rech. f. ve *Phlomis armeniaca* Wild. Bitkilerinin Allelopatik etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Yüzüncü yıl Üniversitesi, Biology, Van
- Facchini, P. J., 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Biology*, 52 (1), 29-66.
- Ferguson, L. R. and Von Borstel, R., 1992. Induction of the cytoplasmic [] petite' mutation by chemical and physical agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 265 (1), 103-148.
- Filomena, C. A., Mariangela, M. A., Statti, G., Menichini, F., Uzunov, D. and Solimene, U., 2012. Comparative chemical composition and antioxidant activity of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp *glandulosa* (Req.) Nyman and *Calamintha grandiflora* (L.) Moench (Labiatae). *Natural Product Research*, 26 (1), 91-97.
- Flamini, G., Cioni, P. L., Puleio, R., Morelli, I. and Panizzi, L., 1999. Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. *Phytotherapy Research*, 13 (4), 349-351.
- Franz, C. and Novak, J., 2009. 3 Sources of Essential Oils. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* 39.
- Fritz, H. J., Belagaje, R., Brown, E. L., Fritz, R. H., Jones, R. A., Lees, R. G. and Khorana, H., 1978. Studies on polynucleotides. 146. High-pressure liquid chromatography in polynucleotide synthesis. *Biochemistry*, 17 (7), 1257-1267.
- Gershenzon, J. and Kreis, W., 1999. Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, sterols, cardiac glycosides and steroid saponins. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, M. Wink, ed (Boca Raton, FL: CRC Press) 222-299.
- Gibson, J. P. and Gibson, T. R., 2007. *Plant diversity*. Chelsea House Pub.

- Giweli, A., Dzamic, A. M., Sokovic, M., Ristic, M. S. and Marin, P. D., 2012. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils of *Satureja thymbra* Growing Wild in Libya. *Molecules*, 17 (5), 4836-4850.
- Gkinis, G., Bozin, B., Mimica-Dukic, N. and Tzakou, O., 2010. Antioxidant Activity of *Nepeta nuda* L. ssp. *nuda* Essential Oil Rich in Nepetalactones from Greece. *Journal of Medicinal Food*, 13 (5), 1176-1181.
- Gkinis, G., Tzakou, O., Iliopoulou, D. and Roussis, V., 2003. Chemical composition and biological activity of *Nepeta parnassica* oils and isolated nepetalactones. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, 58 (9-10), 681-686.
- Glasby, J. S., 1991. Dictionary of plants containing secondary metabolites. CRC.
- Goze, I., Alim, A., Tepe, A. S., Sokmen, M., Sevgi, K. and Tepe, B., 2009. Screening of the antioxidant activity of essential oil and various extracts of *Origanum rotundifolium* Boiss. from Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3 (4), 246-254.
- Gönen, U., 2007 *Aloe Vera* L. Jel Ekstraktlarının, *Allium Cepa* L. Kök Ucu Hücrelerinde Mitotik indeks ve Faz indeks Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans, Erciyes Üniversitesi, Biyoloji, Kayseri
- Greenway, H. and Munns, R., 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 31 (1), 149-190.
- Grosso, C., Coelho, J. A., Urieta, J. S., Palavra, A. M. F. and Barroso, J. G., 2010. Herbicidal Activity of Volatiles from Coriander, Winter Savory, Cotton Lavender, and Thyme Isolated by Hydrodistillation and Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (20), 11007-11013.
- Gül, S., Demirci, B., Başer, K. H. C., Akpulat, H. A. ve Aksu, P., 2012. Chemical Composition and In Vitro Cytotoxic, Genotoxic Effects of Essential Oil from *Urtica dioica* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88 (5), 666-671.
- Güllüce, M., Şahin, F., Sökmen, M., Özer, H., Daferera, D., Sökmen, A., Polissiou, M., Adıguzel, A. ve Özkan, H., 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*, 103 (4), 1449-1456.
- Güley, M. ve Vural, N., 1975. Toksikoloji Laboratuvar Kitabı. Ankara, 138, Ankara, Ankara Eczacılık Fakültesi Yayınları.
- Güvenalp, Z., Turan, M., Sümer, Z., Güllüce, M., Özbek, H., Barış, O., Orhan, F. and Demirezer, L., 2010. Study on antitumoral activity of some chemical compounds isolated from *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*. *Planta Medica*, 76 (12), 1260-1260.
- Hajlaoui, H., Trabelsi, N., Noumi, E., Snoussi, M., Fallah, H., Ksouri, R. and Bakhrouf, A., 2009. Biological activities of the essential oils and methanol extract of two cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 25 (12), 2227-2238.
- Hanson, J. R., 2003. Natural products: the secondary metabolites. Royal Society of Chemistry.
- Hartmann, T., 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68 (22-24), 2831-2846.

- He, H. B., Wang, H. B., Fang, C. X., Lin, Y. Y., Zeng, C. M., Wu, L. Z., Guo, W. C. and Lin, W. X., 2009. Herbicidal effect of a combination of oxygenic terpenoids on *Echinochloa crus-galli*. *Weed Research*, 49 (2), 183-192.
- Hernandez-Miñana, F., 1991. Identification of cytokinins and the changes in their endogenous levels in developing *Citrus sinensis* leaves. *J. Hortic. Sci.*, 66 505-511.
- Huang, S. H., Wu, H. Y. and Jong, A. Y., 2002. Gene Cloning and Expression Profiling by Rapid Amplification of Gene Inserts with Universal Vector Primers. *Methods in Molecular Biology*, 192 309-314.
- Hunter, T. and Pines, J., 1991. Cyclins and cancer. *Cell*, 66 (6), 1071-1074.
- Hussain, A. I., 2009a Characterization and Biological Activities of Essential Oils of Some Species of Lamiaceae. UNIVERSITY OF AGRICULTURE,
- Hussain, A. I., 2009b Characterization and Biological Activities of Essential Oils of Some Species of Lamiaceae. PhD, University of Agriculture, Department of Chemistry, Pakistan
- Hussain, J., Jamila, N., Gilani, S. A., Abbas, G. and Ahmed, S., 2009. Platelet aggregation, antiglycation, cytotoxic, phytotoxic and antimicrobial activities of extracts of *Nepeta juncea*. *African Journal of Biotechnology*, 8 (6), 935-940.
- Inderjit and Weiner, J., 2001. Plant allelochemical interference or soil chemical ecology? *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics*, 4 (1), 3-12.
- İpek, E., Tüylü, B. A. ve Zeytinoğlu, H., 2003. Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology*, 43 (1), 145-148.
- Jaganathan, S. K. and Supriyanto, E., 2012. Antiproliferative and Molecular Mechanism of Eugenol-Induced Apoptosis in Cancer Cells. *Molecules*, 17 (6), 6290-6304.
- Jain, S. M. and Saxena, P. K., 2009. Protocols for in vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants. *Sci Pharm*, 77 914.
- Jun, N. J., Mosaddik, A., Moon, J. Y., Jang, K. C., Lee, D. S., Ahn, K. S. and Cho, S. K., 2011. Cytotoxic Activity of beta-Caryophyllene Oxide Isolated from Jeju Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) Leaf. *Records of Natural Products*, 5 (3), 242-246.
- Kadioğlu, A., 1999. Bitki Fizyolojisi. Trabzon, 377, Trabzon, Eser Ofset.
- Kanchanaketu, T., Sangduen, N., Toojinda, T. and Hongtrakul, V., 2012. Genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) based on methylation-sensitive amplification polymorphism. *Genetics And Molecular Research*, 11 (2), 944-955.
- Karlovsky, P., 2008. Secondary metabolites in soil ecology. *Secondary Metabolites in Soil Ecology* 1-19.
- Khan, R. A., Khan, F., Ahmed, M., Shah, A. S., Khan, N. A., Khan, M. R. and Shah, M. S., 2011. Phytotoxic and antibacterial assays of crude methanolic extract of *Mentha longifolia* (Linn.). *African Journal Of Pharmacy And Pharmacology*, 5 (12), 1530-1533.
- Khani, A. and Asghari, J., 2012. Insecticide activity of essential oils of *Mentha longifolia*, *Pulicaria gnaphalodes* and *Achillea wilhelmsii* against two stored product pests, the flour beetle, *Tribolium castaneum*, and the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Science*, 12.
- Khosravi, A. R., Shokri, H., Kermani, S., Dakhili, M., Madani, M. and Parsa, S., 2011. Antifungal properties of *Artemisia sieberi* and *Origanum vulgare* essential oils

- against *Candida glabrata* isolates obtained from patients with vulvovaginal candidiasis. *Journal De Mycologie Medicale*, 21 (2), 93-99.
- Kılıç, A., 2005 Bitkisel Kaynaklı Bazı Uçucu Yağ Ve Monoterpenlerin Olası Genotoksik Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans, Anadolu Üniversitesi, Biyoloji, Fen Bilimleri Enstitüsü
- Kim, S. I., Yoon, J. S., Jung, J. W., Hong, K. B., Ahn, Y. J. and Kwon, H. W., 2010. Toxicity and repellency of *origanum* essential oil and its components against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) adults. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13 (4), 369-373.
- Kitic, D., Stojanovic, G., Palic, R. and Randjelovic, V., 2005. Chemical composition and microbial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp *nepeta* var. *subisodonda* (Borb.) Hayek from Serbia. *Journal of Essential Oil Research*, 17 (6), 701-703.
- Kızıl, S., 2009. Essential oil composition of different originated summer savory (*Satureja hortensis* L.). *Research on Crops*, 10 (1), 65-67.
- Kobaisy, M., Tellez, M. R., Dayan, F. E., Mamonov, L. K., Mukanova, G. S., Sitpaeva, G. T. and Gemejjeva, N. G., 2005. Composition and phytotoxic activity of *Nepeta pannonica* L. essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 17 (6), 704-707.
- Kobayashi, K., Itaya, D., Mahatamnuchoke, P. and Pornprom, T., 2008. Allelopathic potential of itchgrass (*Rottboellia exaltata* L. f.) powder incorporated into soil. *Weed Biology and Management*, 8 (1), 64-68.
- Kocaçalışkan, İ. 132 (Bizim Büro Basımevi, Kütahya, 2006).
- Kocaçalışkan, İ., 2010. Bitki Fizyolojisi. Bizim Büro Basımevi ANKARA, 8.
- Kokdil, G., Yalcin, S. M. and Topcu, G., 1999. Nepetalactones and other constituents of *Nepeta nuda* ssp. *albiflora*. *Turkish Journal of Chemistry*, 23 (1), 99-104.
- Komai, K., Sugiwaka, Y. and Sato, S., 1981. Plant growth retardant of extracts obtained from water nutgrass (*Cyperus serotinus* Rottb.). *Mem. Fac. Agric. Kinki Univ*, 14 57-65.
- Kordalı, S., Aslan, I., Calmasur, O. ve Çakır, A., 2006. Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera : Curculionidae). *Industrial Crops and Products*, 23 (2), 162-170.
- Kotan, R., Dikbaş, N., Tozlu, E. ve Bağcı, E., 2012. CHANGES OF MEMBRANE FATTY ACIDS OF *Salmonella enteritidis* TREATED WITH THE ESSENTIAL OIL OF *Satureja hortensis*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 21 (5), 1073-1077.
- Kumar, P., Mishra, S., Malik, A. and Satya, S., 2012. Efficacy of *Mentha x piperita* and *Mentha citrata* essential oils against housefly, *Musca domestica* L. *Industrial Crops and Products*, 39 106-112.
- Kuraishi, S., Tasaki, K., Sakurai, N. and Sadatoku, K., 1991. Changes in levels of cytokinins in etiolated squash seedlings after illumination. *Plant and cell physiology*, 32 (5), 585-591.
- Kuraś, M., Nowakowska, J., Śliwińska, E., Pilarski, R., Ilasz, R., Tykarska, T., Zobel, A. and Gulewicz, K., 2006. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water

- extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. Journal of ethnopharmacology, 107 (2), 211-221.
- Kursat, M., Emre, I., Yilmaz, O. and Erecevit, P., 2011. Antioxidant and antimicrobial activity in the seeds of *Origanum vulgare* L. subsp *gracile* (C. Koch) letsvaart and *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) letsvaart from Turkey. *Grasas Y Aceites*, 62 (4), 410-417.
- Kwon, H. W., Kim, S. I., Yoon, J. S., Jung, J. W., Hong, K. B. and Ahn, Y. J., 2010. Toxicity and repellency of *origanum* essential oil and its components against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) adults. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13 (4), 369-373.
- Labra, M., Grassi, F., Imazio, S., Di Fabio, T., Citterio, S., Sgorbati, S. and Agradi, E., 2004. Genetic and DNA-methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L. *Chemosphere*, 54 (8), 1049-1058.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 227 (5259), 680-&.
- Lambert, R., Skandamis, P. N., Coote, P. J. and Nychas, G. J. E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91 (3), 453-462.
- Lenoir, C., Corbineau, F. and Côme, D., 1983. Rôle des glumelles dans la dormance des semences d'orge. *Physiologie végétale*, 21 (4), 633-643.
- Lindahl, T. and Wood, R. D., 1999. Quality control by DNA repair. *Science*, 286 (5446), 1897-1905.
- Liu, W., Li, P. J., Qi, X. M., Zhou, Q., Zheng, L., Sun, T. H. and Yang, Y. S., 2005. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere*, 61 (2), 158-167.
- Liu, W., Li, P. J., Qi, X. M., Zhou, Q. X., Zheng, L., Sun, T. H. and Yang, Y. S., 2005. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere*, 61 (2), 158-167.
- Macháčková, I., Krekule, J., Eder, J., Seidlova, F. and Strnad, M., 1993. Cytokinins in photoperiodic induction of flowering in *Chenopodium* species. *Physiologia Plantarum*, 87 (2), 160-166.
- Macias, F. A., Molinillo, J. M., Varela, R. M. and Galindo, J. C., 2007. Allelopathy--a natural alternative for weed control. *Pest Management Science*, 63 (4), 327-348.
- Macias, F. A., Molinillo, J. M. G., Galindo, J. C. G., Varela, R. M., Torres, A. and Simonet, A. M., 1999. Terpenoids with potential use as natural herbicide templates. *Biologically active natural products: agrochemicals*, 1 15-31.
- Maedeh, M., Hamzeh, I., Hossein, D., Majid, A. and Reza, R. K., 2011. Bioactivity of essential oil from *Satureja hortensis* (Lamiaceae) against three stored-product insect species. *African Journal of Biotechnology*, 10 (34), 6620-6627.
- Mancini, E., Arnold, N. A., De Feo, V., Formisano, C., Rigano, D., Piozzi, F. and Senatore, F., 2009. Phytotoxic effects of essential oils of *Nepeta curviflora* Boiss. and *Nepeta nuda* L. subsp *albiflora* growing wild in Lebanon. *Journal of Plant Interactions*, 4 (4), 253-259.
- Mao, J. A., Yang, L. Z., Shi, Y. M., Hu, J. A., Piao, Z., Mei, L. J. and Yin, S. X., 2006. Crude extract of *Astragalus mongholicus* root inhibits crop seed germination and soil nitrifying activity. *Soil Biology & Biochemistry*, 38 (2), 201-208.

- Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Goncalves, M. J., Cavaleiro, C. and Salgueiro, L., 2010. Chemical composition and biological assays of essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp *nepeta* (Lamiaceae). *Natural Product Research*, 24 (18), 1734-1742.
- Mastelic, J., Milos, M., Kustrak, D. and Radonic, A., 1998. The essential oil and glycosidically bound volatile compounds of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. *Croatica Chemica Acta*, 71 (1), 147-154.
- Mendes, J. M., Guerra, F. Q. S., Pereira, F. D., de Sousa, J. P., Trajano, V. N. and Lima, E. D., 2012. Antifungal activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* on *Candida tropicalis* strains from clinical isolates. *Boletim Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromaticas*, 11 (3), 208-217.
- Menkissoglu-Spiroudi, U., Ntalli, N. G., Ferrari, F. and Giannakou, I., 2010. Phytochemistry and Nematicidal Activity of the Essential Oils from 8 Greek Lamiaceae Aromatic Plants and 13 Terpene Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (13), 7856-7863.
- Miguel, G., Galego, L., Almeida, V., Goncalves, V., Costa, M., Monteiro, I. and Matos, F., 2008. Antioxidant activity of the essential oils of *Thymbra capitata*, *Origanum vulgare*, *Thymus mastichina*, and *Calamintha baetica*. *Proceedings of the International Symposium on Plants as Food and Medicine: The Utilization and Development of Horticultural Plants for Human Health* (765), 325-333.
- Mihajilov-Krstev, T., Radnovic, D., Kitic, D., Zlatkovic, B., Ristic, M. and Brankovic, S., 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil. *Central European Journal of Biology*, 4 (3), 411-416.
- Miladinovic, D. L., Ilic, B. S., Mihajilov-Krstev, T. M., Nikolic, N. D., Miladinovic, L. C. and Cvetkovic, O. G., 2012. Investigation of the chemical composition-antibacterial activity relationship of essential oils by chemometric methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403 (4), 1007-1018.
- Millioğlu, Ö., 2010. Elektrolize suyun *Vicia faba* L. genotoksik etkisinin Kontrolü. Yüksek lisans tezi, Gebze Yüksek Teknolojisi, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir
- Milos, M. and Makota, D., 2012. Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and p-cymene in a model system using the Briggs-Rauscher oscillating reaction. *Food Chemistry*, 131 (1), 296-299.
- Mimica-Dukic, N., Bugarin, D., Grbovic, S., Mitic-Culafic, D., Vukovic-Gacic, B., Orcic, D., Jovin, E. and Couladis, M., 2010. Essential Oil of *Myrtus communis* L. as a Potential Antioxidant and Antimutagenic Agents. *Molecules*, 15 (4), 2759-2770.
- Mkaddem, M., Bouajila, J., Ennajar, M., Lebrihi, A., Mathieu, F. and Romdhane, M., 2009. Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Mentha* (*longifolia* L. and *viridis*) Essential Oils. *Journal of Food Science*, 74 (7), M358-M363.
- Molisch, H. and Magyar Királyi Erzsébet Tudomány, B., 1937. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopathie. Fischer.
- Monforte, M. T., Lanuzza, F., Pergolizzi, S., Mondello, F., Tzakou, O. and Galati, E. M., 2012. Protective Effect of *Calamintha officinalis* Moench Leaves against

- Alcohol-induced Gastric Mucosa Injury in Rats. Macroscopic, Histologic and Phytochemical Analysis. *Phytotherapy Research*, 26 (6), 839-844.
- Monforte, M. T., Tzakou, O., Nostro, A., Zimbalatti, V. and Galati, E. M., 2011. Chemical Composition and Biological Activities of *Calamintha officinalis* Moench Essential Oil. *Journal of Medicinal Food*, 14 (3), 297-303.
- Montes-Belmont, R. and Carvajal, M., 1998. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *Journal of Food Protection*, 61 (5), 616-619.
- Monzote, L., Stamberg, W., Staniek, K. and Gille, L., 2009. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240 (3), 337-347.
- Mooney, P. and Van Staden, J., 1984. Seasonal changes in the levels of endogenous cytokinins in *Sargassum heterophyllum* (Phaeophyceae). *Botanica marina*, 27 (9), 437-442.
- Morris, J. W., Dumas, P., Morris, R. O. and Zaerr, J. B., 1990. Cytokinins in vegetative and reproductive buds of *Pseudotsuga menziesii*. *Plant Physiology*, 93 (1), 67.
- Motazedian, N., Ravan, S. and Bandani, A. R., 2012. Toxicity and Repellency Effects of Three Essential Oils against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14 (2), 275-284.
- Mueller, U. G. and Wolfenbarger, L. L. R., 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology & Evolution*, 14 (10), 389-394.
- Mutlu, S. ve Atıcı, O., 2009. Allelopathic effect of *Nepeta meyeri* Benth. extracts on seed germination and seedling growth of some crop plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31 (1), 89-93.
- Mutlu, S., Atıcı, O. ve Esim, N., 2010. Bioherbicidal effects of essential oils of *Nepeta meyeri* Benth. on weed spp. *Allelopathy Journal*, 26 (2), 291-299.
- Nikolic, B., Mitic-Culafic, D., Vukovic-Gacic, B. and Knezevic-Vukcevic, J., 2011. Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in *Escherichia coli* and mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49 (9), 2035-2045.
- Nostro, A., Angela Cannatelli, M., Crisafi, G. and Alonzo, V., 2001. The effect of *Nepeta cataria* extract on adherence and enzyme production of *Staphylococcus aureus*. *International Journal Of Antimicrobial Agents*, 18 (6), 583-585.
- Novgorodov, S. A. and Gudz, T. I., 1996. Permeability transition pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 28 (2), 139-146.
- Ntalli, N. G., Ferrari, F., Giannakou, I. and Menkissoglu-Spiroudi, U., 2010. Phytochemistry and nematicidal activity of the essential oils from 8 Greek Lamiaceae aromatic plants and 13 terpene components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (13), 7856-7863.
- Numpaque, M. A., Oviedo, L. A., Gil, J. H., Garcia, C. M. and Durango, D. L., 2011. Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. *Tropical Plant Pathology*, 36 (1), 3-13.



- Odeyemi, O. O., Masika, P. and Afolayan, A. J., 2008. Insecticidal activities of essential oil from the leaves of *Mentha longifolia* L. subsp *capensis* against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae). *African Entomology*, 16 (2), 220-225.
- Orhan, F., 2010 *Mentha Longifolia* L. Hudson Ssp. Longıfolı'dan Elde Edilen Bazı Etken Maddelerin Ames/Salmonella Ve Maya Delesyon Test Sistemleri İle Mutajen Ve Antimutajen Özelliklerinin Belirlenmesi.Yüksek Lisans, Atatürk Üniversitesi Biyoloji, Erzurum
- Orhan, I. E., Özcelik, B., Kartal, M.ve Kan, Y., 2012. Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. *Turkish Journal of Biology*, 36 (3), 239-246.
- Osborne, D. J. andMcManus, M. T., 2005. Hormones, signals and target cells in plant development. Cambridge Univ Pr.
- Öztürk, M., 2012. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. *Food Chemistry*, 134 (1), 48-54.
- Öncel, I. ve Keleş, Y., 2002. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinde büyüme, pigment içeriği ve çözünür madde kompozisyonunda değişimler. *Fen Bilimleri Dergisi*, 23 (2).
- Özdemir, Ş., 2007 Brassicaceae Familyasından Bazi Bitkilere Ait Ekstraktların Yabancı Otlarla Mücadelede Biyo-Herbisit Olarak Kullanılabilme Olanaklarının Arastirilmesi.Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal üniversitesi, Biyoloji, Antakya
- Pamidimarri, D., Singh, S., Mastan, S. G., Patel, J. and Reddy, M. P., 2009. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. *Molecular Biology Reports*, 36 (6), 1357-1364.
- Pirbalouti, A. G., Rahimmalek, M., Malekpoor, F. and Karimi, A., 2011. Variation in antibacterial activity, thymol and carvacrol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subsp *daenensis* Celak. *Plant Omics*, 4 (4), 209-214.
- Qasem, J. R., 2002. Plants as sources of natural herbicides against branched broomrape (*Orobancha ramosa* L.). 153-182,
- Qi, B., Zhong, X., Zhu, B., Zhao, N., Xu, L., Zhang, H., Yu, X. and Liu, B., 2010. Generality and characteristics of genetic and epigenetic changes in newly synthesized allotetraploid wheat lines. *Journal of Genetics and Genomics*, 37 (11), 737-748.
- Qiu, X. A., Yu, S. X., Wang, Y. F., Fang, B. Z., Cai, C. X. and Liu, S. P., 2010. Identification and allelopathic effects of 1,8-cineole from *Eucalyptus urophylla* on lettuce. *Allelopathy Journal*, 26 (2), 255-264.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Yoshinari, T., Rezaee, M. B., Jaimand, K., Nagasawa, H. and Sakuda, S., 2008. Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *International journal of food microbiology*, 123 (3), 228-233.
- Rice, E. L., 1985. Allelopathy - an Overview. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 189 (Apr-), 134-CHED.

- Roldan, L. P., Diaz, G. J. and Durringer, J. M., 2010. Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the Lamiaceae family against pathogenic and beneficial bacteria. *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias*, 23 (4), 451-461.
- Sampietro, D. A., Catalan, C. A. N. and Vattuone, M. A., 2009. Isolation, identification and characterization of allelochemicals/natural products. Science Pub Inc.
- Santos, J. B., Nienhuis, J., Skroch, P., Tivang, J. and Slocum, M., 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 87 (8), 909-915.
- Sardas, S., Karakaya, A. E. and Furtun, Y., 1994. Sister chromatid exchanges in workers employed in car-painting workshops. *International archives of occupational and environmental health*, 66 (1), 33-35.
- Schempp, H., Hippeli, S., Elstner, E. F. and Hock, B., 2005. Plant stress: avoidance, adaptation, defense. *Plant Toxicology*. 4th ed. New York: Marcel Dekker 87-129.
- Schmidt-Silva, V., Pawlowski, A., dos Santos, E. K., Zini, C. A. and Soares, G. L. G., 2011. Cytotoxicity of essential oils from two species of *Heterothalamus* (Asteraceae). *Australian Journal of Botany*, 59 (7), 681-690.
- Seigler, D. S., 1996. Chemistry and mechanisms of allelopathic interactions. *Agronomy Journal*, 88 (6), 876-885.
- Shafaghat, A., 2011. Antioxidant, antimicrobial activities and fatty acid components of leaf and seed of *Bupleurum lancifolium* Hornem. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (16), 3758-3762.
- Shah, A. J., Bhulani, N. N., Khan, S. H., Rehman, N. U. and Gilani, A. H., 2010. Calcium Channel Blocking Activity of *Mentha longifolia* L. Explains its Medicinal Use in Diarrhoea and Gut Spasm. *Phytotherapy Research*, 24 (9), 1392-1397.
- Shahverdi, A. R., Rafii, F., Tavassoli, F., Bagheri, M., Attar, F. and Ghahraman, A., 2004. Piperitone from *Mentha longifolia* var. *chorodictya* Rech F. reduces the nitrofurantoin resistance of strains of Enterobacteriaceae. *Phytotherapy Research*, 18 (11), 911-914.
- Shultz, R. W., Settlege, S. B., Hanley-Bowdoin, L. and Thompson, W. F., 2005. A trichloroacetic acid-acetone method greatly reduces infrared autofluorescence of protein extracts from plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23 (4), 405-409.
- Silva, F., Ferreira, S., Duarte, A., Mendonca, D. I. and Domingues, F. C., 2011. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, 19 (1), 42-47.
- Singh, P. P., Jha, S. and Irchhaiya, R., 2012. Antidiabetic and antioxidant activity of hydroxycinnamic acids from *Calamintha Officinalis* Moench. *Medicinal Chemistry Research*, 21 (8), 1717-1721.
- Sinha, S., Biswas, D. and Mukherjee, A., 2011. Antigenotoxic and antioxidant activities of palmarosa and citronella essential oils. *Journal of ethnopharmacology*, 137 (3), 1521-1527.

- Slamenova, D., Horvathova, E., Kovacikova, Z., Kozics, K. and Hunakova, L., 2011. Essential rosemary oil protects testicular cells against DNA-damaging effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and DMNQ. *Food Chemistry*, 129 (1), 64-70.
- Slamenova, D., Horvathova, E., Sramkova, M. and Marsalkova, L., 2007. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol. and thymol on mammalian cells cultured in vitro. *Neoplasma*, 54 (2), 108-112.
- Soberón, J. R., Sgariglia, M. A., Sampietro, D. A., Quiroga, E. N. and Vattuone, M. A., 2010. Free radical scavenging activities and inhibition of inflammatory enzymes of phenolics isolated from *Tripodanthus acutifolius*. *Journal of ethnopharmacology*, 130 (2), 329-333.
- Soeur, J., Marrot, L., Perez, P., Iraqui, I., Kienda, G., Dardalhon, M., Meunier, J. R., Averbeck, D. and Huang, M. E., 2011. Selective cytotoxicity of *Aniba rosaeodora* essential oil towards epidermoid cancer cells through induction of apoptosis. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 718 (1-2), 24-32.
- Sousa, P., Magalhães, P., Lima, C., Oliveira, V. and Leal-Cardoso, J., 1997. Effects of piperitenone oxide on the intestinal smooth muscle of the guinea pig. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30 787-791.
- Spiassi, A., Fortes, A. M. T., Pereira, D. C., Senem, J. and Tomazoni, D., 2011. Allelopathy of winter cover straws on the initial maize growth. *Semina-Ciencias Agrarias*, 32 (2), 577-581.
- Stansfield, W. D., Colomé, J. S. and Cano, R. J., 1996. *Schaum's outline of theory and problems of molecular and cell biology*. McGraw-Hill.
- Şekeroğlu, V. ve Atlı Şekeroğlu, Z., 2011. Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ* 241.
- Tamarin, R. H., 1999. *Principles of genetics*. WCB/McGraw-Hill.
- Taylor, J. S., Thompson, B., Pate, J. S., Atkins, C. A. and Pharis, R. P., 1990. Cytokinins in the phloem sap of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Physiology*, 94 (4), 1714.
- Thomas, S. G., Rieu, I. and Steber, C. M., 2005. Gibberellin metabolism and signaling. *Vitamins & Hormones*, 72 289-338.
- Tollefsbol, T. O., 2004. *Epigenetics protocols*. Humana Pr Inc.
- Tomaszewski, M. and Thimann, K. V., 1966. Interactions of phenolic acids, metallic ions and chelating agents on auxin-induced growth. *Plant Physiology*, 41 (9), 1443.
- Topaktaş, M. ve Rencüzoğulları, E., 2010. *Sitogenetik*. Ankara, 176, Ankara, Nobel Yayın Dağıtım.
- Tripathi, A. K., Prajapati, V., Ahmad, A., Aggarwal, K. K. and Khanuja, S. P. S., 2004. Piperitenone oxide as toxic, repellent, and reproduction retardant toward malarial vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Anophelinae). *Journal Of Medical Entomology*, 41 (4), 691-698.
- Türker, M., Battal, P., Açar, G., Güllüce, M., Şahin, F., Erez, M. E. ve Yıldırım, N., 2008. Allelopathic effects of plants extracts on physiological and cytological processes during maize seed germination. *Allelopathy Journal*, 21 (2), 273-286.
- Türker, M., Battal, P., Açar, G., Güllüce, M., Şahin, F., Erez, M. E. and Yıldırım, N., 2008. Allelopathic effects of plants extracts on physiological and cytological processes during maize seed germination. *Allelopathy Journal*, 21 (2), 273-286.

- Ultee, A., Kets, E. and Smid, E., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (10), 4606-4610.
- Uncuoğlu, A. A., 2001 Arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve buğday (*Triticum aestivum* L.)'da kuraklığa dirençli bitkilerin biyoteknolojik yöntemlerle tanımlanması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Biyoloji, İstanbul
- Uremis, I., Arslan, M. and Sangun, M. K., 2009. Herbicidal Activity of Essential Oils on the Germination of Some Problem Weeds. *Asian Journal of Chemistry*, 21 (4), 3199-3210.
- Verdeguer, M., Blazquez, M. A. and Boira, H., 2009. Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriocephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37 (4), 362-369.
- Vicuna, G. C., Stashenko, E. E. and Fuentes, J. L., 2010. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*, 81 (5), 343-349.
- Vokou, D., Chalkos, D. and Karamanoli, K., 2006. Microorganisms and allelopathy: A one-sided approach. *Allelopathy* 341-371.
- Vokou, D., Douvli, P., Blionis, G. J. and Halley, J. M., 2003. Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. *Journal of Chemical Ecology*, 29 (10), 2281-2301.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van De Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J. and Kuiper, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23 (21), 4407-4414.
- Vroh-Bi, I., Anagbogu, C., Nnadi, S. and Tenkouano, A., 2010. Genomic characterization of natural and somaclonal variations in bananas (*Musa* spp.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 29 (2), 440-448.
- Vural, N., 1996. Toksikoloji. Ankara, 342-373, Ankara, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları.
- Vural, N., 2000. Toksikoloji Laboratuvar Kitabı. Ankara, 220, Ankara, Eczacılık Fakültesi Yayınları.
- Vural, N., 2005. Toksikoloji. Ankara, 671, Ankara, Ankara Üniversitesi Basımevi.
- Wasti, S., Mimouni, H., Smiti, S., Zid, E. and Ben Ahmed, H., 2012. Enhanced Salt Tolerance of Tomatoes by Exogenous Salicylic Acid Applied Through Rooting Medium. *Omic-a Journal of Integrative Biology*, 16 (4), 200-207.
- Watanabe, K., Ohno, N., Yoshioka, H., Gershenzon, J. and Mabry, T. J., 1982. Sesquiterpene lactones and diterpenoids from *Helianthus argophyllus*. *Phytochemistry*, 21 (3), 709-713.
- Wink, M., 1983. Inhibition of Seed-Germination by Quinolizidine Alkaloids - Aspects of Allelopathy in *Lupinus albus* L. *Planta*, 158 (4), 365-368.
- Wink, M., 2010. Functions and biotechnology of plant secondary metabolites. Blackwell Pub.
- Wink, M. and Latzbruning, B., 1995. Allelopathic Properties of Alkaloids and Other Natural-Products - Possible Modes of Action. *Allelopathy*, 582 117-126.
- Yanmış, D., 2008 *Anoxybacillus gonensis* G2T Ksiloz İzomeraz Geninin Klonlanması, Gen ürününün saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Biyoloji, Fen Bilimleri Enstitüsü

- Yaşar, S., Fakir, H., Erbaş, S. ve Karakuş, B., 2011. Volatile Constituents of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp *glandulosa* (Req.) PW Ball. and *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp *nepeta* from Mediterranean Region in Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 23 (8), 3765-3766.
- Yaşar, G. B., 2009. Domateste Demir Klorozuna Toleransın Haritalanmasında Kullanılacak Rekombinant Saf Hatlarda DNA İzolasyonu ve Aflp Optimizasyonu. Yüksek Lisans, YüzüncüYıl Üniversitesi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Van
- Yazıcı, M., Duman, G., Aslan, I., Durucan, A. ve Şahin, F., 2011. The antifungal activity of liposomal ointment formulation of essential oil of *Satureja hortensis*. *Current Opinion In Biotechnology*, 22 S108-S108.
- Yıldırım, E., Kordalı, S. ve Yazıcı, G., 2011. Insecticidal effects of essential oils of eleven plant species from Lamiaceae on *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Romanian Biotechnological Letters*, 16 (6), 6702-6709.
- Yıldız, B. ve Aktoklu, E., 2010. Bitki Sistematığı. Ankara, 395, Ankara, Palme yayınevi.
- Zamaraeva, M. V., Hagelgans, A. I., Lubnina, L. V., Abramov, A. Y., Ahmedhodjaeva, H. S., Saidhodjaev, A. I., Glazyrina, N. G. and Salakhutdinov, B. A., 1999. Hormonal activity and membrane action of plants terpenoids. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 4 (2), 189-201.
- Zunino, M. P. and Zygodlo, J. A., 2004. Effect of monoterpenes on lipid oxidation in maize. *Planta*, 219 (2), 303-309.

## ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Bingöl Genç ilçesinde doğdu. İlk ve Orta öğrenimini Bingöl’de tamamladı. 2001 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü’nden Yüksek Lisans derecesi alarak mezun oldu. 2006 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Doktora eğitimine başladı. Evli ve bir çocuk babasıdır.