

***AJUGA POSTII* Briq.ve *AJUGA RELICTA*
P.H.Davis (Lamiaceae) TÜRLERİ ÜZERİNE
FARMASÖTİK BOTANİK YÖNÜNDEN
ARAŞTIRMALAR**

Emel Sönmez

Yüksek Lisans Tezi

***AJUGA POSTII* Briq.ve
AJUGA RELICTA P.H.Davis
(Lamiaceae)
TÜRLERİ ÜZERİNE
FARMASÖTİK BOTANİK
YÖNÜNDEN ARAŞTIRMALAR**

Emel Sönmez

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Botanik Anabilim Dalı
Eskişehir, Mayıs 2016

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Yavuz Bülent Köse

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No. 1501S009).

TEŞEKKÜR

Yapmış olduğum tez çalışmasında emeği geçen başta danıőman hocam Sayın Doç. Dr. Yavuz Bülent KÖSE olmak üzere,

Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Baőkanı Sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e,

Farmakognozi Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarını kullanmama izin veren Farmakognozi Anabilim Dalı Baőkanı Sayın Prof. Dr. Neőe KIRIMER'e, uçucu yağ analizlerinde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Betül DEMİRCİ'ye, diğer tüm kimyasal analizlerde yardımcı olan Sayın Uzman Dr. Fatih GÖĞER'e ve Sayın Süleyman YUR'a, moleküler çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen Sayın Ece ALBAYRAK'a,

Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na

ve deđerli aileme teőekkürü bir borç bilirim.

Emel SÖNMEZ, 2016

**AJUGA POSTII Briq.ve AJUGA RELICTA P.H.Davis (Lamiaceae)
TÜRLERİ ÜZERİNE FARMASÖTİK BOTANİK YÖNÜNDEN
ARAŞTIRMALAR**

ÖZET

Relikt endemik türler olan *A. postii* Briq. ve *A. relictata* P. H. Davis'nın morfolojik ve anatomik özellikleri belirlenmiş olup moleküler akrabalık ilişkileri Ribosomal DNA ITS bölgelerinin dizi analizleriyle ortaya konulmuştur. Toplam fenol, flavanoid ve flavanol madde miktar tayinleri ile fenolik bileşiklerin tanımlanması, uçucu yağ analizleri ve antioksidan aktivite araştırmaları yapılmıştır. Bu amaçla çalışılan taksonlar çiçeklenme zamanlarında toplanmış, herbaryum örnekleri ile anatomik çalışmalar için %70'lik alkol içeren materyaller hazırlanmıştır. Bitki örneklerinin kök, gövde ve yaprak kısımlarından alınan enine kesitler mikroskopta Sartur reaktifi ile incelenmiş, tespit edilen anatomik özellikler orijinal fotoğraflarla açıklanmıştır. Miktar tayini ve antioksidan aktivite çalışmaları için bitkilerden hekzan, etil asetat, metanol, %70 metanol ve uçucu yağ balon altı sularından ekstratlar hazırlanmıştır. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiş olup en yüksek toplam fenolik madde miktarı *A. relictata* uçucu yağ balon altı suyunda tespit edilmiştir. Kimyasal bileşik analizleri ise LC/MS ile gerçekleştirilmiştir. Çalışılan ekstratların antioksidan aktivite potansiyelleri β -karoten-linoleik asit sisteminde, serbest radikal süpürücü etkileri DPPH• ve ABTS•+ metodları ile belirlenmiştir. Yapılan antioksidan aktivite çalışmalarına göre her üç deneyde de en yüksek değerler *A. relictata*'nın %70 metanol içeren ekstratından elde edilmiştir. Uçucu yağların kimyasal içerik belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda safa yakın bilinmeyen maddeler tespit edilmiştir. Bunların yanında çalışılan türlerin güncel populasyon durumları IUCN kategorileri ile açıklanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Ajuga*, morfoloji-anatomi, ITS, toplam fenol-flavanol-flavanoid madde miktarları, antioksidan aktivite, uçucu yağ

**PHARMACEUTICAL BOTANY STUDIES on *AJUGA POSTII* Briq. and
AJUGA RELICTA P.H.Davis (Lamiaceae)**

ABSTRACT

Ajuga postii and *Ajuga relictata*, which are relict endemic species, have been studied for morphological and anatomical characteristics, molecular-phylogenetic relationships with ribosomal DNA's ITS regions, total quantifications of phenols, flavonoids and flavanols, identification of the phenolic compounds, antioxidant activities and essential oils. For this purpose, taxa were picked on flowering time, were prepared materials for herbarium and anatomical studies. Cross-sections of roots, stems and leaves were prepared with Sartur reagent. Hexane, ethyl acetate, methanol, 70% methanol and deodorized water extracts of species were used for quantitations and antioxidant activities. Total phenolic content of the extracts was determined with Folin-Ciocalteu method and the highest total phenolic content was on deodorized water of *A. relictata*. The chemical composition analyses was made with LC / MS. Potential antioxidant activities of the extracts were determined with β -carotene-linoleic acid system; free radical scavenging effects were determined with DPPH • and ABTS • + methods; the highest values were obtained in 70% methanol extract of *A. relictata*. Pure unknown substances were determined on chemical compositions of essential oils. The current population statuses of the species were described with IUCN categories.

Keywords: *Ajuga*, morphology-anatomy, ITS, total phenol-flavonol-flavonoid compounds, antioxidant activity, essential oil.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	3
Lamiaceae (Labiatae) Genel Özellikler	3
<i>Ajuga</i> L.	4
<i>Ajuga</i> L. Cinsinin Sistematikteki Yeri	4
<i>Ajuga</i> L. Cinsinin Genel Özellikleri	5
<i>Ajuga</i> Cinsi ile Yapılan Çalışmalar	5
<i>Ajuga</i> cinsi ile yapılan morfolojik ve anatomik çalışmalar	5
<i>Ajuga</i> cinsi ile yapılan bitki fizyolojisi çalışmaları	6
Bitki kültürü çalışması	6
Uçucu yağların belirlenmesine yönelik çalışmalar	6
Kimyasal içerik belirlenmesine yönelik çalışmalar	7
Böcekler ve larvalar üzerinde yapılan çalışmalar	8
Kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar	8
Antimikrobiyal aktivite çalışmaları	8
Yapılan antioksidan aktivite çalışmaları	9
Üreme biyolojisi çalışması	9
Etnobotanik çalışmalar	9
Moleküler çalışmalar	10
Bunların dışında yapılan çalışmalar	11
Materia Medica'da adı geçen <i>Ajuga</i> türleri ve kullanımları	12

GEREÇLER ve YÖNTEMLER	13
Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Materyal ve Yöntemler	13
Bitkisel Materyal	13
Makromorfolojik Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler	14
Anatomik Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler	14
Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler	15
DNA ekstraksiyonu	15
Dilüsyon hazırlama	15
Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	16
PCR uygulaması için %1'lik agaroz jel hazırlama	16
Dizi analizi	16
Fitokimyasal Çalışmalar	17
Ekstrelerin hazırlanışı	17
Miktar Tayini Çalışmaları	17
Toplam fenolik madde miktar tayini	17
Toplam flavonoid madde miktar tayini	17
Toplam flavonol madde miktar tayini	17
Sıvı kromatografisi/kütle spektrometrisi (LC/MS) ile ekstrelerin analizi	17
Antioksidan aktivite çalışmaları	18
1,1-difenil-2-2 pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini	18
ABTS•+ Radikal Süpürücü Etki	18
β-karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini	18
Uçucu Yağ Eldesi	18
Distilasyon işlemleri	18
Su distilasyonu	18
Analitik çalışmalar	19
Gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi / kütle spektrometrisi sistemi (GK/KS)	19
BULGULAR ve TARTIŞMA	20
Botanik Çalışmalara Ait Bulgular	20
Morfolojik ve Anatomik Özellikler	20
<i>A. postii</i>	20
Anatomik Bulgular	22

<i>A. postii</i> kök anatomik özellikleri	22
<i>A. postii</i> gövde anatomik özellikleri	22
<i>A. postii</i> yaprak enine kesit anatomik özellikleri	23
<i>A. relicta</i>	25
Anatomik Bulgular	27
<i>A. relicta</i> kök anatomik özellikleri	27
<i>A. relicta</i> gövde anatomik özellikleri	27
<i>A. relicta</i> yaprak enine kesit anatomik özellikleri	28
Moleküler Çalışmalara Ait Bulgular	34
Miktar Tayini Çalışmalarına Ait Bulgular	36
Toplam Fenolik Madde Miktarı	36
Toplam Flavanoid Madde Miktarı	39
Toplam Flavanol Madde Miktarı	41
Ekstrelerin Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi	43
Antioksidan Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular	50
Serbest radikal süpürücü etki	50
ABTS•+ Radikal Süpürücü Etki (TEAC)	52
β-karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini	53
Uçucu Yağ Analizlerine Ait Bulgular	56
SONUÇ ve ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 <i>Ajuga postii</i> 'nin Türkiye'deki dağılışı	13
Şekil 2 <i>Ajuga relictta</i> 'nın Türkiye'deki dağılışı	13
Şekil 3 Clevenger apareyi	19
Şekil 4 <i>A. postii</i>	21
Şekil 5 <i>A. postii</i> çiçek	21
Şekil 6 <i>A. postii</i> kök anatomik kesiti	22
Şekil 7 <i>A. postii</i> gövde anatomik kesiti	23
Şekil 8 <i>A. postii</i> yaprak enine kesiti	24
Şekil 9 <i>A. relictta</i>	26
Şekil 10 <i>A. relictta</i> çiçek	26
Şekil 11 <i>A. relictta</i> kök enine kesiti	27
Şekil 12 <i>A. relictta</i> gövde anatomik kesiti	28
Şekil 13 <i>A. relictta</i> yaprak orta damar enine kesiti	29
Şekil 14 PCR sonrası elde edilen ürünün agaroz jel üzerindeki görüntüsü	34
Şekil 15 Toplam fenolik madde miktar tayini deneyinde ekstrelerin kolorimetrik görünüşleri	37
Şekil 16 <i>Ajuga</i> ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarları	38
Şekil 17 Toplam flavanoid madde miktar tayini deneyinde ekstrelerin kolorimetrik görünüşleri	40
Şekil 18 <i>Ajuga</i> ekstrelerinin toplam flavanoid madde miktarları	40
Şekil 19 Toplam flavanol madde miktar tayini deneyinde ekstrelerin kolorimetrik görünüşleri	42
Şekil 20 <i>Ajuga</i> ekstrelerinin toplam flavanol madde miktarları	42
Şekil 21 <i>Ajuga</i> ekstrelerinin toplam fenol, flavanoid ve flavanol madde miktarları	43
Şekil 22 <i>A. postii</i> ekstrelerinin LC/MS analizi sonucu alınan iyon Kromatogramı	44
Şekil 23 <i>A. relictta</i> ekstrelerinin LC/MS analizi sonucu alınan iyon kromatogramı	45

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

Şekil 24	DPPH• deneyinde ekstrelerin kolorimetrik görünüşleri	50
Şekil 25	<i>Ajuga</i> ekstrelerinin serbest radikal süpürücü etkileri	52
Şekil 26	2,2'- azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS•+) sonuçları	53
Şekil 27	β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu deneyinde ekstrelerin kolorimetrik görünüşleri	54
Şekil 28	<i>Ajuga</i> ekstrelerinin β -karoten-linoleik asit sisteminde absorbans eğrileri	54
Şekil 29	<i>Ajuga</i> türlerine ait ekstrelerin β -karoten-linoleik asit deneyine göre antioksidan aktiviteleri	55
Şekil 30	<i>A. postii</i> uçucu yağ analizi spektrofotometre sonuçları	56
Şekil 31	<i>A. relictata</i> uçucu yağ analizi spektrofotometre sonuçları	57
Şekil 32	Bazı <i>Ajuga</i> taksonlarının akrabalık ilişkileri	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 <i>Ajuga</i> L. Cinsinin taksonomik olarak sınıflandırılması	4
Çizelge 2 <i>Ajuga</i> L. Cinsinin APG III Sistemi'ne (Angiosperm Phylogeny Group III system) göre taksonomik olarak sınıflandırılması	5
Çizelge 3 <i>A. postii</i> morfolojik özellikleri	30
Çizelge 4 <i>A. relictata</i> morfolojik özellikleri	32
Çizelge 5 En yakın akraba tür ve benzerlik oranı	35
Çizelge 6 <i>Ajuga</i> ekstrelerinin % verimleri ve 1 gr ekstrede mg gallik asite eşdeğer toplam fenolik madde miktarları	36
Çizelge 7 <i>Ajuga</i> ekstrelerinin 1 gr ekstrede mg kersetine eşdeğer toplam flavanoid madde miktarları	39
Çizelge 8 <i>Ajuga</i> ekstrelerinin 1 gr ekstrede mg kersetine eşdeğer toplam flavanol madde miktarları	41
Çizelge 9 <i>A. postii</i> ekstrelerinin LC/MS analiz sonuçları	46
Çizelge 10 <i>A. relictata</i> ekstrelerinin LC/MS analiz sonuçları	48
Çizelge 11 <i>Ajuga</i> ekstrelerinin DPPH• serbest radikali üzerinden tayin edilmiş inhibisyon değerleri	51
Çizelge 12 <i>Ajuga</i> ekstrelerinin 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS•+) antioksidan aktivite sonuçları	52
Çizelge 13 <i>Ajuga</i> ekstrelerinin β -karoten-linoleik asit deneyinde % antioksidan aktivite değerleri	55

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

μL	: Mikrolitre (10^{-6} litre)
ABTS•+	: 2,2'-azonobis(3-etilbenzotizolin-6-sulfonat)
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH•	: 1,1-Difenil-2-2 pikrilhidrazil radikali
G	: Gravity (Yerçekimi)
Gk	: Gaz kromatografisi
Gk/Ks	: Gaz kromatografisi / Kütle spektrometrisi sistemi
gr	: Gram
IC ₅₀	: Yüzde ellisini inhibe eden konsantrasyon
ITS	: Internal Transcribed Spacer
LC/MS	: Sıvı Kromatografisi / Kütle Spektrometrisi
m/z	: Kütle/yük oranı
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
TEAC	: Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasite
Tween® 20	: Polioksietilen-20-sorbitan monoelat

GİRİŞ ve AMAÇ

Türkiye sahip olduğu farklı iklim özellikleri ve biyocoğrafik bölgeleri ile zengin bir biyoçeşitliliğe sahiptir. Karasal, akdeniz ve karadeniz iklimlerinin etkilerinin görülmesinin yanında, Türkiye dünya üzerinde görülen 34 biyoçeşitlilik merkezinden üçünü bir arada bulunduran tek ülkedir: Bunlar kuzeyde Avrupa-Sibirya, İç Anadolu ve Doğu Anadolu'da İran-Turan ile Batı ve Güney Anadolu'da Akdeniz'dir (Sekercioglu ve ark., 2011). Türkiye'de görülen biyoçeşitlilik; farklı iklim ve yükseltiler sonucu oluşan makro ve mikro habitatlar, Asya ve Avrupa arasında köprü olmasına ek olarak güneyde Etiyopya ile Arap yarımadası ile bağlı olması, tektonik oluşumlar ve buzul çağları sırasında birçok tür için korunaklı alan olarak görev yapması sonucudur (Çıplak, 2003). Türkiye Florası 173 familyaya ait 10,000'den fazla takson ve 1,225 cins ile temsil edilmektedir (Davis ve ark., 1965; Davis ve ark., 1985; Davis ve ark., 1988; Güner, 2000). Bu cinslerden 15 tanesi endemik olup bu cinsler 2,650'nin üzerinde endemik bitki türüne sahiptir. Türkiye'nin endemizm oranı yaklaşık %33 olup (Davis ve ark., 1965; Davis ve ark., 1985; Davis ve ark., 1988; Güner ve ark., 2000; Özhatay ve ark., 2011), en fazla endemizm oranına sahip familyalar; Scrophulariaceae (52%), Campanulaceae (49%), Lamiaceae (Labiatae) (44%), Asteraceae (Compositae) (38%)'dir. Endemizm oranının en fazla olduğu cinsler ise *Ebenus* (100%), *Verbascum* (80%) ve *Sideritis* (78%)'tir (Baser, 2002). Fitocoğrafik bölgeler arasında ise Akdeniz Bölgesi 633 endemik bitki türü ile endemizm sayısının fazlalığına göre ilk sırada yer almaktadır, bunu Doğu Anadolu Bölgesi izlemektedir (Topçu ve ark., 2009).

Türkiye'nin sahip olduğu bu durum geçmişten günümüze kadar yerli ve yabancı araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Türkiye bitkiler açısından değerlendirildiğinde ilk ayrıntılı çalışmalar 1867-1888 yıllarında İsviçre'li botanikçi Boissier tarafından hazırlanan "Flora Orientalis" ile başlamıştır. Daha sonra bu çalışmayı Davis editörlüğünde hazırlanan 10 ciltlik "The Flora of Turkey and East Aegean Islands" adlı eser izlemiştir. Son olarak da Türk botanikçiler tarafından on cilde ek olarak on birinci cildin hazırlanmasıyla Türkiye Florası'nın zenginliği bir kez daha ortaya konulmuştur.

Ajuga L. cinsi üyeleri Avrupa, Asya, Afrika, Avustralya ve Kuzey Amerika'da doğal olarak yetişmekte ya da bahçelerde yetiştirilmektedir. Bu cinsle ait bitkilerin çoğu; antelmintik, diüretik, anti-fungal, anti-inflamatuar ve antimikobakteriyel ajanlar olarak, ateş, diş ağrısı, dizanteri, sıtma, yüksek tansiyon, şeker hastalığı, mide-bağırsak bozuklukları için geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Bunun yanında haşere büyümesini önleyici olarak kullanımları vardır. *Ajuga* üyelerinden; fitoekdisterooidler, neo-klerodan-diterpenler, diterpenler, triterpenler, steroller, antosiyanidin-glikozitleri, iridoid glikozitleri, vithanolidler, flavonoidler, trigliseridler ve uçucu yağlar izole edilmiştir. Bu bileşiklerin biyolojik, farmakolojik ve tedavi edici özellikleri (anabolik, analjezik, antibakteriyel, anti-östrojenik, anti-fungal, anti-enflamatuar, anti-hipertansif, anti-lösemik, antimalarial, antimikobakteriyel, antioksidan, antipiretik, kardiyotonik, sitotoksik, hipoglisemik, damar rahatlatan ve böcek büyümesini önleyici) vardır. Bu nedenle, *Ajuga* cinsi tıbbi ve ekonomik öneme sahiptir (İsraili ve Lyoussi, 2009). Türkiye'de *Ajuga* cinsi üyeleri idrar arttırıcı, terletici, tonik, adet söktürücü, yara iyi edici olarak ve hayvan sokmalarına karşı halk arasında kullanılmaktadır (Baytop, 1999).

Ajuga cinsinin Anadolu'daki yayılışına bakılacak olursa *Ajuga* cinsi Anadolu'da 13 tür ve 10 alt tür olmak üzere toplam 23 takson ile temsil edilmektedir (Güner ve ark., 2012). Endemik türler olan *A. postii* Briq. ve *A. relictata* P.H.Davis 1350 ile 1500 m arasında yayılış göstermektedir. Buna bağlı olarak yaşanan buzul ve buzullar arası dönemlerde korunaklı alanlarda yaşamlarını devam ettirdiklerini söylemek mümkündür.

Bu çalışma ile endemik türler olan *A. postii* Briq. ve *A. relictata* P.H.Davis'in morfolojik ve anatomik özellikleri, kimyasal bileşenleri, antioksidan aktiviteleri ve moleküler akrabalık ilişkileri belirlenmiş olup bunun yanında güncel popülasyon durumları IUCN (International Union for Conservation of Nature) kategorileri ile açıklanmıştır. Bu amaçla belirtilen taksonlar çiçeklenme dönemlerinde toplanarak herbaryum materyali haline getirilmiş, morfolojik incelemeler için ölçümler yapılmış ve anatomik çalışmalar için gerekli preparatlar hazırlanmıştır. Anatomik incelemelerde örnekler Sartur Reaktifi ile mikroskopta incelenerek fotoğraf çekimleri yapılmıştır. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenerek, LC/MS (Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi) ile fenolik bileşiklerin analizi yapılmıştır. Toplam flavanol ve flavanoid miktar çalışmaları ise kersetine eş değer olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Lamiaceae familyası üyeleri uçucu yağ içeren türlerdir. Bu nedenle bitki taksonlarına uçucu yağ eldesi için laboratuvarında Clevenger aparatında su distilasyonu işlemi uygulanmıştır. Daha sonra gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi sistemi (GK/KS) ile bileşiklerin analizi yapılmıştır. Bunların yanında moleküler akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde ITS (Internal Transcribed Spacer) yönteminden yararlanılmıştır.

KAYNAK BİLGİSİ

Lamiaceae (Labiatae) Genel Özellikler

Tarihte ilk defa Labiatae'den *Genera Plantarum* (1789)'da bahsedilmiştir. Kelimenin kökeni Latince "labium" olup iki dudaklı zigomorfik çiçek durumunu tanımlamaktadır. Labiatae alternatif olarak kullanılan "Lamiaceae" ise ilk kez 1836 yılında İngiliz botanikçi John Lindley tarafından kullanılmıştır. Daha sonra ise 1935 yılında Botanik Nomenklatürüne (ICBN) geçmiştir.

Lamiaceae en az 23 familyanın ve 23000'den fazla türün bulunduğu Lamiales ordusu içinde yer almaktadır (Schäferhoff ve ark., 2010). Lamiaceae dünyada 236 cinse ait yaklaşık 7200 tür ile temsil edilmektedir (Harley ve ark., 2004; Heywood ve ark., 2007; Yuan ve ark., 2010). Türkiye'de ise Lamiaceae üçüncü büyük familya olup 46 cins ve 580 tür ile temsil edilmektedir. Bu türlerden 260'ı endemiktir ve endemizm oranı yaklaşık %44'tür (Davis ve ark., 1965; Davis ve ark., 1985; Davis ve ark., 1988; Güner ve ark., 2000; Dirmenci, 2012).

Bu familya üyeleri kutup bölgeleri dışında çok geniş bir yayılış alanına sahiptir. Akdeniz havzası ülkeleri başta olmak üzere Avustralya, Güney Batı Asya, Güney ve Kuzey Amerika'da yayılış göstermektedir (Güner ve ark., 2000).

Lamiaceae üyeleri bir veya çok yıllık otsu bitkiler ya da çalı formlarıdır. Salgı tüylerinde uçucu yağ taşırlar. Familyanın karakteristik özellikleri; gövde 4 köşeli, yapraklar çoğu zaman basit, bazen parçalı ve dekusat dizilişlidir; çiçekler her nodusta vertisillastrum durumundadır; zigomorf ve bilabiattır; uçucu yağ, sapı tek, başı 8 hücreli ve pul şeklindeki Labiatae tipi salgı tüylerindedir. Hermafrodit olan çiçeklerde kaliks 5 loblu kalıcı, bazen bilabiattır; korolla bilabiattır, üst dudak bazen eksiktir. Stamen 4 tane, çoğu zaman didinamdır; bazen 2 stamen bulunur. Ovaryum 2 karpelden meydana gelmiş 4 gözlü ve üst durumludur, her gözde 1 ovül bulunur; stilus ginobaziktir. Meyva 4 nukstan meydana gelen bir şizokarpıtır (Tanker ve ark., 2007). Böcekler, kelebekler ve kuşlar ile tozlaşma görülebilmektedir (Yıldız ve Aktoklu, 2012).

Lamiaceae yedi alt familyadan oluşmaktadır: Ajugoideae Kostel., Lamioideae Harley, Nepetoideae (Dumort.) Luerss., Prostantheroideae Luerss., Scutellarioideae (Dumort.) Caruel, Symphorematoideae Briq. ve Viticoideae Briq. (Harley ve ark., 2004). Lamiaceae'nin alt familyalarının özellikleri ve evrimsel gelişmişlikleri yapılan DNA çalışmaları ile gösterilmiştir. Buna göre Lamiaceae'de bazı grupların monofiletik olduğu düşünülmektedir (Judd ve ark., 2008). Ajugoideae (ya da Teucroideae)'nin şizokarplarının dört loplu olması, kalıcı olmayan stilusları ile monofiletik özellik gösterirler. Bu grup içerisinde *Clerodendrum*, *Teucrium*, *Trichostema* ve *Ajuga* bulunmaktadır. *Scutellaria* ve *Holmskioldia* Scutellarioideae altfamilyası içerisinde yer almaktadır. Bu grup üyelerinde yuvarlak kaliks lopları ve şişkin tabanlı ya da ince uzun sık tüylü nutletler görülmektedir. Lamioideae ve Nepetoideae alt familyaları ise ginobazik stilusları ile monofiletik bir grup oluştururlar. Ancak rbcL ve ndhF dizi analizlerine göre Lamioideae; Scutellarioideae, Ajugoideae, Nepetoideae ve Chloanthoideae ya da Callicarpa'nın içerisinde bulunduğu grup içerisinde yer almaktadır. Nepetoideae grubu içerisinde yer *Glechoma*, *Dicerandra*, *Hyptis*, *Lycopus*, *Melissa*, *Mentha*, *Monarda*, *Nepeta*, *Ocimum*, *Origanum*, *Plectranthus*, *Prunella*, *Pycnanthemum*, *Pycnostachys*, *Salvia*, *Satureja*, *Lavandula*, *Thymus* ve *Basilicum* cinslerinin

hepsinde heksakolpat polen yapısı ve benzer DNA dizilimleri görülmektedir; bunların dışında kalan diğer cinslerde ise trikolpat polen yapısı mevcuttur. Nepetoideae alt familyasında ise endosperm ve iridoidler bulunmazken, yüksek oranda uçucu terpenoidler bulunmaktadır. *Lamium*, *Prasium*, *Galeopsis*, *Leonotis*, *Physostegia*, *Marrubium*, *Pogostemon* ve *Stachys* cinslerinin içerisinde yer aldığı Lamioideae grubu monofiletik olup bu durum DNA verileri ile desteklenmiştir. *Gmelina*, *Callicarpa*, *Vitex*, *Premna* ve *Cornutia* cinsleri ise polifiletiktir.

Lamiaceae'nin Verbenaceae'den evrimleştiği kabul edilmektedir (Cronquist, 1981). İki familyada da karşılıklı dizilmiş yapraklar, zigomorfik çiçek durumları ve iki karpelli ginekium yapıları benzerdir. Lamiaceae, Verbenaceae ile ginekium tabanı ve meyve yapısı ile ayrılır. Lamiaceae dört loplulu ovaryuma ve ginobazik stilusa sahipken Verbenaceae üyeleri lopsuz ovaryuma ve terminal stilusa sahiptir.

Lamiaceae ekonomik öneme sahip birçok bitki türü içermektedir. Bunlardan *Mentha*, *Lavandula*, *Marrubium*, *Nepeta*, *Ocimum* (fesleğen), *Origanum* (kekik), *Rosmarinus* (biberiye), *Salvia* (adaçayı), *Satureja* ve *Thymus* (kekik) cinsleri baharat olarak kullanılmalarının yanında uçucu yağlar içermektedirler. *Stachys* cinsinin birkaç türünden elde edilen tüberler yenilebilmektedir. *Tectona* (tik ağacı) kereste imalinde kullanılmaktadır. Birçok cins süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Bunlar; *Ajuga*, *Callicarpa*, *Clerodendrum*, *Plectranthus*, *Holmskioldia*, *Leonotis*, *Monarda*, *Pycnanthemum*, *Salvia*, *Scutellaria* ve *Vitex*'dir (Judd ve ark., 2008).

Ajuga L.

Ajuga L. Cinsinin Sistematikteki Yeri

Çizelge 1. Ajuga L. Cinsinin taksonomik olarak sınıflandırılması

Bölüm	Spermatophyta
Alt Bölüm	Angiospermae
Sınıf	Dicotyledonae
Alt Sınıf	Metachlamydeae
Takım	Tubiflorae
Familya	Lamiaceae
Alt Familya	Ajugoideae
Cins	<i>Ajuga L.</i>

Çizelge 2. *Ajuga L.* Cinsinin APG III Sistemi'ne (Angiosperm Phylogeny Group III system) göre taksonomik olarak sınıflandırılması

Domain	Eukaryota
	Archaeplastida
Regnum	Plantae
Cladus	Angiosperms
Cladus	Eudicots
Cladus	Core eudicots
Cladus	Asterids
Cladus	Euasterids I
Ordo	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Subfamilia	Teucrioideae
Genus	<i>Ajuga</i>

***Ajuga L.* Cinsinin Genel Özellikleri**

Ajuga cinsi üyeleri tek yıllıktan kuvvetli çok yıllığa kadar değişen bitkilerdir. Taban kısımlarda yapraklı ya da yapraksız olabilirler. Gövde yaprakları düz, dişli ya da üç parçalıya değişen formlardadır; brakteler gövde yapraklarına benzer ya da bunlardan farklı olabilir. Vertisillastrumlar 2-6 çiçeklidir. Kaliks ± aktinomorfiktir. Halkalı korolla tüpü kısa veya uzundur; üst dudak kısadır, bifit ya da kaybolmuştur, alt dudak çok uzundur, 2 yan lop ile geniş emarginat orta lopludur. 4 stamenlidirler, genellikle stamenler korolla tüpünden dışarı çıkar. Stilus ginobazik değildir, ovaryum lobunun tabanının üstünden bağlanır. Nutletler çok küçük çukurlu veya enine buruşuk çizgilidir; meyveler nadiren bakkadır (Davis ve ark., 1985).

***Ajuga* Cinsi ile Yapılan Çalışmalar**

***Ajuga* cinsi ile yapılan morfolojik ve anatomik çalışmalar**

A. reptans L.'ın da içinde bulunduğu farklı bitki gruplarının yaprak saplarının anatomik yapısı incelenerek karşılaştırmalar yapılmıştır (Akçın ve ark., 2011). *A. reptans* ile yapılan başka bir çalışmada ise taksonun polen yapısı, morfolojik ve anatomik özellikleri incelenmiştir (Erkara ve Koyuncu, 2009). *A. orientalis L.* ile yapılan morfolojik çalışmada bitki üzerinde bulunan trikomlar incelenmiştir (Çalı

ve ark., 2014). Türkiye’de yetişen 8 farklı *Ajuga* taksonunun polen morfolojisi incelenmiştir (Köse ve ark., 2011). Pakistan’da yapılan bir çalışmada *A. bracteosa* Wall ex. Benth. ve *A. parviflora* Benth. ’nın polen morfolojisi çalışılmıştır (Firdous ve ark., 2015). *A. reptans* ve *A. chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *chia* (Schreber) Arcangeli var. *chia* (Schreber) Arcangeli üzerinde morfolojik ve anatomik çalışmalar yapılmıştır (Akçın ve ark., 2006). *A. orientalis* ile yapılan anatomik çalışmada kök, gövde, yaprak, petiyol, kaliks ve korolla yapıları çalışılmıştır (Çalı, 2014). Bu çalışmaların yanında proje kapsamında Batı Anadolu’da yayılış gösteren 13 *Ajuga* taksonunun (*A. orientalis*, *A. genevensis* L., *A. reptans*, *A. laxmanii* (L.) Benth., *A. salicifolia* (L.) Schreber, *A. chamaepitys* (L.) Schreber, *A. chamaepitys* subsp. *chia* var. *chia*, *A. chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *chia* (Schreber) Arcangeli var. *ciliata* Briq., *A. chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *palaestina* (Boiss.) Bornm., *A. chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *glauca* P.H.Davis, *A. chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *mesoginata* (Boiss.) Bornm., *A. chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *cuneatifolia* (Stapf) P.H.Davis, *A. chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *cypria* P.H.Davis, *A. bombycina* Boiss) morfolojik ve anatomik incelemeleri yapılmıştır (Köse ve ark., 2011).

***Ajuga* cinsi ile yapılan bitki fizyolojisi çalışmaları**

A. reptans’ın sahip olduğu rafinoz oligosakkaritlerin floem taşımasında ve karbonhidrat depolanmasındaki önemi araştırılmış, bitkiden alınan yapraklardan izole edilen cDNAlar karşılaştırılarak buna göre değerlendirmeler yapılmıştır (Sprenger ve Keller, 2000). *A. reptans* L. var. *atropurpurea*’nın kök tüylerinde bulunan klerosterol, 22-dehidroklerosterol ve kolesterol bileşiklerinin biyosentezinin daha iyi anlaşılabilmesi için bu yapılardaki ²H- ve ¹³C- işaretlenerek çalışma gerçekleştirilmiştir (Fujimoto ve ark., 2000). Yapılan başka bir çalışmada ise; hava sıcaklığının etkilerinin belirlenmesi için her zaman yeşil yapraklı olan üç bitki türü *A. reptans* var. *atropurpurea*, *Aucuba japonica* Thunb. ve *Hedera helix* L. yapraklarındaki kılcal damarlardaki şeker salınımı yaz ve kış mevsimlerinde ayrı ayrı incelenmiştir (Hoffmann-Thoma ve ark., 2001). Nektar üretimi ile ilgili yapılan bir çalışmada; *Lamium maculatum* L., *Lamiastrum galeobdolon* (L.) Crantz ve *A. reptans*’ın 24 saat boyunca çiçek başına toplam nektar üretimi (INP) indeksi, çiçeklenme dönemindeki nektar şeker konsantrasyonu, çiçek ömrü ve çiçek sayısının belirtildiği bir çalışma yapılmıştır (Mačukanović-Jocić ve ark., 2004). *A. reptans*’ın yapraklarından iki tane oligosakkarit elde edilmiş ve bunların fizyolojik işlevleri incelenmiştir (Bachmann ve Keller, 1995). Yapılan bir ekofizyoloji çalışmasında *A. reptans*’ın farklı ekolojik koşullarda farklı özellikler gösterdiği ve ekotipinin yavaş büyüdüğü yapılan çalışma ile gösterilmiştir (Golovko ve Dymova, 1999).

Bitki kültürü çalışması

A. reptans’ın çiçeklerinden hazırlanan kallus kültüründe bulunan siyanidin ve delfinidin pigmentlerinden, delfinidin zamanla azaldığı belirlenmiştir (Callebaut ve ark.,1997).

Uçucu yağların belirlenmesine yönelik çalışmalar

A. chamaepitys ssp. *chamaepitys*’ın sahip olduğu uçucu yağ bileşimi (Velasco-Negueruela ve ark., 2004) ile *A. orientalis*’in uçucu yağ içeriği incelenmiştir (Sajjadi ve Ghannadi, 2004). İran’da yetişen *A. austro-iranica* Rech. f. uçucu yağ

içeriği bakımından incelenmiş ve yağın içeriğinde trans-verbenol, karyofillen oksit, mirtenol gibi kimyasallar belirlenmiştir (Javidnia ve ark., 2010). Yemen’de yapılan bir çalışmada; *A. bracteosa* ve *Lavandula dentata* L. ’dan elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir (Mothana ve ark., 2012). *A. pseudoiva* Rob.’dan elde edilen uçucu yağın içerdiği bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesi incelenmiş ve bazı fungal gruplar üzerinde yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur (Mansour ve ark., 2013). İran’a endemik olan *A. chamaecistus* Ging. ex Benth. ’un toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağda *p*-simen, β -pinen, α -fellandren ve α -pinen bileşikleri tespit edilmiştir (Mohammadhosseini ve ark., 2011). *A. chamaepitys* ’den elde edilen uçucu yağda yirmi beş bileşik elde edilmiştir. Bunlardan en önemlileri monoterpen hidrokarbonlar, α -pinen ve β -pinen’dir (Azizan ve ark., 2002). *A. bombycina* ’dan su distilasyonu yoluyla elde edilen uçucu yağdan yapılan analizler sonucunda kırk dört bileşik elde edilmiştir. Bunlardan en önemlileri β -pinen, α -pinen, germakren D, β -fellandren ve limonendir (Baser ve ark., 2001). *A. chamaecistus* Ging. subsp. *tomentella* (Boiss.) Rech. f. ’dan elde edilen uçucu yağın bileşiminde bulunan en önemli bileşikler; timol, eksofenkol, β -pinen, 1-okten-3-ol, α -terpineol, 2-hekzanol, α -tuyen ve α -pinendir (Ardekani ve ark., 2010). *A. orientalis* ’den elde edilen uçucu yağın bileşiminde otuz bileşik tespit edilmiştir. Bunlardan yoğun olarak bulunanlar; fitol (36.7 %), *n*-heksadekanoik asit (14.2 %) ve dodekanoik asit (12.2 %)tir (Küçükbay ve ark., 2013). Türkiye’de beş farklı lokaliteden toplanan *A. laxmannii* (L.) Benth. ’dan elde edilen uçucu yağın bileşiminde; nonakozan, heptakozan, hekzahidrofarneol aseton, heksadekanoik asit, dodekanoik asit, tetradekanoik asit ana bileşen olarak bulunmuştur (Köse ve ark., 2015). Sırbistan’da yapılan bir çalışmada *A. chamaepitys* subsp. *chia* ’nın normal ortamda yetişen ve yangından sonra toplanan örneklerinden elde edilen bitkilerdeki uçucu yağ bileşimleri incelenmiştir. Buna göre normal ortamda yetişen örneklerden 38 ve yangın sonrası ortamda yetişen bitkilerden 34 uçucu yağ bileşeni elde edilmiştir (Mitic ve ark., 2011).

Kimyasal içerik belirlenmesine yönelik çalışmalar

İran’da tedavi amacıyla kullanılan *A. chamaepitys* ’in metanolik ekstraktlarından feniletanoid glikozitler, akteositler ve flavon glikozitleri ile krisoeriol 7-*O*-glukopiranositler ve apigenin 7-*O*-ramnopiranositler solid-faz ekstraksiyonu (SPE) ve hazırlayıcı ters fazlı yüksek-performanslı sıvı kromatografisi (prep-RP-HPLC) ile izole edilmiştir (Delazar ve ark., 2011). *A. parviflora* ’da iki yeni anitifungal vitanolit ekstre edilmiştir (Nawaz ve ark., 2000). Yapılan başka bir çalışmada ise; *A. reptans* ’dan elde edilen iki yeni klerodan diterpene “Ajugatansinler” denilmiştir (Carbonell ve Coll, 2001). *A. bracteosa* ’nın yaprak ve kökünde bulunan mineral elementler incelenmiştir (Ahmed ve Chaudhary, 2009). *A. remota* ekstraktlarından altı flavonol glikoziti belirlenmiştir (Arot Manguro ve ark., 2006). Yapılan başka bir çalışmada ise; Anadolu’da yetişen Lamiaceae üyesi olan *Salvia*, *Teucrium*, *Ajuga*, *Sideritis*, *Nepeta* ve *Lavandula* cinslerine ait türlerden iki boyutlu NMR teknikleri kullanılarak içerdikleri bileşikler tespit edilmiştir (Topcu ve Ulubelen, 2007). Japonya’da yapılan bir çalışmada 14 *Ajuga* taksonunun yaprak ve çiçeklerinden flavonlar ve antosiyaninler izole edilmiştir (Inomata ve ark., 2013). Başka bir çalışmada ise; *A. salicifolia* ’da ionon, iridoid ve feniletanoid glikozitleri belirlenmiştir (Akbay ve ark., 2003). *A. salicifolia* ’dan ajugasalisigenin, üç yeni sterol glikosid ve ajugasalisiosidler F-H (2-4) izole edilmiştir (Akbay ve ark., 2003).

A. reptans var. *atropurpurea* ile yapılan bir çalışmada kuru köklerden izole edilen asetillenmiş ekdisteoidlerin yapısal tayini spektroskopik yöntemler ile belirlenmiştir (Calcagno ve ark., 1995). *A. reptans* ile yapılan bir çalışmada çiçeklerinden dört ve hücre kültüründen bir tane antosiyanin izole edilmiştir. İzole edilen bu pigmentler delphinidin, iki sinnamik asitli siyanidin asetil glikozitlerdir (Terahara ve ark., 1996). Lamiaceae'nin alt familyaları olan Saturejoideae, Ajugoideae ve Scutellarioideae'nin nutlet yapıları içerisinde bulunan yağ asitlerinin bileşimleri belirlenmiştir (Marin ve ark., 1991). *A. chamaepitys*'in de içerisinde bulunduğu 96 Lamiaceae taksonundan rozmarinik ve kafeik asit içerikleri İTK-densitometrik yöntem kullanılarak incelenmiştir (Janicsak ve ark., 1999). *Ajuga bracteosa*'nın hekzanlı ekstresinden 1,2-benzenedikarboksilik asit bis(2*S*-metil heptil) ester izole edilmiştir (Singh ve ark., 2006). Yapılan bir çalışmada *A. reptans*'ın metanol ekstresinden yeni bir nonsteroid ekdisteoid agonisti belirlenmiştir (Elbrecht ve ark., 1996). *A. chamaecistus* ssp. *tomentella*'nın toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol, *n*-hekzan, dietil eter, hidroalkolik fraksiyonları *in vitro* ortamda kansere karşı sitotoksik etkileri incelenmiştir (Sadati ve ark., 2012). *Ajuga turkestanica*'nın toprak üstü, çiçek, kök ve tohumlarından elde edilen yağların içerikleri, sınıfları, nötral yağların yağ asitleri kompozisyonları, glikolipitler, fosfolipitler araştırılmıştır (Khidoyatova ve ark., 2012). *A. reptans*'ın çiçeklerinden dört tane antosiyanin elde edilmiştir (Terahara ve ark., 2001). *A. ciliata*'dan iki yeni neo-klerodan diterpen, (12*S*) -6 α -asetoksi-4 α , 18-epoksi-12-hidroksi-19-tigloyloksi-neo-klerod-13-en-15,16-olid ve 6 α , 18-diasetoksi-4 α -hidroksi-19-tigloyloksi-neo-klerod-13-en-15,16-olid bilinen üç analogları ile birlikte izole edilmiştir (Guo ve ark., 2012).

Böcekler ve larvalar üzerinde yapılan çalışmalar

Dört *Ajuga* türünün metanolik bileşiklerinin larvalar üzerindeki etkileri incelenmiştir (Fekete ve ark., 2004). Tunus'da yetişen 13 bitki *Spodoptera littoralis* boisduval larvasına karşı incelenmiştir. *A. pseudoiva*'nın yapraklarından elde edilen aseton ekstraktlarının sinek kovucu özellik gösterdiği belirlenmiştir (Jannet ve ark., 2000). Avustralya'da Lamiaceae üyeleri ile yapılan bir çalışmada ham yaprak özütlerinin akarlar üzerindeki etkisi incelenmiştir (Rasikari ve ark., 2005). *A. nipponensis*'den elde edilen kimyasal bileşiklerin böcekler üzerindeki beslenme karşıtı etkileri çizgili yaprak böcekleri üzerinde incelenmiştir (Xu ve ark., 2009).

Kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar

Doğal kaynaklar üzerinde yapılan kanser önleyici ajanlar ile ilgili olarak yedi Labiatae üyesi incelenmiştir. *A. decumbens*'den elde edilen Iridoid glikozit, 8-Asetilharpagid glikozitleri farelerde ikinci aşamadaki kanser hücreleri üzerinde önleyici etki göstermiştir (Konoshima ve ark., 2000).

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Rumex crispus L., *Acinos rotundifolius* Pers., *A. chamaepitys* ve *Lycopus europaeus* L.'in kök kısımlarından hazırlanan ekstreler Gram negatif ve pozitif bakteriler üzerinde incelenmiştir (Ulukanlı ve ark., 2005). Yapılan başka bir çalışmada ise; *A. chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *euphratica* P.H.Davis'nin metanol, su ve kloroform ekstrelerinin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir (Turkoğlu ve ark., 2010). Yapılan antiviral aktivite belirleme çalışmasında ise; *A. chamaepitys* ssp. *chia* var. *ciliata*'nın DNA virüsü olan *Herpes simplex* (HSV) ve

RNA virüsü olan *Parainfluenza* (PI-3)'ya karşı olan etkisi Madin-Darby sığır böbreği ve Vero hücreleri kullanılarak, kapiller gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir (Orhan ve ark., 2009). Yılan ısırılmalarından kaynaklı bakteriyel enfeksiyonlarda geleneksel tedavide kullanılan *A. decumbens*'in de içinde bulunduğu 88 bitki türü incelenmiştir (Liu ve ark., 2014). *A. remota*'dan hazırlanan petrol eteri, diklorometan ve metanol ekstralarının antifungal aktiviteleri incelenmiş ve petrol eterinin etkinliğinin en yüksek olduğu belirlenmiştir (Kariba, 2001). *A. lupulina* Maxim'dan elde edilen lupulin A (1), B (2), asit hidrolizat (5) ve lupulin D (4)'nin *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Pseudomonas aeruginosa* (Schröter) Migula ve *Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği belirtilmiştir (Chen ve ark., 1996). Rize'de yapılan bir çalışmada *A. orientalis*'in bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği belirtilmiştir (Yaldız, 2012). Bolu'da balıklardan izole edilen bakteriler üzerinde *A. reptans*'ın da kullanıldığı bir çalışmada bazı tıbbi bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri çalışılmıştır (Turker ve ark., 2009).

Yapılan antioksidan aktivite çalışmaları

A. iva (L.) Schreber'dan elde edilen sulu ekstrenin diyabetik fareler üzerindeki etkisi incelenmiştir (Taleb-Senouci ve ark., 2009). Bir başka çalışmada ise; *A. iva*'nın sulu ekstralarının etkileri yüksek kolestrol diyeti uygulanan fareler üzerinde incelenmiş, total kolesterol (TC) plazmasında ve VLDL-kolesterol değerlerinde azalmalar görülürken, HDL₂-kolesterol değerlerinde artışlar görülmüştür (Chenni ve ark., 2007). *Ajuga iva*, *Marrubium vulgare* L., *Mentha pulegium* L., ve *Teucrium polium* L.'dan hazırlanan metanol ekstralarının antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir (Khaled-Khodja ve ark., 2014). *A. turkestanica*'dan elde edilen bileşiklerin antioksidan, sitotoksik ve antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir (Mamadaliyeva ve ark., 2013). *Ajuga chamaepitys*'in toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağlar ile yapılan bir çalışmada DNA koruma ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir (Yumrutas ve ark., 2012). Yapılan başka bir çalışmada ise *A. orientalis*'in antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir (Göğer ve ark., 2015).

Üreme biyolojisi çalışması

A. iva ve *A. chamaepitys*'in karşılaştırmalı olarak değerlendirmesi yapılmıştır (De Clavijo, 1997).

Etnobotanik çalışmalar

Uganda'da yapılan çalışmada belirlenen bir kabilenin hangi bitkileri hangi hastalıkların tedavisinde kullandığı araştırılmıştır. Bu amaçla *A. alba*'nın yapraklarından hazırlanan çayın soğuk algınlığı ve yorgunlukta kullanıldığı belirlenmiştir (Hamill ve ark., 2003). Fas'da yapılan başka bir çalışmada ise; *A. iva*'nın solucan düşürücü olarak bağırsak bozukluklarına karşı kullanıldığı belirlenmiştir (Ziyyat ve ark., 1997). Pakistan'da yapılan bir çalışmada *A.bracteosa*'nın da içinde bulunduğu bitki grupları etnobotanik açıdan değerlendirilmiş ve *A. bracteosa*'nın baş ağrısı, sivilce, kızamık, mide asitliğini düzenlemede, kolik, akne tedavisi, sarılık, hipertansiyon ve boğaz ağrısına karşı kullanımının olduğu belirtilmiştir (Qureshi ve ark., 2009). Yine Pakistan'da yapılan başka bir çalışmada ise; *A. parviflora*'nın hepatit, ateş düşürme ve bademcik gibi boğaz problemlerinde kullanımının olduğu belirtilmiştir (Ahmad ve ark., 2011).

Hindistan'da yapılan bir çalışmada ise; *A. bracteosa*'nın taze yapraklarının çocuklarda görülen mide sorunlarında kullanıldığı bunun yanında sıtma ve sarılık ile ağız ülseri tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir (Kumar ve ark., 2009). Bosna Hersek'te yapılan başka bir çalışmada, *A. reptans*'ın ishal ve yara tedavisinde kullanıldığı belirlenmiştir (Redzic, 2007). Kars'da yapılan bir çalışmada ise; *A. orientalis*'in hemoroid tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir (Güneş ve Özhatay, 2011). Kenya'da diyabet tedavisinde geleneksel tıpta kullanılan bitkilerin belirlenmesine yönelik yapılan bir çalışmada *A. remota*'nın da kullanımı olduğu belirtilmiştir (Keter ve Mutiso, 2012). Pakistan'da yapılan bir etnobotanik çalışmada deri hastalıklarının tedavisinde kullanılan bitkiler araştırılmıştır. Burada *A. bracteosa*'nın toprak üstü kısımlarının dişeti iltihabı ve çıban tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir (Abbasi ve ark., 2010). Belgrat'ta yapılan başka bir çalışmada ise; *A. reptans*'ın toprak üstü kısımlarının safra kesesi ve mide hastalıkları, ağız ve boğaz iltihabında kullanıldığı belirtilmiştir (Menkovic ve ark., 2011). Kenya'da sıtma tedavisinde kullanılan etnobotanik ilaçların belirlendiği çalışmada *A. remota*'nın antiplasmodial aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Muthaura ve ark., 2007). Fas'da yapılan bir çalışmada *A. iva*'nın sindirim sistemi rahatsızlıklarında kullanıldığı belirtilmiştir (Ouhaddou ve ark., 2014). İran'da yapılan bir çalışmada ise; *A. chamaepitys* subsp. *tridactylites* (Ging. ex Benth.) P.H.Davis'in sarılık, eklem ağrıları ve gut tedavisinde, *A. reptans*'ın ateş, astım ve gut tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir (Naghbi, 2005). Türkiye'de yapılan bir çalışmada yara iyileştirici özelliğe sahip türler çalışılmış olup burada *A. chamaepitys*'in bu özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir (Tümen ve ark., 2006). Muğla'da yapılan bir çalışmada Lamiaceae'den 23 bitki türünün geleneksel tıpta kullanımları ve antimikrobiyal aktiviteleri çalışılmıştır. Buna göre; *A. chamaepitys*'in diüretik, böcek ve yılan ısırmasında zehire karşı, uyarıcı, yara iyileştirici ve hemoroidde; *A. chamaepitys* subsp. *chia* var. *chia*'nin ise hemoroidde kullanımı vardır (Sarac ve Uğur, 2007). Elazığ-Keban'da yapılan bir çalışmada *A. chamaepitys* subsp. *chia* var. *chia*'nin hemoroidde ve yara iyileştirmede kullanımının olduğu belirtilmiştir (Kılıç ve Bağcı, 2013). Bilecik-Osmaneli'de yapılan bir çalışmada; *A. orientalis*'in deri hastalıklarında, *A. chamaepitys* subsp. *chia* var. *chia*'nın kuvvet verici olarak, *A. laxmanii*'nin ise hemoroid ve deri hastalıkları tedavisinde kullanımlarının olduğu belirtilmiştir (Koyuncu ve ark., 2010). Elazığ-Maden'de yapılan bir çalışmada endemik ve nadir bulunan bitkilerin geleneksel tıpta kullanımları çalışılmış ve *A. chamaepitys* (L.) Schreb. subsp. *euphratica* P.H.Davis'in antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Khatun ve ark., 2012). Isparta'da meralarda arıların toplanmasında kullanılan aromatik bitkiler ile yapılan bir çalışmada *A. chamaepitys* subsp. *chia* var. *chia*'nin kullanımının olduğu belirtilmiştir (Fakir ve Babalik, 2009). Ürdün'de yapılan bir çalışmada *A. chia*'nın yara iyileştirici etkisinin olduğu bildirilmiştir (Oran ve Al-Eisawi, 2015). Fas'da yapılan bir çalışmada kanser hastalarına çeşitli bitkiler fitoterapi olarak verilmiştir. Buna göre; *A. iva*'nın göğüs kanseri tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir (Kabbaj ve ark., 2012).

Moleküler çalışmalar

Hibrit bir tür olan *Ajuga* × *mixta* Makino'nun nükleer ribozomal DNA'sı ile yakın türler olan *A. decumbens* ve *A. nipponensis*'in DNA'larının karşılaştırılmasıyla *A. × mixta*'nın polimorfizm gösterdiği bulunmuştur (Kokubugata ve ark., 2011). *A.*

chamaepitys subsp. *cypria* P.H.Davis, *A. chamaepitys* subsp. *cuneatifolia* (Stapf) P.H.Davis, *A. bombycina*, *A. orientalis*, *A. chamaepitys* subsp. *glareosa*, *A. chamaepitys* subsp. *chia* var. *chia*, *A. reptans*, *A. chamaepitys* subsp. *mesoginata* (Boiss.) Bornm., *A. laxmannii*, *A. genevensis* ve *A. chamaepitys* subsp. *palaestina*'nın ITS bölgelerine göre moleküler akrabalık ilişkileri belirlenmiştir (Köse ve ark., 2012).

Bunların dışında yapılan çalışmalar

A. bracteosa'nın morfolojik, kimyasal içerik, antimikrobiyal, anti-enflamatuar ve kardiyotonik aktivitesi ile etnobotanik kullanımı çalışılmıştır (Upadhyay ve ark., 2012). *Ajuga* cinsinin de içerisinde yer aldığı Lamiaceae'nin sahip olduğu kimyasalların belirlenmesine yönelik hazırlanan bilgisayar sistemi ile ilgili bilgi verilmektedir (Alvarenga ve ark., 2001). *A. reptans*'ın klonal yapısı ve kolonizasyonu morfo-ekolojik ve moleküler genetik yaklaşımlar kullanılarak incelenmiştir (Pfeiffer, 2005). İngiltere'de yapılan bir flora çalışmasında *A. pyramidalis*'den bahsedilmiştir (Rich ve ark., 1999). *A. reptans*'ın da içinde bulunduğu Kuzey-Doğu Anadolu'dan toplanan 22 türün kromozom sayıları belirlenmiştir (Inceer ve ark., 2007). Adana'da parklarda ve yol kenarlarında süs bitkisi olarak yetiştirilen türler belirlenmiştir. Buna göre *A. chamaepitys* subsp. *chia* var. *chia* ve *A. reptans*'in yerli türler oldukları belirtilmiştir (Karakuş ve Türkmen, 2014). Koruma ve genetik bilgi transferi çalışmaları için *A. bracteosa*'nın laboratuvar ortamında mikro çoğaltımı gerçekleştirilmiştir (Kaul ve ark., 2013).

Çalışmamızda yer alan *A. postii* ve *A. relictta* türlerine ait geçmişte yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır. *A. relictta* ile yapılan bir çalışmada sahip olduğu steroidler belirlenmiştir (Kokdil ve ark., 2002). Diğer bir çalışma ise flora çalışmasıdır (Varol ve ark., 1998). *A. postii* ve *A. relictta*'nın da içinde bulunduğu farklı bitki gruplarının metanol ekstresi hazırlanarak DNA üzerindeki etkileri incelenmiştir (Topçu ve ark., 2009). *A. postii* ile yapılan diğer bir çalışmada ise; bitkiden elde edilen metanol ekstraktının biyoanaliz-güdümlü fraksiyon yöntemi ile yapılan incelemesinde DNA'da hasara neden olan bir iridoit glikozit belirlenmiştir (Gören ve ark., 2005). Bunun dışında *A. postii*'nin polen morfolojisi belirlenmiştir (Abu-Asab ve Cantino, 1993).

Çalışmanın yapıldığı iki türün yayılış alanlarına bakılacak olursa *A. relictta*'nın tip örneği Kahramanmaraş, Ahir Dağı'ndan 1907 yılında toplanmıştır. Ancak o tarihten sonra belirtilen bu lokalitede bulunamamış ve yakın konumda bulunan Çimen Dağı'nda varlığına rastlanmıştır (Varol ve ark., 1998). *A. postii*'nin ise Türkiye Flora'sında belirtilen tip örneği Hatay Gavur Dağı'ndan toplanmış olup daha sonra yapılan çalışmalarda bu lokalitede bulunamayıp İçel, Namrun, Cehennem Deresi mevkiinde bulunan örnekler kullanılmıştır (Gören ve ark., 2005). Bunun dışında yakın ülke floraları incelendiğinde siyasi nedenlerle Suriye sınırları içerisinde gösterilen Amanos Dağları'nda *A. postii*'ye ait bilgiler bulunmaktadır (Edward, 1838-1909).

Materia Medica'da adı geçen *Ajuga* türleri ve kullanımları

***Folia Ajugae chamaepitys* (European ground pine, yellow bugle leaves);** seyrek ateş, gut, romatizma ve safra rahatsızlıklarında hazırlanan infüzyonun bir damlası etkili olmaktadır. Diüretik, uyarıcı ve emenegogtur. Aromatik tat ve koku içerir.

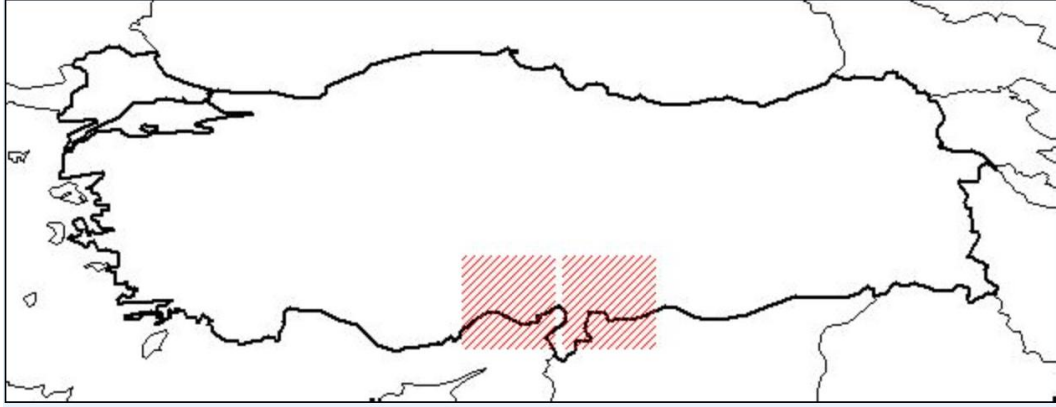
***Herba Ajuga reptans* (Bugle herb);** hazırlanan infüzyon, dekoksion ya da toz haline getirilmiş yaprakları akciğer ve dalağı temizler, sarılık ve romatizmaya karşı kullanılır. Acı, buruk ve aromatik bir tat içerir. En önemli kullanımını akciğer kanamaları ve safra rahatsızlıkları oluşturmaktadır. Orta dercede yatıştırıcı ve tansiyon düşürücüdür (Steinmetz, 1969).

GEREÇLER ve YÖNTEMLER

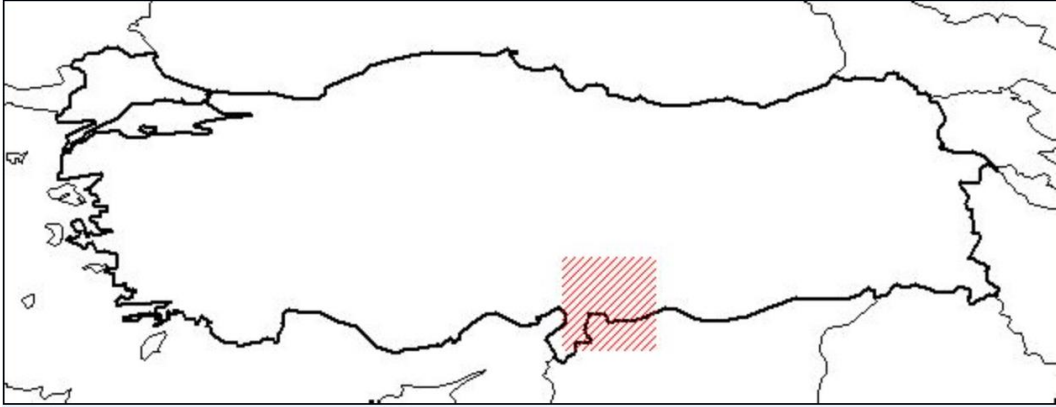
Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Materyal ve Yöntemler

Bitkisel Materyal

Deneysel çalışmalarda kullanılan *A. postii* Briq. İçel: Çamlıyayla, Namrun Kalesi, 1350 m, kayalık 10.07.2015 ve *A. relictta* P.H.Davis Kahramanmaraş: Çimen dağı, Yavşan tepesi, Pekmezpınarı, 1500m, 03.06.2015 tarihlerinde toplanmıştır. *Ajuga postii* ve *A. relictta*'nın Türkiye'deki dağılışları Şekil 1 ve 2'de verilmiştir. Toplanan örnekler preslenerek kurutulmuş olup Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbariyumu (ESSE)'nda saklanmaktadır (ESSE no: 15083 ve 15084).



Şekil 1. *Ajuga postii*'nin Türkiye'deki dağılışı



Şekil 2. *Ajuga relictta*'nın Türkiye'deki dağılışı

Makromorfolojik Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler

Bitki örneklerinin tayini Türkiye Florası kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Davis ve ark., 1965; Davis ve ark., 1985).

Morfolojik incelemeler, taksonların morfolojik karakterleri üzerinden yapılmıştır. Yeterli büyüklükteki bitki kısımları için ölçümlerde cetvel kullanılmıştır. Küçük olan yapılar stereo mikroskop altında milimetrik kağıt ile ölçülmüştür. Ölçümlerde her türe ait en az 10 bitki örneği kullanılarak ölçümlerin ortalaması verilmiştir. Türlerin genel özellikleri ortaya konulmuş olup morfolojik çalışmalarda yaprak, gövde, çiçek durumu, kaliks, korolla, stamen gibi karakterlerin belirlenmesi ve ölçümleri Nikon SMZ645 stereomikroskop altında gerçekleştirilmiştir.

Anatomik Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler

Anatomik çalışmalarda %70 lik alkol içerisinde muhafaza edilen kök, gövde ve yaprak kısımları incelenmiştir. Bunun için Sartur reaktifi kullanılmıştır. Sartur reaktifi bitki yapısı içerisinde bulunan birden fazla elementin aynı anda gözlemlenmesinde kullanılmaktadır. İçerisinde yer alan maddeler ve etkileri şöyledir:

Sudan III, yağ, kütin ve süberini turuncu renge boyar.

Laktik asit, kuvvetli asit özelliği gösterir. Dokuları berraklaştırır.

Anilin, lignin ile asitli ortamda sarı renk verir.

İyot, nişasta ile reaksiyonu sonucu mavi-mor renge boyar.

Sartur reaktifinin hazırlanışı;

Sudan III ile soğukta doyurulmuş laktik asit 45.0 ml

Saf laktik asit 60.0 ml

Saf anilin 2.0 gr

İyot 0.20 gr

Potasyum iyodür 1.0 gr

Etanol 95° 10 ml

Distile su 80 ml

Potasyum iyodür, etanol ve distile su reaktifte yardımcı madde olarak yer alır (Tanker, 2002). Yapılan tüm anatomik incelemelerde el ile kesitler alınmış ve fotoğrafları Zeiss AXIO Lab. A1 ışık mikroskobu ve Axiocam ERc 5s kamera kullanılarak çekilmiştir. Kesitler gliserin jelatin ile daimileştirilerek kapatılmıştır.

Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler

DNA ekstraksiyonu

Bitki örneklerine GE Nucleon PhytoPure Genomic DNA Extraction Kiti (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Belirtilen protokol şu şekilde uygulanmıştır:

- 1) Derin dondurucudan çıkarılan bitki örneğinden 0.1 gram ağırlığında örnek alınarak üzerine sıvı azot döküldü.
- 2) Örnek havanda dövülerek toz haline getirildi. Soğuk ependorf tüpüne aktarıldı.
- 3) 600 µL (mikrolitre) Reagent 1 eklenerek karıştırıldı.
- 4) 200 µL Reagent 2 eklenerek karıştırıldı.
- 5) 65 C° de su banyosunda 10 dakika bekletildi.
- 6) Daha sonra buz üzerinde 20 dakika bekletildi.
- 7) -20 C° de bekletirken üzerine kloroform 500 µl eklendi.
- 8) 100 µL Nucleon Phytopure reagent eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika karıştırıldı.
- 9) 1300 G de 10 dakika santrifüj edildi.
- 10) Supernatant başka bir tübe aktarıldı.
- 11) Üzerine eşit hacimde izopropanol eklendi.
- 12) DNA da çökeltme gerçekleşene kadar ters yüz edilerek karıştırıldı.
- 13) 4000 G de 6-7 dakika santrifüj edildi.
- 14) DNA peleti %70 lik etil alkol ile yıkandı.
- 15) 4000 G de 6-7 dakika tekrar santrifüj edilerek üst kısım atıldı.
- 16) Oluşan pelet ultra saf su ile çözdürüldü.
- 17) DNA varlığı agaroz jel elektroforezi ile gözlemlendi. Daha sonra elde edilen total DNA, dilüsyon işleminden geçirilerek istenilen gen bölgelerinin eldesi için PCR uygulandı.

Dilüsyon hazırlama

Yöntem her iki bitki türü için ayrı ayrı uygulanmıştır.

1/1 dilüsyon = 4 µL DNA + 4 µL (DNA-RNA free su)

1/9 dilüsyon = 1 µL DNA + 9 µL (DNA-RNA free su)

Her bir örnek için;

1/1 dilüsyon

1 µL PCR template	2 µL PCR template
22 µL mix	21 µL mix
1 µL ITS 1	1 µL ITS 1
1 µL ITS 4	1 µL ITS 4
25 µL total reaksiyon	

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR yöntemi internal transcribed spacers (ITS-1 ve ITS-4) bölgelerinin çoğaltılması amacıyla gerçekleştirilmiştir. İstenilen spesifik ITS gen bölgelerinin çoğaltılması için ITS-1 (5'-TTC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') ve ITS-4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3') primer setleri kullanılmıştır.

1. Aşama denaturasyon işlemi Total DNA 94 C° 10 dakika
2. Aşama toplam 35 döngü 94 C° 45 saniye
Bağlanma 57 C° 30 saniye
Uzama 72 C° 2 dakika
3. Aşama son uzama 72 C° 8 dakika şeklinde uygulanmıştır.
Elde edilen ürün +4 C°de saklanmıştır.

PCR uygulaması için %1'lik agaroz jel hazırlama

- 1) 1 gram agaroz tartılıp 100 ml 1XTAE tamponuna konuldu. Mikrodalgada şeffaf hale gelene kadar kaynatıldı.
- 2) Soğuyunca içerisine 5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) eklendi.
- 3) Jel tablası elektroforez tankına dik şekilde (tampona sıvı girmeyecek şekilde) yerleştirildi.
- 4) Uygun tarak seçilerek yuvaya yerleştirildi.
- 5) Jel tablaya döküldü. 15-20 dakika beklendi. Tarak çıkarıldı.
- 6) Üzerine tampon çözeltisi eklendi.
- 7) 1 µL boya parafin üzerinde 5 µL PCR örneği ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi.
- 8) İlk kuyucuğa 5 µL DNA marker yüklendi.
- 9) Elektrotların uçları doğru şekilde yerleştirildi.
- 10) Yaklaşık 100-200V arasında 30 dakika yürütme işlemi uygulandı.
- 11) Görüntüleme ve fotoğraf çekimi UV ışığı altında gerçekleştirildi. Dizi analizi işlemine kadar -20°C'de saklandı.

Dizi analizi

DNA analizi hizmet alımı olarak Refgen Biyoteknoloji Ltd.Şti.'ne yaptırılmıştır. Dizi analizi sonuçları BLAST tanımlayıcı program ile gerçekleştirilmiştir. Elde

edilen veriler ulusal biyoteknoloji merkezi verileri (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ile karşılaştırılarak en yakın eşleşmeler belirlenmiştir.

Fitokimyasal Çalışmalar

Ekstrelerin hazırlanışı

Bitkisel materyallerin kurutulmuş toprak üstü kısımları kaba toz haline getirildikten sonra Soxhlet apareyinde çözücü olarak sırasıyla hekzan, etil asetat ve metanol kullanılarak 8'er saat süreyle ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstralar vakum altında rotavaporda (< 40 °C) yoğunlaştırılmıştır. %70 metanolde 24 saat bekletilen sulu ekstre ile uçucu yağ eldesi için kullanılan su distilasyonu yönteminde balon içerisinde kalan sulu kısım liyofilize edilerek kullanılmıştır. Tüm ekstralar analiz anına kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Miktar Tayini Çalışmaları

Toplam fenolik madde miktar tayini

Çalışma kapsamında elde edilen ekstraların toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edilmiştir. Bütün örnekler ve standart olarak kullanılan gallik asit metanolde çözülmüştür. 50 µL örnek, 4 ml distile su, 250 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ve 750 µL sodyum karbonat çözeltisi (Na₂CO₃) deney tüpünde karıştırılarak 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Çözeltilerin absorbans değerleri 760 nanometre (nm)de spektrofotometrede suya karşı okunmuştur. Toplam fenolik madde miktarı gram ekstrede miligram (mg) gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır. Üç paralel deney yapılarak sonuçlar ortalama değerler olarak verilmiştir.

Toplam flavonoid madde miktar tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonoid miktarları kersetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. 50 µL metanolde hazırlanmış ekstre (10 mg/mL), 50 µL etanolik aluminyum triklorit (20 g/L) ve 1150 µL etanol ile karıştırılmıştır. Çözeltilerin absorbansları 20 °C de 40 dakika bekletildikten sonra 415 nmde ölçülmüştür. Kör çözelti 50 µL ekstre ve 5 µL asetik asitin 1200 µL etanolik çözeltisi olarak hazırlanmıştır. Kersetinin kalibrasyon eğrisi etanolde çözülerek aynı şekilde hazırlanmıştır. Bütün ölçümler üç paralel olarak alınmış ve ortalama sonuçlar kullanılmıştır.

Toplam flavonol madde miktar tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonol miktarları kersetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Kersetinin kalibrasyon eğrisi metanolde çözülerek hazırlanmıştır. 250 µL metanolde hazırlanmış ekstre (10 mg/mL), 250 µL etanolik aluminyum triklorit (20 g/L) ve 750 µL sodyum asetat (50 g/L) ile karıştırılmıştır. Çözeltilerin absorbansları 20 °C de 2.5 saat bekletildikten sonra 440 nmde okunmuştur. Aynı işlemler seyreltik kersetin çözeltileri için yapılmıştır. Kör çözelti 250 µL metanol, 250 µL etanolik aluminyum triklorit ve 750 µL sodyum asetat ile hazırlanmıştır. Sonuçlar üç paralel deneyin ortalaması olarak verilmiştir.

Sıvı kromatografisi/kütle spektrometrisi (LC/MS) ile ekstraların analizi

Çalışılan ekstraların Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (LC/MS) sistemi ile analizleri gerçekleştirilmiştir.

Antioksidan aktivite çalışmaları

1,1-difenil-2-2 pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini

2 mg/25 ml oranında DPPH• metanolde hazırlanmıştır. Mikrotitrasyon petrisinin ilk sırasına her bir numuneden 200 µl, ikinci ve daha sonraki sıralara 100 µl metanol konulmuştur. Seyreltme işlemi uygulanmıştır. Metanol ile karıştırılmış DPPH• eklenmiştir. En son alınan 100 µl atılmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanslar 517 nmde okunmuştur. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır. Değerler üç paralel deneyin ortalaması olarak verilmiştir.

$$\% \text{ inhibisyon} = [(Ab_{Skontrol} - Ab_{Sörnek}) / Ab_{Skontrol}] \times 100$$

ABTS•+ Radikal Süpürücü Etki

Standart TEAC metodu (Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasite) yöntemi, ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikalini süpürülmesi ve vitamin E'nin suda çözünen analogu olan troloks ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır. 7 milimolar (mM) ABTS ve 2.5 mM sodyum persülfat (Na₂S₂O₈) karışımının karanlıkta 12-16 saat bekletilmesi sonucu mavi yeşil renkli radikal oluşumu sağlanmıştır. Çözeltinin 734 nmdeki absorbansı 0,8-0,7 olacak şekilde absölu etanol ile seyreltilmiştir. 10 µL örnek ve 990 µL hazırlanan ABTS^{•+} çözeltisi karıştırılarak, 1 dakikalık aralıklarla 734 nmde absorbansı 30 dakika süre ile ölçülmüştür. Troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesi troloksun kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

β-karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini

Ekstrelerin antioksidan aktivitesi β-karoten soldurma deneyine göre yapılmıştır. 1 ml β-karoten (1 mg/ml kloroform içerisinde) içerisinde 120 mg Linoleik asit ve 1200 mg Tween 20 bulunan balon içerisine ilave edilmiştir. Rotavaporda kloroform uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 10 dakika azot altında yoğunlaştırılmıştır. 300 ml distile su eklenerek 10 dakika karıştırılmıştır. Kontrol ve örneklerin şahitleri β-karotensiz olarak hazırlanmıştır. Tüm numunelerin örnekleri 470 nmde spektrofotometrede ölçülmüştür. Örnekler termal otooksidasyon için 50 °C de 105 dakika su banyosunda bekletilmiştir. β-Karoten'in solma derecesi 15 dakikalık aralıklarla izlenmiştir. Antioksidan aktivite sonucu üç deneyin ortalaması olarak verilmiştir.

$$\text{Antioksidan Aktivite}\% = [1 - (Ab^0_{örnek} - Abs^{105}_{örnek}) / (Ab^0_{kontrol} - Abs^{105}_{kontrol})] \times 100$$

Uçucu Yağ Eldesi

Distilasyon işlemleri

Bitkisel materyallerden uçucu yağ elde edilmesi için laboratuvarında Avrupa Farmakopesinde (8.0) tarif edilen Clevenger apareyinde su distilasyonu işlemi uygulanmıştır.

Su distilasyonu

Laboratuvarında Clevenger apareyinde yapılan su distilasyonu işleminde *A. relict*a herba yaklaşık 100 gr ve *A. postii* yaprak ve çiçek kısımları 35 gr tartılarak 2 litrelik balona doldurulduktan sonra balonun 2/3'ne kadar distile su ilave edilerek 3 saat süreyle distilasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Üç saatin sonunda elde edilen uçucu

yağ alınmıştır. Su distilasyonu işlemi için kullanılan Clevenger apareyi Şekil 3’de gösterilmiştir.



Şekil 3. Clevenger apareyi

Analitik çalışmalar

Gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi sistemi (GK/KS)

Elde edilen uçucu yağların eş zamanlı gaz kromatografisi ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi sistemi ile analizleri yapılmıştır. GK sisteminde kolonda ayrılan bileşikler FID (Alev iyonlaşma dedektörü) dedektör ile tespit edilerek bileşiklerin bağıl yüzdeleri belirlenmiştir. GK/KS sistemine ait kolonda ayrılan bileşiklerin kütle spektrometrisi kısmında tek tek kütle spektrumları alınmıştır. Değerlendirme işlemleri "Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi" nin yanı sıra Wiley GK/KS, Adams ve MassFinder 2.1 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Botanik Çalışmalara Ait Bulgular

A. postii ve *A. relict*a endemik türler (Davis, 1985) olup morfolojik ve anatomik özellikleri belirlenerek fotoğraf çekimleri ile desteklenmiştir. Türlerin çiçeklenme dönemleri, belirtilen tip örneğinin bulunduğu lokalite bilgisi, çalışmamızda bitki örneğinin toplandığı lokalite, habitat özellikleri, yükseklik, endemizm durumu ve bulunduğu fitocoğrafik bölge belirtilmiştir. Bitkilerin morfolojik özellikleri "Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası" kullanılarak ve arazi çalışmaları ile toplanılan bitki örneklerinin incelenmesi ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgular florada belirtilen bilgiler ile karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.

Anatomik özellikler Sartur reaktifi ile hazırlanan preparatlar ile belirlenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

Morfolojik ve Anatomik Özellikler

A. postii Briq. in Bull. Herb. Boiss. 2:710 (1894).

Kuvvetli, çok yıllık, 77-84 cm, kısa odunsu rizomlu. Gövde dar, boylu; dallanma basit ya da üstte dallanmış; tüyler köşelerde piloz. Gövde ve çiçek yaprakları kısa saplı, yapraklar ovat-lanseolat, 3.5-10x1-4 cm, tam ya da düzensiz testere dişli ya da dişli, seyrek, uzun tüylü, taban attenuat, tepe akut. Çiçekler her vertisillastrumda 2 tane, geniş, yaklaşık olarak floral yaprakların yarısı uzunlukta. Kaliks 8-12 mm, parçalı 5 dişli, dişler uzun salgı tüylü ya da tüysüz. Korolla koyu mor-pembe renkli (kuruyunca morumsu), 24-50 mm, üst dudak eksilmiş ya da kaybolmuş, emarjnat; alt dudak túbün 3 katı, resupinat, yoğun tüylü. Stamen sayısı 4, 13-18 mm, filament basit, uzun ve yünsü tüylü. Stilus 22-24 mm, tüysüz, ginobazik değil, ovaryum loplarnın üzerinden çıkar, stigma bifid. Meyve üzüksü, belirgin olmayan 4 loplu, yaklaşık 3-6 mm, etli morumsu-siyah renkli perikarlı (Şekil 4 ve 5).

Tip örneği: C6 Hatay: in montibus Amani, Gavur Dağı et ad Yokoun-Olouk prope Antioch, [1200-1600 m], G. Post (holo. G).

Toplanılan yer: C5 İçel: Çamlıyayla, Namrun Kalesi, 1350m, Kayalık, K 37° 16.8' 54.5'' D 34° 60.1' 16.5'' (ESSE no : 15083).

Çiçeklenme dönemi: Haziran - Temmuz

Habitat: *Fagus* ormanları, *Quercus* makilikleri ve kayalık dağ yamaçları.
Yükseklik: 60-1600 m.

Endemik, Doğu Akdeniz elementi.



Şekil 4. *A. postii*

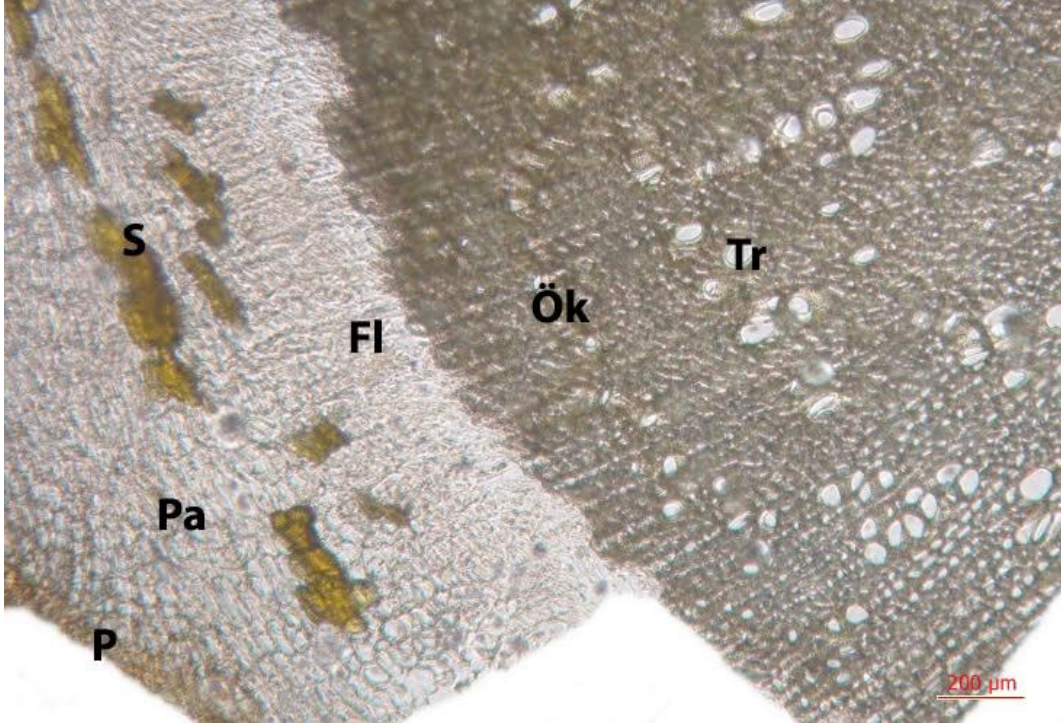


Şekil 5. *A. postii* çiçek

Anatomik Bulgular

A. postii kök anatomik özellikleri

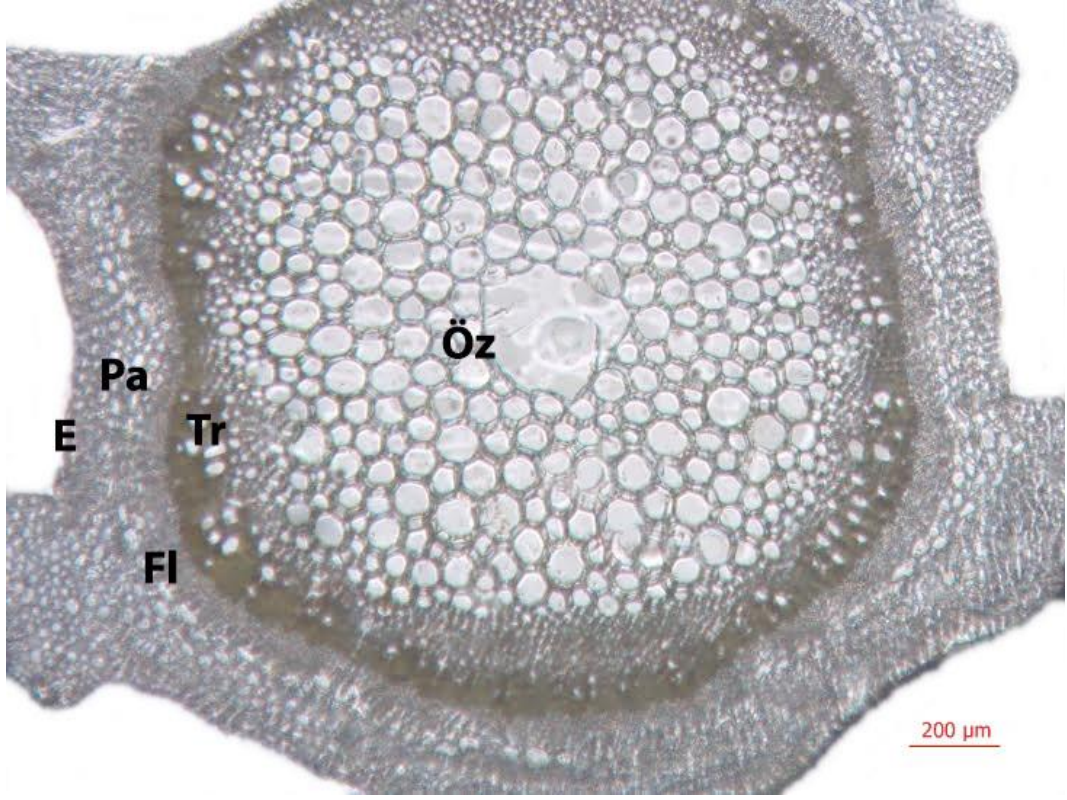
Periderma 2-3 sıralı olup basık hücrelerden oluşmaktadır. Peridermanın altında yer alan çok tabakalı korteks tabakası çokgen ve parenkimatik hücrelerden oluşur. Burada sklerankima hücreleri bulunmaktadır. Floem ve ksilem arasında yer alan kambiyum belirgin değildir. Ksilemin trakeal elementlerini oluşturan trake ve trakeidler geniş bir yer tutmaktadır. Öz bölgesi parenkimatiktir. Sekonder ksilemde bulunan öz kolları 1-2 sıralıdır (Şekil 6).



Şekil. 6. *A. postii* kök anatomik kesiti, P: Periderm, Pa: Parenkima hücresi, S: Sklerankima, Fl: Floem, Ök: Öz kolları, Tr: Trake hücresi

A. postii gövde anatomik özellikleri

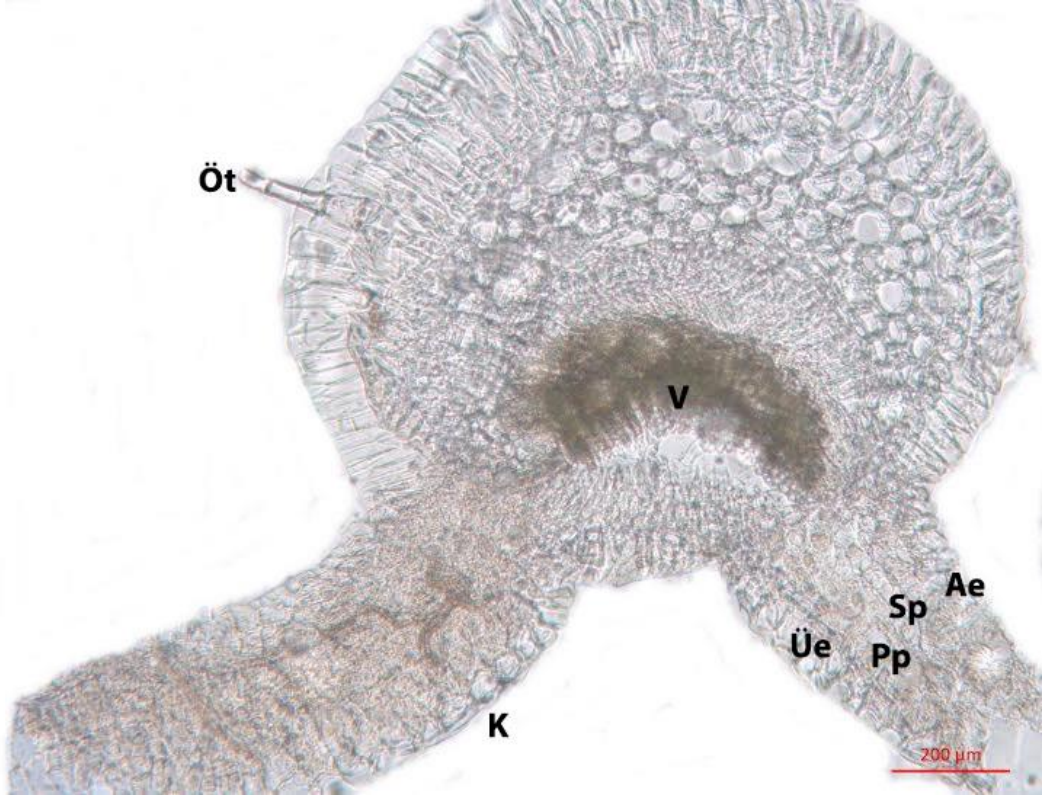
Lamiaceae'nin tipik dört köşeli otsu gövde yapısına sahip olan *A. postii*'nin dış kısmı kutikula tabakası ile kaplıdır. Epiderma tabakası tek sıralı olup köşelerde ve köşeler arası bölgede kollenkima görülmektedir. Korteks oval, parenkimatik hücrelerden oluşur ve dar bir alanı kaplar. Endodermis tabakası belirgin değildir. Floem ve ksilem arasında bulunan kambiyum tabakası belirgin olmayıp floem elemanları sıkı düzenlenmiş bir yapı gösterirken ksilem floeme göre daha geniş bir alanı kaplamakta ve trake ile trakeidler ayırt edilebilmektedir. Öz bölgesi çokgen, büyük, parenkimatik hücrelerden oluşmaktadır (Şekil 7).



Şekil. 7. *A. postii* gövde anatomik kesiti, E: Epidermis, Pa: Parenkima hücresi, Fl: Floem, Tr: Trake hücresi, Öz: Öz

***A. postii* yaprak enine kesit anatomik özellikleri**

Alt ve üst epidermis tek tabakalıdır. Üzeri ince bir kutikula tabakası ile örtülüdür. Epidermis tabakasında örtü tüyüne rastlanmaktadır. Örtü tüyü basit olup 1-4 hücrelidir. Üzeri ince bir kutikula tabakası ile kaplıdır. Palizat parenkiması ve sünger parankiması birbirine benzer hücrelerden oluşmaktadır. Damarın orta kısmında yer alan vasküler sistemde yaprağın alt yüzüne bakan kısmında floem ve üst yüzeyine bakan kısmında ise ksilem elemanları bulunmaktadır (Şekil 8).



Şekil. 8. *A. postii* yaprak enine kesiti, Öt: Örtü tüyü, K: Kutikula, Üe: Üst epidermis, Pp: Palizat parenkiması, Sp: Sünger parenkiması, Ae: Alt epidermis, V: Vaskular sistem

A. relicta P.H.Davis in Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh, 38: 444, 1980.

Çok yıllık bitki, 23-49 cm. Gövde kuvvetli, dik veya yükselici, üst kısımlarda kısa dallı. Yapraklar mızraksı (en azından sürgün koltuklarında), tüysüz, taban yaprakları mızraksı, taban aşağıda daralmış (attenuat), kenarlar tam ya da nadir olarak dişli, tepe akut, tüysüz, 3-4.6x0.9-1.2 cm. Gövde üzerinde yapraklar üçgen şeklinde ve tabanda gövdeyi sarıcı; yapraklar sürgün koltuklarında daha dar, tam ya da nadiren dişli, tepe akut, tüysüz 4-8.5x0.8-3.3 cm, tabanda daralmış ve hemen hemen sapsız. Çiçek durumu uçta, başağa benzer durumda, 3-14 cm, çiçek durumunun ana eksenini uzun-salgı tüylü, vertisillastrum yoğun 6-14 (16) çiçekli, en azından en alttakiler yaprak benzeri brakteler tarafından taşınmakta, üst kısımlardakiler daha kısa. Brakteler lanseolat, taban semi-ampleksikaul, kenar tam, tepe akut, tüysüz, 1.7-5x1-1.2 cm. Kaliks lanseolat 7-11 mm, uzun salgı tüylü, parçalanmış 5 dişli, tepe akut-kuminat, gri lanat-villos tüylü. Korolla 11-19 mm, krem rengi, kuruyunca sarımsı-bej rengi, tüp silindirik şeklinde ve 3 loplu alt dudakın yaklaşık iki katı uzunlukta; üst dudak 1 mm, tabanda iki dişli, gri lanat-villos tüylü. Stamen sayısı 4, filament lanat-villos tüylü, 4-7 mm. Stilus 10-14 mm, ginobazik değil, stigma bifid. Meyve nutlet, retikulat-ruguloz, 1-1.5 mm, koyu sarı renkli (Şekil 9 ve 10).

Tip örneği: C6 Kahramanmaraş: Ahır dağı, 1830 m, 17.07.1907, Haradjian 1573.

Toplanılan yer: C6 Kahramanmaraş: Çimen dağı, Yavşan tepesi, Pekmezpınarı, K 37° 28' 42'' D 36° 42' 21''(ESSE no : 15084).

Çiçeklenme dönemi: Haziran-Temmuz

Yetiştirme ortamı: *Cedrus libani* ve *Abies cilicica*'nın bulunduğu açıklıklarda.

Yükseklik: 1500m.

Endemik, Doğu Akdeniz elementi.



Şekil 9. *A. relictta*

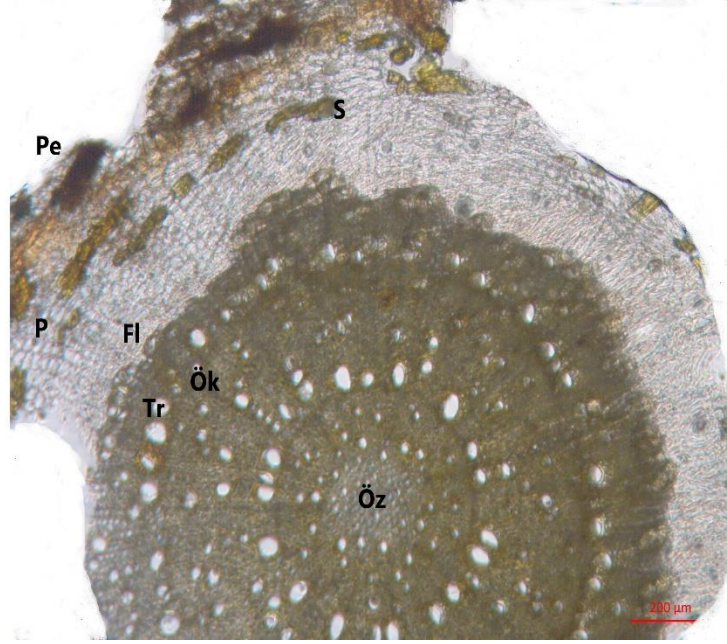


Şekil 10. *A. relictta* çiçek

Anatomik Bulgular

*A. relict*a kök anatomik özellikleri

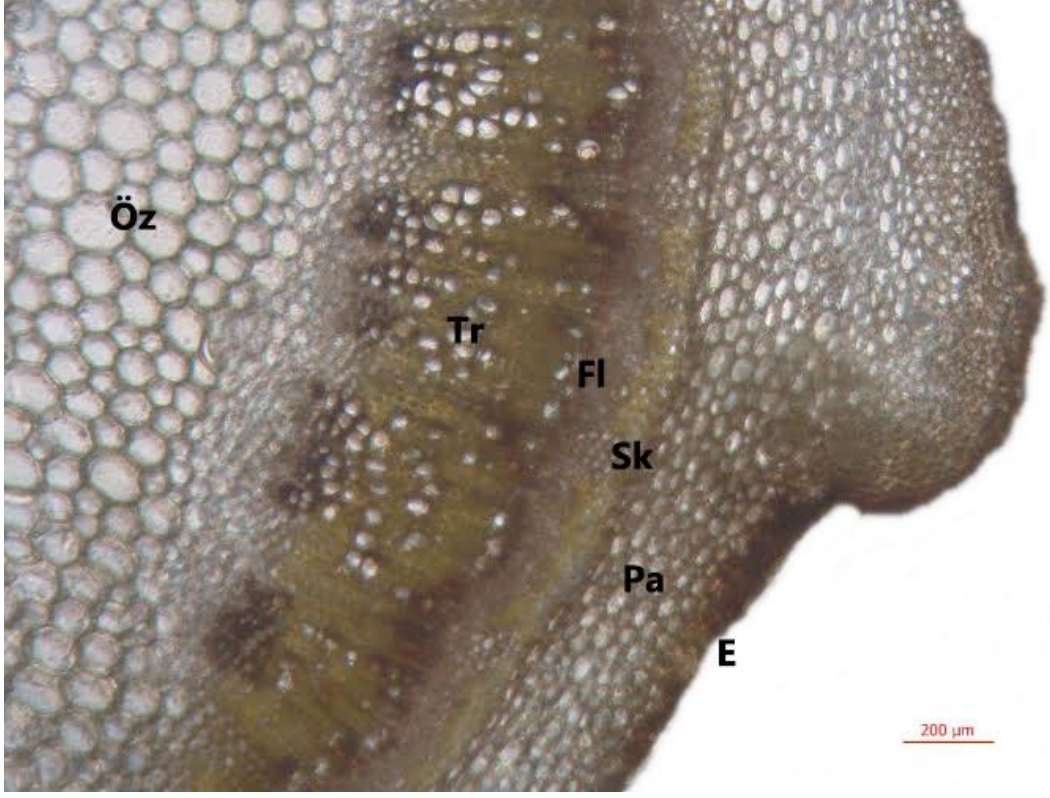
Kökün dış kısmında yer alan peridermanın en dış kısmında parçalanmış hücrelerden oluşan fellogen tabakası bulunmaktadır. Fellogen tabakasının altında ise birkaç sıralı felloderma yer almaktadır. Peridermanın altında yer alan korteks tabakası katmanlı olup oval parenkimatik hücrelerden oluşmaktadır. Burada sklerankima hücreleri göze çarpmaktadır. Floem ve ksilem arasında yer alan kambiyum belirsizdir. Büyüklü, küçüklü trakeal elementlerden oluşan ksilem geniş bir yer tutmaktadır. Ksilem hücreleri öz bölgesine kadar uzanmaktadır. Öz bölgesi belirgin olup sekonder ksilem arasında 1-2 sıralı ışınlar bulunmaktadır (Şekil 11).



Şekil 11. *A. relict*a kök enine kesiti, Pe: Periderm, P: Parenkima hücresi, S: Sklerankima, Fl: Floem, Ök: Özkolları, Tr: Trake hücresi, Öz: Öz

*A. relict*a gövde anatomik özellikleri

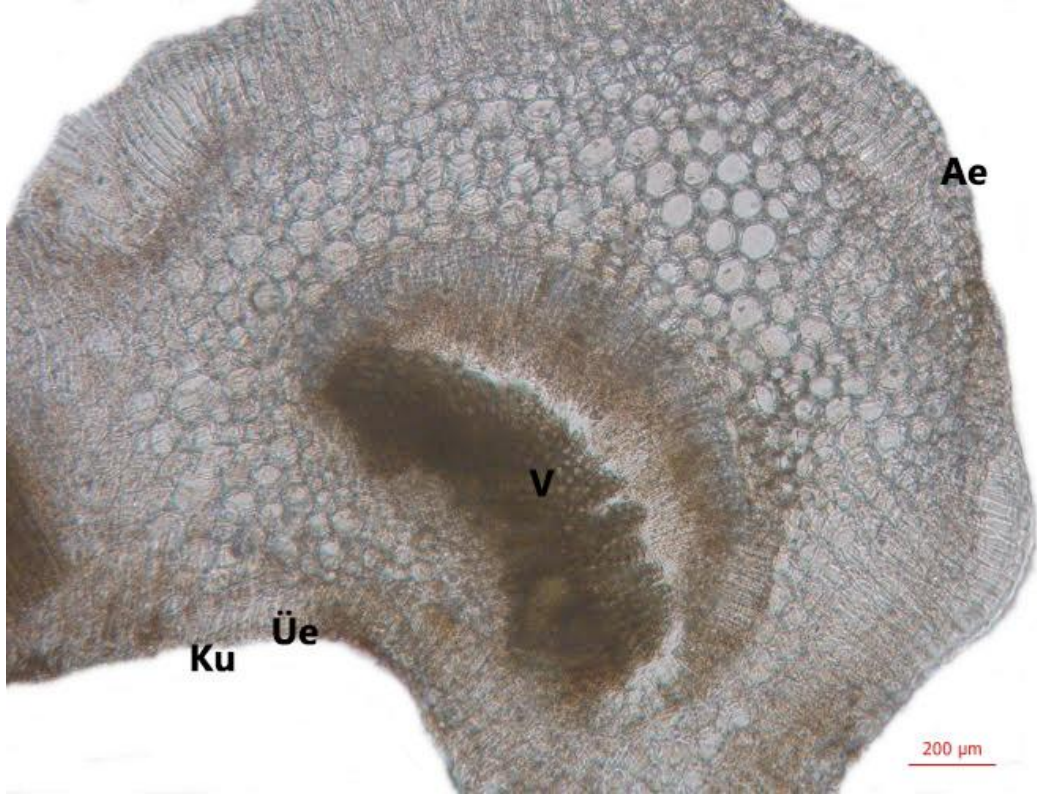
*Ajuga relict*a ve *A. postii* taksonları gövde anatomik kesitlerinde benzer özellikler göstermektedirler. *Ajuga relict*a'nın dört köşeli otsu gövde anatomik kesitinde epiderma tabakası 1-2 sıralı olup üzeri ince bir kutikula tabakası ile kaplıdır. Gövde üzerinde örtü ve salgı tüyü gözlemlenmemiştir. Köşelerde epidermanın altında birkaç sıralı ve köşeler arası bir sıralı düzensiz hücrelerden oluşmuş kollenkima bulunmaktadır. Korteks parenkimatiktir ve kloroplast içerir. Alt kısımda sklerankima hücreleri gözlenmiştir. Kambiyum belirsizdir. İletim demetleri iyi gelişmiştir. Floem şekilsiz, oval hücrelerden oluşmuş olup dar bir alanı kaplar. Ksilem ise yuvarlak, oval, çokgen şekilli elemanlardan oluşmuştur. Öz kolları 1-2 sıralıdır. Öz bölgesi büyük çokgen, yuvarlak şekilli parenkimatik hücrelerden oluşmakta ve geniş bir alanı kaplamaktadır (Şekil 12).



Şekil 12. *A. relictta* gövde anatomik kesiti, E: Epidermis, Pa: Parenkima hücresi, Sk: Sklerenkima, Fl: Floem, Tr: Trake hücresi, Öz: Öz

***A. relictta* yaprak enine kesit anatomik özellikleri**

Epiderma enine kesitte tek sıralı, basık hücrelerden oluşmaktadır. Üzeri ince bir kutikula tabakası ile kaplıdır. İletim demetleri kollateral tip olup demetin etrafı parenkimatik bir kın ile sarılıdır. Ksilem üst epidermaya, floem alt epidermaya bakan yönde yer almaktadır. Orta damar bölgesinde üst ve alt epidermanın altında 1-5 sıralı parenkima hücreleri yer alır. Sklerenkima hücreleri ise ksilemin üstünde ve floemin altında yer almaktadır (Şekil 13).



Şekil 13. *A. relicta* yaprak orta damar enine kesiti, Ku: Kutikula, Üe: Üst epidermis, V:Vaskuler demet, Ae: Alt epidermis

Yapılan morfolojik çalışmalar sonucunda endemik olan *A. postii* ve *A. relicta*'nın sahip olduğu karakterler Türkiye Florası'nda belirtilen özellikler ile karşılaştırmalı olarak **Çizelge 3** ve **4**'de verilmiştir. Burada belirtilen özelliklerin bazıları ilk kez ortaya konulmuştur.

Çizelge 3. *A. postii* morfolojik özellikleri

Karakterler		<i>A. postii</i>	
		Flora of Turkey	Bulgular
Hayat formu		Çok yıllık, kısa ağaçsı rizomlu	Kuvvetli, çok yıllık, kısa odunsu köklü
Bitki boyu		ca 1 m	77-84 cm
	şekli	Dar, boylu	Dar ve boylu
Gövde	dallanma	Basit ya da üstte dallanmış	Basit ya da üstte dallanmış
	tüylülük	Köşelerde uzun tüylü	Köşelerde uzun tüylü
Gövde yaprakları	boyu	1.5-4 X 4-10 cm	3.5-10 X 1-4 cm
	şekli	Ovat- lanceolat	Ovat- lanceolat
	taban	-	Attenuat
	tepe	-	Akut
	kenar	Tam ya da düzensiz testere dişli ya da dişli	Tam ya da düzensiz testere dişli ya da dişli
	tüylülük	Seyrek, uzun tüylü	Yaprak kenarlarında seyrek, uzun tüylü
Çiçek durumu	çiçek sayısı	2	2
Brakte	boyu	1.5-4 X 4-10 cm	3.5-10 X 1-4 cm
	şekli	Ovat- lanceolat	Ovat- lanceolat
	kenar	Tam ya da düzensiz testere dişli ya da dişli	Tam ya da düzensiz testere dişli ya da dişli
	tepe	----	Akut
	tüylülük	Seyrek, uzun tüylü	Kenarlarda tüylü

Kaliks	boyu	8-11 mm	8-12 mm
	dişlerin şekli	---	Lanseolat
	diş sayısı	---	Parçalı 5 dişli
	dişlerin tepesi	---	Akut
	tüylülük	Dişler salgı tüylü	Dişler uzun salgı tüylü ya da tüysüz
Korolla	rengi	Pembe-kuruyunca morumsu	Koyu mor, pembe (kuruyunca morumsu)
	boyu	30-50 mm	24-50 mm
	lopların şekli	Üst dudak kaybolmuş	Üst dudak eksilmiş ya da kaybolmuş, emarjinat, alt dudak túbün 3 katı, resupinat
	lop sayısı	---	Alt dudak 3 loplu
	tüylülük	---	İç kısım uzun, yoğun tüylü
Stamen	sayısı	--	4
	boyu	----	13-18 mm
Filament	tüylülük	---	Basit, uzun, yünsü tüylü
Stilus	boyu	---	22-24 mm
	tüylülük	---	Tüysüz
Stigma	şekli	---	Bifid
Meyve	şekli	Üzümsü, belirgin olmayan 4 loplu	Üzümsü, belirgin olmayan 4 loplu, etli morumsu-siyah renkli perikarplı
	boyu	c. 6mm	c. 3-6 mm

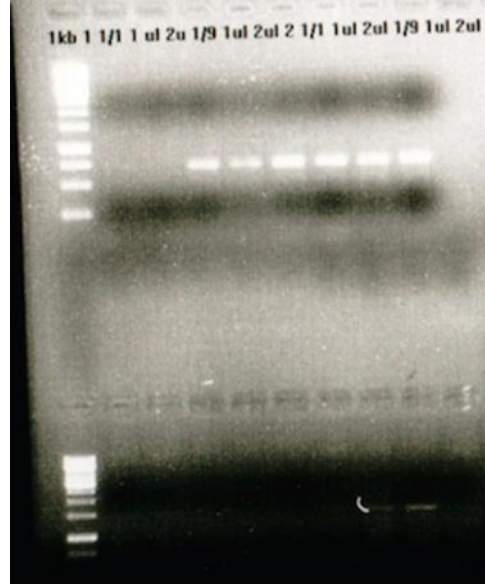
Çizelge 4. *A. relict*a morfolojik özellikleri

Karakterler		<i>A. relict</i> a	
		Flora of Turkey	Bulgular
Hayat formu		Çok yıllık bitki	Çok yıllık bitki
Bitki boyu		30 cm'den fazla	23-49 cm
Gövde	şekli	Dik	Kuvvetli, dik veya yükselici
	dallanma	Üst kısımlarda kısa dallı	Üst kısımlarda kısa dallı
	tüylülük	Tüysüz	Tüysüz
Taban yaprakları	boyu	---	3-4.6x0.9-1.2 cm
	şekli	Mızraksı	Mızraksı
	taban	Attenuat	Attenuat
	kenar	---	Tam ya da nadir olarak dişli
	tepe	---	Akut
	tüylülük	Tüysüz	Tüysüz
Gövde yaprakları	boyu	2.5-5 cm	4-8.5x0.8-3.3 cm
	şekli	Lanseolat	Lanseolat-dentat
	taban	Ampleksikaul	Ampleksikaul
	tepe	---	Akut
	kenar	---	Tam ya da seyrek dişli
	tüylülük	Tüysüz	Tüysüz
Vertisillastrum	çiçek sayısı	Yoğun 6-12 çiçekli	6-14 (16) çiçekli
	boyu	---	3-14 cm
	boyu	---	1.7-5x1-1.2 cm
	şekli	---	Lanseolat

Brakte	kenar	---	Tam
	tepe	---	Akut
	taban	---	Semi-ampleksikaul
	tüylülük	---	Tüysüz
Kaliks	boyu	8-11 mm	7-11 mm
	dişlerin şekli	Lanseolat	Lanseolat
	diş sayısı	---	5
	dişlerin tepesi	---	Akut-kuminat
	tüylülük	---	Gri lanat-villos
Korolla	rengi	---	Krem rengi, kuruyunca sarımsı-bej
	boyu	c. 16 mm	11-19 mm
	lop sayısı	Alt dudak 3 loplu	Alt dudak 3 loplu, üst dudak (2dişli) indirgenmiş
	tüylülük	---	Gri lanat-villos
Stamen	sayısı	---	4
Filament	boyu	---	4-7 mm
	tüylülük	---	Lanat-villos
Stilus	boyu	---	10-14 mm
	tüylülük	---	Tüysüz
Stigma	şekli	---	Bifid
Nutlet	şekli	Retikulat-ruguloz	Retikulat-ruguloz
	boyu	3.2-1.5 mm	1-1.5 mm

Moleküler Çalışmalara Ait Bulgular

Yapılan PCR sonrası elde edilen ürünün agaroz jel üzerindeki görüntüleri **Şekil 14**'de verilmiştir. Örneklerin kodlamaları; 1) *A. relictæ* 1/1: Dilüsyon oranı, 1 µl: 1 µl PCR ürünü içeren örnek, 2 µl: 2 µl PCR ürünü içeren örnek, 1/9: Dilüsyon oranı, 1 µl: 1 µl PCR ürünü içeren örnek, 2 µl: 2 µl PCR ürünü içeren örnek; 2) *A. postii* 1/1: Dilüsyon oranı, 1 µl: 1 µl PCR ürünü içeren örnek, 2 µl: 2 µl PCR ürünü içeren örnek, 1/9: Dilüsyon oranı, 1 µl: 1 µl PCR ürünü içeren örnek, 2 µl: 2 µl PCR ürünü içeren örnek şeklinde verilmiştir.



Şekil 14. PCR sonrası elde edilen ürünün agaroz jel üzerindeki görüntüsü

Dizi analizleri sonrası elde edilen veriler;

A. postii: ITS 4 dizi uzunluğu 583(790) ve baz dizilimi:

```
GGGTCTTGTTCTTTTGTTCCTCCCGCACAGACGACGTCTCGACAGCACGC
GAGTTGAAGATCAACCACCACTGGTCGCGACGTGCATCGCCGGGGGA
ACACATTTGGACCGGCCGACGCCGGGGCGCACGGGAGGCCATTCTCC
GCCCCACACCAGCACCGGGGCGCTAGAATGGGGGGCGACGCGATGC
GTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTGACGGCTTCGGGCGCAAC
TTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAA
GTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCC
GTTGCCGAGAGTCGTTTTGGTATTACGACAGACGTCTACCCCCGACA
CAGTCCGCAAACGGGGCGGCAGGGGCGGACAATCCTTTGAGTTTTCTT
TGCGCATTCGCGCCCCGAGTTTGTAGCCCAAGCGGCACGCGCGTGT
GCCCCGCGCCGATAGGGGGTTTGGGGCGACAACCGAGGCTGCCGGTCC
CAATTTTGTAAACACGTGTTTCGACGTCTGCTTTCAGGTTTCGACAAT
GATCCTTCC
```

*A. relict*a: ITS 4 dizi uzunluğu 625(790) ve baz dizilimi:

GGGTCGCGGTTCGGAGGCACAATGCAATCGCATGCACCCTTTGGGTCTT
GTGTTTGTTCACACGGACAACGCCTCTAATCCCGACAGCACGCGA
GTTGATGATCAACCACCACTGGTCGCGACGTGCGTCCGGGGGAACG
TATTAGACCAGCCGCACACTGTGGCGTACGGGAGGCCATTCTCCGCC
CCCCACACGAGCACCGAAGTGCTGGAGGGGGGCGACGCGATGCGTGA
CGCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTGACGGCTTCGGGCGCAACTTGC
GTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTAT
CGCATTTCTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTG
CCGAGAGTCGTTTTAGTATTACGACAGGCGTCCATCCCCGACACAAT
CCGCAAACGGGGTGGCGAGGGTGGACAATCCTTTGAGTTTTCTTGGC
GCATTCGCGCCCCGAGTTTGTAGCCCGAGTGGCACGAGCGCAAGCGC
CCGACCGACGGGGATCGGAGAGGCAGCCGAAGCTGCCACCCAATA
TGGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTGCCTTGCAGGTCTCGACAATGATC
CTT

şeklindedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada iki taksonun sahip oldukları ITS 4 gen bölgelerine göre yakın akraba türler **Çizelge 5**'de verilmiştir.

Çizelge 5. En yakın akraba tür ve benzerlik oranı

Bitki Türü	Elde Edilen Dizi Uzunluğu	Eşleşen Baz Sayısı	Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı	Benzerlik Oranı
<i>A. postii</i>	583 (790)	506/552	<i>A. reptans</i> gb JN575347.1	%92
<i>A. relict</i> a	625 (790)	592/625	<i>A. reptans</i> gb JN575347.1	%95

Miktar Tayini Çalışmalarına Ait Bulgular

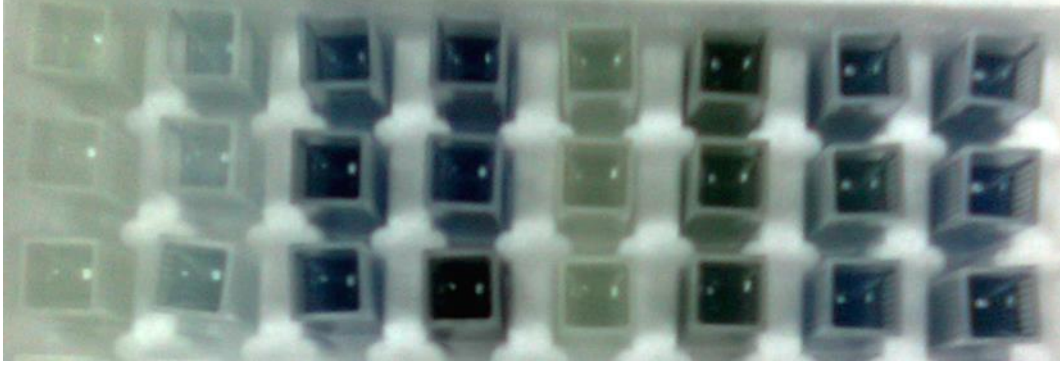
Toplam Fenolik Madde Miktarı

Ajuga postii ve *A. relictta* türlerine ait ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak gallik asit üzerinden hesaplanmıştır. Sonuçlar ve ekstrelerin kuru baz üzerinden % verimleri **Çizelge 6**'da verilmiştir.

Çizelge 6. *Ajuga* ekstrelerinin % verimleri ve 1 gr ekstrede mg gallik asite eşdeğer toplam fenolik madde miktarları

Ekstreler	Ekstraksiyon Verimi (%)	Toplam Fenolik Madde Miktarları
ES1A (<i>A. relictta</i> hekzan)	3,066	5,9
ES1B (<i>A. relictta</i> etil asetat)	13,63	9,7
ES1C (<i>A. relictta</i> metanol)	2,2	34,6
ES2A (<i>A. relictta</i> %70 metanol)	2,8	38,9
ES3A (<i>A. postii</i> hekzan)	1,76	12,5
ES3B (<i>A. postii</i> etil asetat)	1,56	33,4
ES3C (<i>A. postii</i> metanol)	7,8	36,5
ES3D (<i>A. postii</i> %70 metanol)	7,6	38,3
BE678D (<i>A. relictta</i> uçucu yağ balon altı suyu)	14,58	41,7
ES3E (<i>A. postii</i> uçucu yağ balon altı suyu)	31,25	42

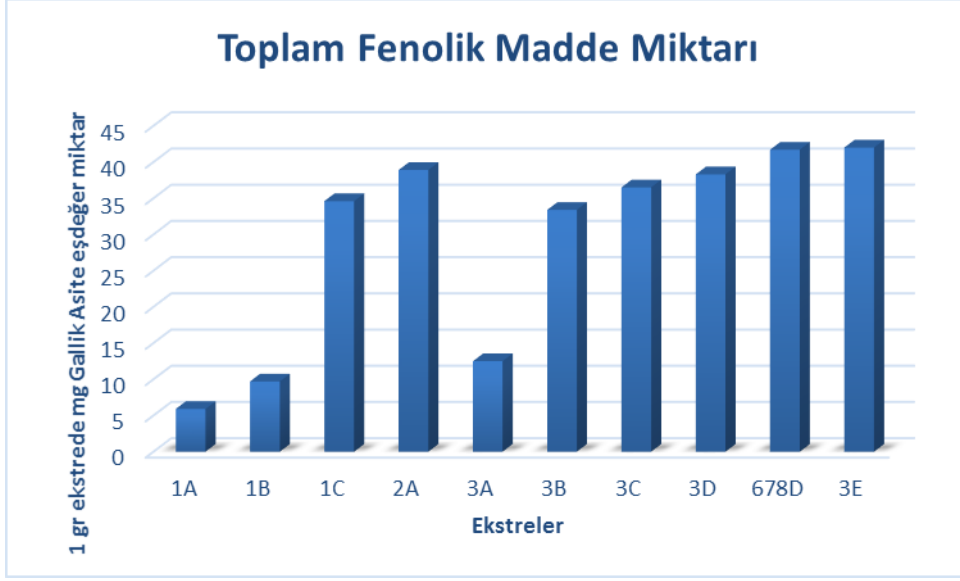
Toplam fenolik madde miktar tayini deneyinde örneklerin spektrofotometrik okuma öncesi kolorimetrik görünüşleri **Şekil 15**'de verilmiştir.



Şekil 15. Toplam fenolik madde miktar tayini deneyinde ekstrelerin kolorimetrik görünüşleri

Çalışılan *Ajuga* türlerinden elde edilen ekstrelerin çözünen madde miktarları kuru ağırlık üzerinden % verim olarak hesaplanmıştır. Elde edilen ekstrelerin verimleri % 1,56 (*A. postii* etil asetat) ile % 31,25 (*A. postii* uçucu yağ balon altı suyu) arasında değişmektedir. Elde edilen ekstrelerin verimleri ES3B (*A. postii* etil asetat) < ES3A (*A. postii* hekzan) < ES1C (*A. relictta* metanol) < ES2A (*A. relictta* %70 metanol) < ES1A (*A. relictta* hekzan) < ES3D (*A. postii* %70 metanol) < ES3C (*A. postii* metanol) < ES1B (*A. relictta* etil asetat) < BE678D (*A. relictta* uçucu yağ balon altı suyu) < ES3E (*A. postii* uçucu yağ balon altı suyu) şeklinde sıralanmaktadır. Ekstre verimlerinden anlaşılacağı üzere en yüksek verim oranları çalışılan taksonlara ait uçucu yağ balon altı sularından elde edilmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda ekstrelerin içerdikleri toplam fenolik madde miktarları gram ekstrede mg gallik asite eşdeğer olarak belirlenmiştir. Ekstrelerin sıralaması ES1A (*A. relictta* hekzan) < ES1B (*A. relictta* etil asetat) < ES3A (*A. postii* hekzan) < ES3B (*A. postii* etil asetat) < ES1C (*A. relictta* metanol) < ES3C (*A. postii* metanol) < ES3D (*A. postii* %70 metanol) < ES2A (*A. relictta* %70 metanol) < BE678D (*A. relictta* uçucu yağ balon altı suyu) < ES3E (*A. postii* uçucu yağ balon altı suyu) şeklindedir. En yüksek toplam fenolik madde miktarları ekstre verimleri ile benzer olarak her iki bitkiye ait uçucu yağ balon altı sularında tespit edilmiştir (**Şekil 16**).



Şekil 16. *Ajuga* ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarları

Toplam Flavanoid Madde Miktarı

Ajuga reptans ve *A. reptans* türlerine ait ekstrelerin toplam flavanoid madde miktarları kersetin üzerinden hesaplanmıştır. Sonuçlar **Çizelge 7**'de verilmiştir.

Çizelge 7. *Ajuga* ekstrelerinin 1 gr ekstrede mg kersetine eşdeğer toplam flavanoid madde miktarları

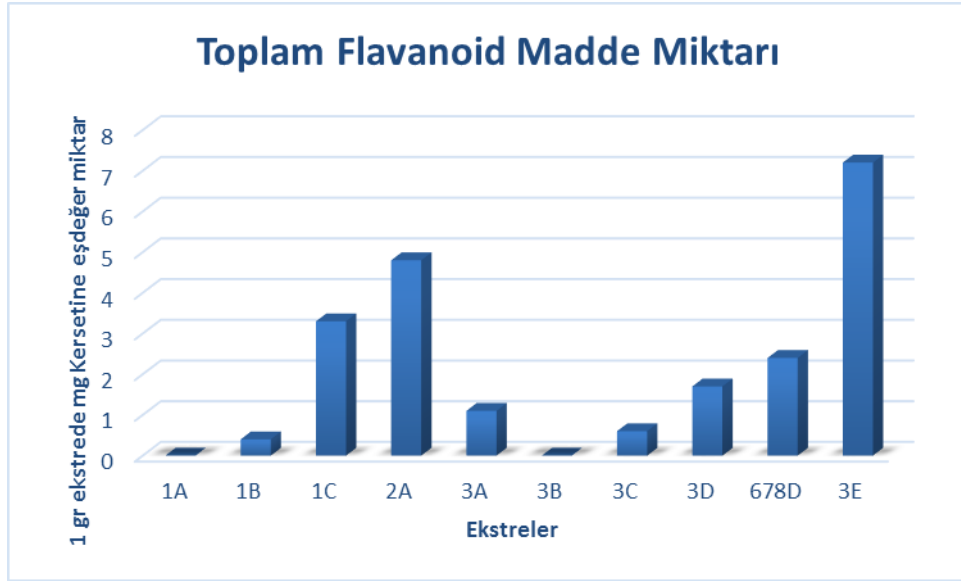
Ekstreler	Toplam Flavanoid Madde Miktarları
ES1A	0
ES1B	0,4
ES1C	3,3
ES2A	4,8
ES3A	1,1
ES3B	0
ES3C	0,6
ES3D	1,7
BE678D	2,4
ES3E	7,2

Toplam flavanoid madde miktar tayininde örneklerin spektrofotometrik okuma öncesi kolorimetrik görünüşleri **Şekil 17**'de verilmiştir.



Şekil 17. Toplam flavanoid madde miktar tayini deneyinde ekstrelerin kolorimetrik görünüşleri

Çalışılan *Ajuga* türlerinde toplam flavanoid madde miktarları gram ekstrede mg kersetine eşdeğer olarak belirlenmiştir. Çalışılan örneklerin toplam flavanoid madde miktarları sırasıyla $1A = 3B < 1B < 3C < 3A < 3D < BE678D < 1C < 2A < 3E$ şeklinde belirlenmiştir (**Şekil 18**).



Şekil 18. *Ajuga* ekstrelerinin toplam flavanoid madde miktarları

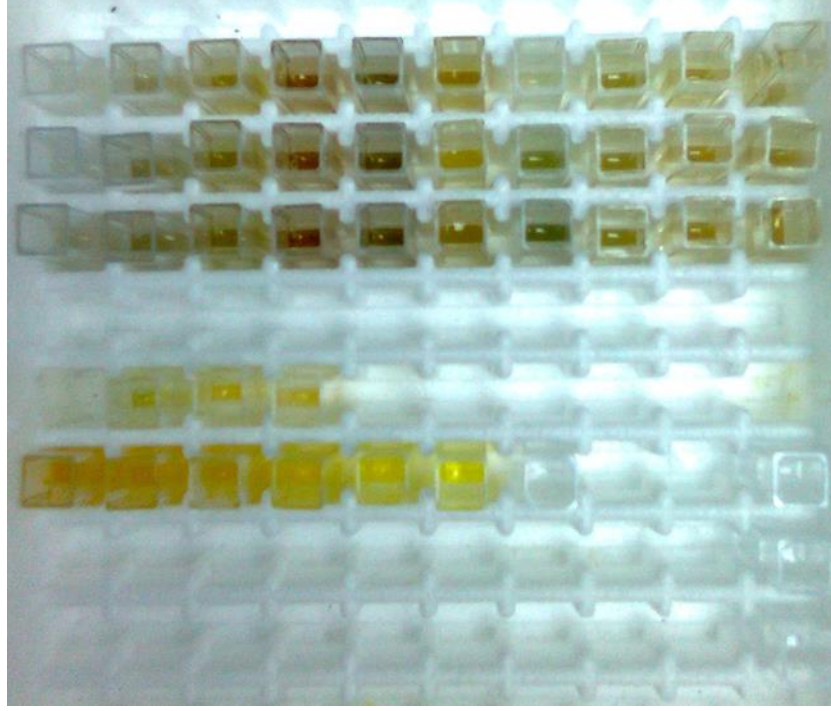
Toplam Flavanol Madde Miktarı

Ajuga reptans ve *A. relicta* türlerine ait ekstrelerin toplam flavanol madde miktarları kersetin üzerinden hesaplanmıştır. Sonuçlar **Çizelge 8'** de verilmiştir.

Çizelge 8. *Ajuga* ekstrelerinin 1 gr ekstrede mg kersetine eşdeğer toplam flavanol madde miktarları

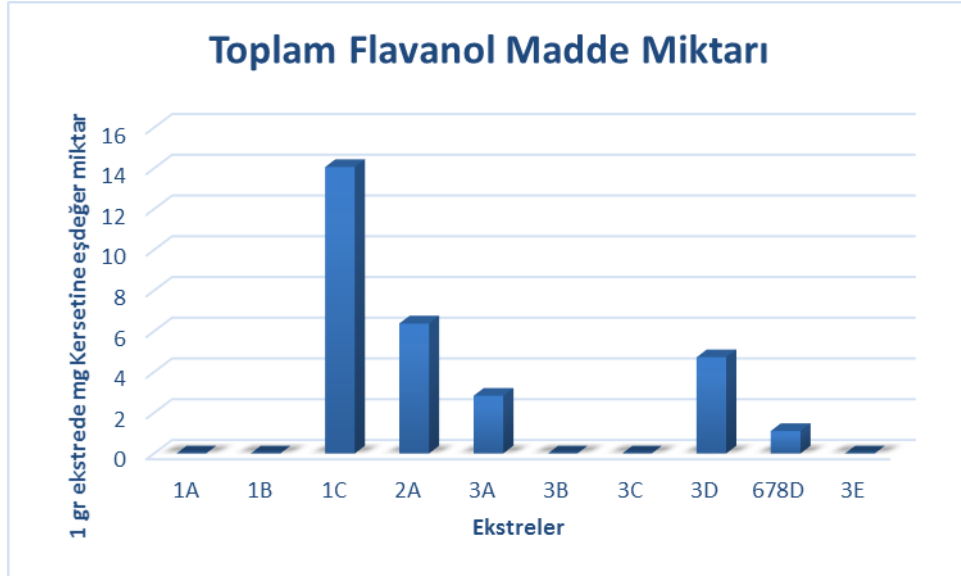
Ekstreler	Toplam Flavanol Madde Miktarları
ES1A	0
ES1B	0
ES1C	14,06
ES2A	6,38
ES3A	2,83
ES3B	0
ES3C	0
ES3D	4,72
BE678D	1,1
ES3E	0

Toplam flavanol madde miktar tayininde örneklerin spektrofotometrik okuma öncesi kolorimetrik görünüşleri **Şekil 19**'da verilmiştir.



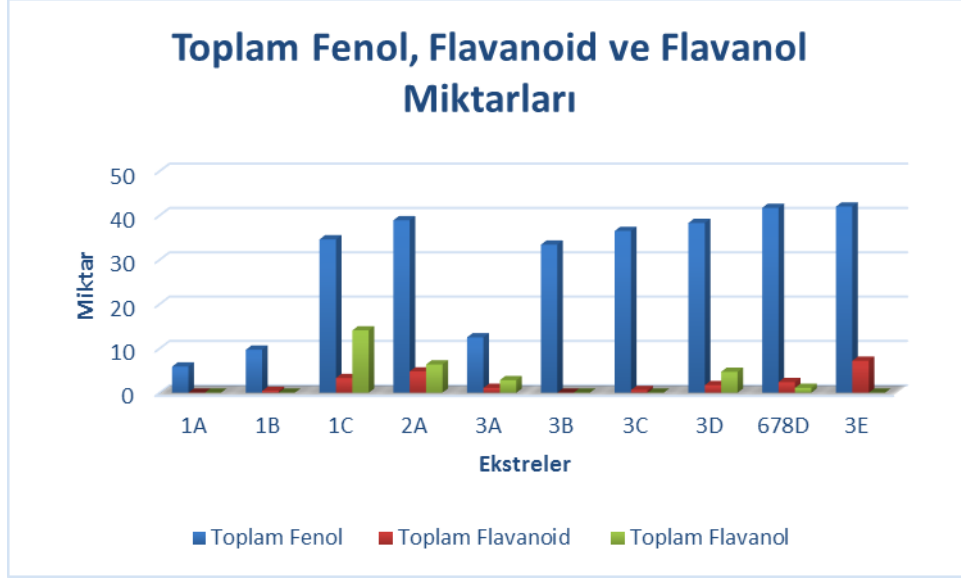
Şekil 19. Toplam flavanol madde miktar tayini deneyinde ekstrelerin kolorimetrik görünüşleri

Çalışılan *Ajuga* türlerinde toplam flavanol madde miktarları gram ekstrede mg kersetine eşdeğer olarak belirlenmiştir. Çalışılan örneklerin toplam flavanol madde miktarları sırasıyla $1A = 1B = 3B = 3C = 3E < BE678D < 3A < 3D < 2A < 1C$ şeklinde belirlenmiştir (**Şekil 20**).



Şekil 20. *Ajuga* ekstrelerinin toplam flavanol madde miktarları

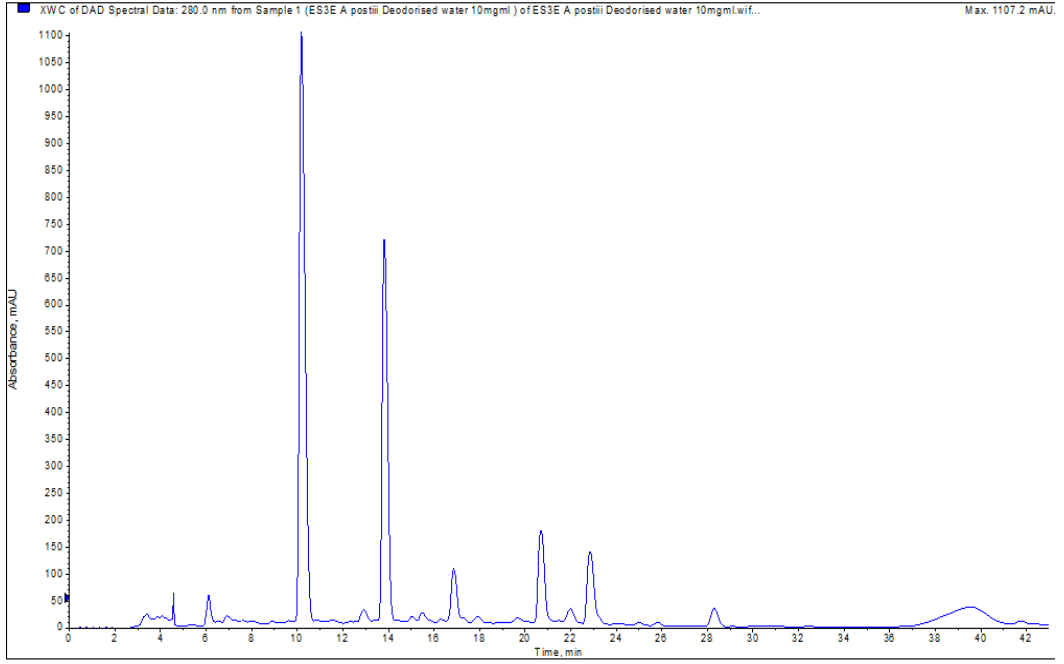
Çalışılan *Ajuga* taksonlarına ait ekstrelerde tespit edilen toplam fenol, flavanoid ve flavanol madde miktarları **Şekil 21**'de gösterilmektedir.



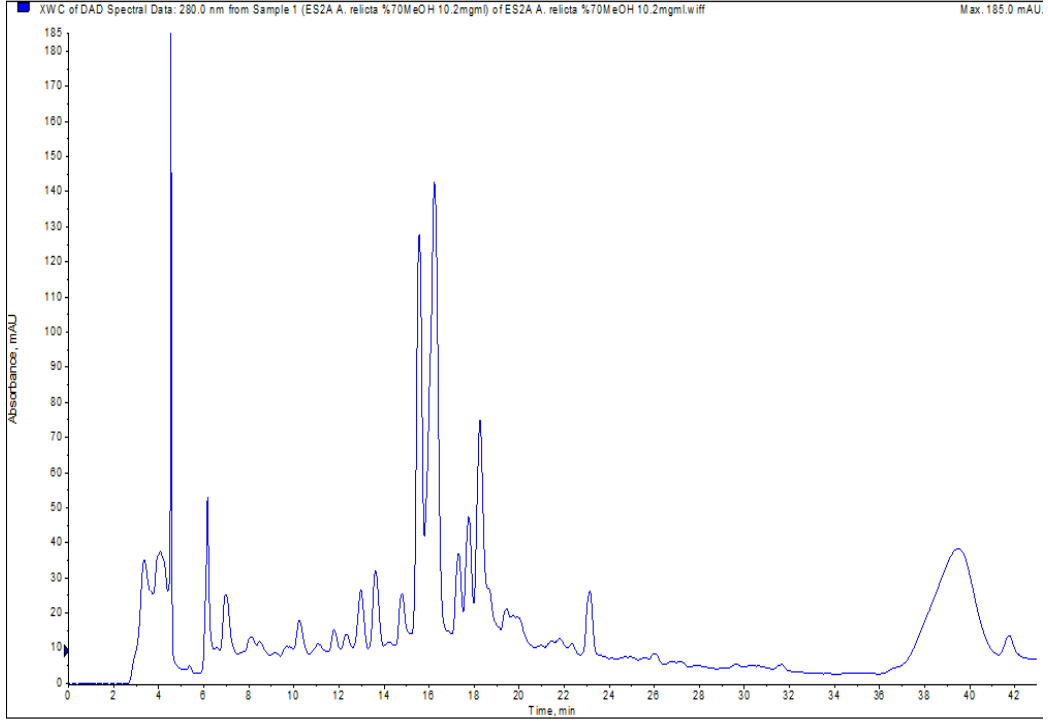
Şekil 21. *Ajuga* ekstrelerinin toplam fenol, flavanoid ve flavanol madde miktarları

Ekstrelerin Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi

Ekstrelerin içerdikleri bileşiklerin belirlenmesi amacıyla LC/MS analizleri gerçekleştirilmiştir. Ölçümler sonucunda elde edilen *A. postii*'ye ve *A. relict*a'ya ait iyon kromatogramları **Şekil 22** ve **Şekil 23**'de verilmiştir. Analizler sonucunda elde edilen pikler, MS değerleri, maddelerin bulunduğu ekstreler ve tanımlanan maddeler **Çizelge 9** ve **10**'da verilmiştir.



Şekil 22. *A. postii* ekstralarının LC/MS analizi sonucu alınan iyon kromatogramı



Şekil 23. *A. relicta* ekstralarının LC/MS analizi sonucu alınan iyon kromatogramı

Çizelge 9. A. *postii* ekstrelerinin LC/MS analiz sonuçları

Madde	Rt	M-H	Parçalamaları	Ekstreler	Tanımlama
1	7.53	393	347 , 185, 167, 141, 123	3D, 3C, 3B	
2	10.36	651	489, 325 , 179, 163, 119	3E	
3	10.45	325	179, 163 , 119	3D, 3C, 3B	Kafeoil glikoz
4	10.72	491	447, 429, 389 , 347, 329, 185	3D, 3C	
5	11.16	475	329, 311	3D, 3C	
6	11.42	489	445, 427, 387 , 327, 165, 125	3D, 3C	
7	12.96	655	327 , 165, 147, 121	3E, 3D, 3C	
8	13.97	651	325 , 445, 427, 239, 163, 119	3E, 3D, 3C, 3B	
9	14.43	433	387, 207	3C, 3B	
10	15.15	785	623 , 461, 315, 179, 161, 135	3D, 3C	Forsytoside A+ glikoz
11	15.65	533	473, 443, 413, 383, 353	3E, 3D	
12	15.65	519	357, 339, 313, 269, 241, 226	3E	
13	16.15	435	389 , 329, 221, 179	3E, 3D, 3C, 3B	
14	16.32	623	461, 315, 297, 179, 161 , 135	3D, 3C	Forsytoside A
15	17.04	681	547, 351 , 329, 315, 333	3E, 3D	3'-O-Methylhypolaetin 7-O-[6''O-acetyl]-allosyl(1 2)glucoside
16	17.04	377	359, 253, 191 , 185, 173, 147, 129	3E	
17	17.13	519	414, 359, 340, 295, 249, 205, 179	3E, 3D	

18	17.37	525	479 , 461, 443, 319, 301, 159	3E, 3D, 3C, 3B	
19	17.55	651	489, 471 , 445, 327, 309, 283, 211, 163	3D	
20	18.17	799	637, 623 , 605, 469, 461, 443, 315, 193, 175	3D	Castonoside A
21	19.80	539	493 , 319, 301, 173 , 475	3E, 3D, 3C, 3B	
22	20.80	843	513 , 351, 337, 329, 179, 135	3E, 3D	
23	22.05	477	431, 371, 161, 149	3B	
24	22.10	505	329 , 313, 298, 271	3E, 3D	
25	22.88	421/ 467	289, 233, 211, 161, 149, 131, 113	3C, 3B	
26	23.03	857	663, 527 , 369, 333, 329, 193, 163	3E, 3D, 3C	
27	23.3	651	475, 193, 175, 133	3C	
28	24.13	543	319, 273, 229, 203	3D	
29	27.8	209	153	3D, 3C	
30	28.75	581	462, 341, 316, 299, 273, 145, 119	3C, 3B	(N1,N5, N10-Trip-(E,E,E)coumaroylspermidine
31	30.87	327	309, 291, 229 , 211	3E, 3D, 3C, 3B	
32	32.13	635	473, 327	3B	
33	32.7	329	314 , 299, 271, 229, 211	3D, 3C	Jaceosidine

Çizelge 10. *A. relict*a ekstralarının LC/MS analiz sonuçları

Madde	Rt	M-H	Parçalamaları	Ekstreler	Tanımlama
1	6.28	363	345, 319, 249, 201 , 183, 165	678D, 2A, 1C, 1B	
2	6.90	375	315, 213, 195, 169, 151	1C	
3	7.36	393	375, 347 , 185, 167, 141, 123	2A, 1C, 1B	
4	8.46	453	407, 347, 179, 161	1C	
5	10.30	293	173, 131	2A	
6	10.57	405/ 441	363, 345 , 327, 309, 165	678D, 2A, 1C, 1B	
7	11.07	293	173, 131	2A, 1C	
8	11.13	475	329, 311	1C, 1B	
9	11.17	497	341, 335, 291, 179, 135	2A, 1C	
10	11.94	481	319 , 163, 361	678D, 2A, 1C	
11	13.24	563	473, 443, 353 , 383, 503	678D, 2A	
12	13.24	639	505, 415, 343, 337, 301	678D, 2A	
13	13.43	437	391, 331, 179	1B	
14	13.86	335	179 , 161, 135	678D, 2A, 1C, 1B	
15	14.98	623	489, 337, 327, 285	678D	
16	15.57	755	623, 593, 461, 315, 179, 161, 135	2A	Forsythoside B
17	15.80	623	489, 337, 327, 285	678D, 2A	
18	16.05	435	389, 329, 179, 161, 149, 123	2A, 1C, 1B	
19	16.14	593	429, 285 , 447	678D, 2A, 1C	
20	16.23	785	623, 499 , 337, 323, 285, 203, 161	2A, 1C	
21	16.30	497	335, 161	678D	

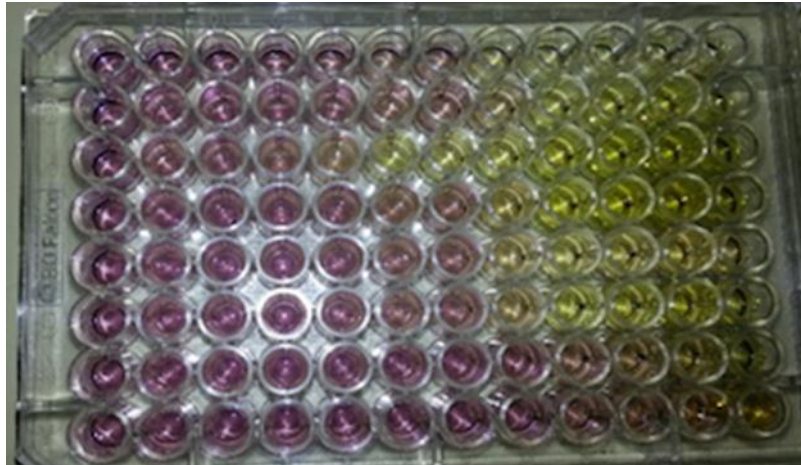
22	16.56	623	461, 285, 161	678D, 2A, 1C	
23	16.6	131	113	2A, 1C	
24	16.63	607	473, 321, 285	678D, 2A, 1C	
25	17.4	447	285, 266, 255, 199	2A, 1C, 1B	Luteolin glikozit
26	17.96	799	623 , 513, 461, 337, 285, 193	2A	
27	17.98	623	461, 315, 297, 285, 179, 161, 135	2A, 1C	
28	18.52	461	285, 175, 113, 327, 357, 369	678D, 2A, 1C	Luteolin glucuronide
29	18.60	769	623, 499, 483, 325, 285	2A	
30	18.77	583	451, 421 , 221, 161	2A, 1C	
31	18.78	635	593, 471, 285	2A	
32	18.94	319	201, 163, 155, 137, 119	1B	Kumarik asit +156
33	19.05	657	495 , 465, 303	2A	
34	19.64	637	461, 315, 297, 285, 193, 175	2A, 1B	
35	19.79	461	285, 179, 161, 133	2A, 1C, 1B	Luteolin glikolide
36	19.90	591	529, 489, 447, 321, 285, 269	2A	
37	20.01	769	623, 461, 179, 161	2A	
38	20.54	431	269, 240	2A	Apigenin glikoside
39	21.10	565	519, 501	2A, 1C, 1B	
40	21.11	451	289, 161	2A	
41	21.30	609	447	2A	
42	21.32	813	637, 193, 175, 159	2A	

43	22.44	131	113	678D, 2A	
44	23.13	651	505, 475, 327, 193, 175	2A, 1C, 1B	
45	23.50	131	113, 119	2A, 1C	
46	25.61	489	391, 327, 309, 291	1C	
47	25.68	375	195	1C	
48	27.35	509	491, 481, 347, 267	2A, 1C, 1B	
49	30.99	327	309, 291, 229	678D, 2A, 1C, 1B	
50	31.28	269	205	678D	
51	33.00	329	311, 293, 229, 211	678D, 2A, 1C, 1B	

Antioksidan Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

Serbest radikal süpürücü etki

DPPH• maksimum absorbandsını 517 nmde gösteren istikrarlı bir serbest radikal olup antioksidan maddeler ile karşılaştığında serbest radikaller süpürülür ve emilimleri azalır (Mansour ve ark., 2013). *Ajuga* türlerinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstralarının radikal süpürücü etkileri DPPH• serbest radikali üzerinden belirlenmiştir. Deneysel çalışmalarda elde edilen kolorimetrik sonuçlar **Şekil 24**'de gösterilmiştir.



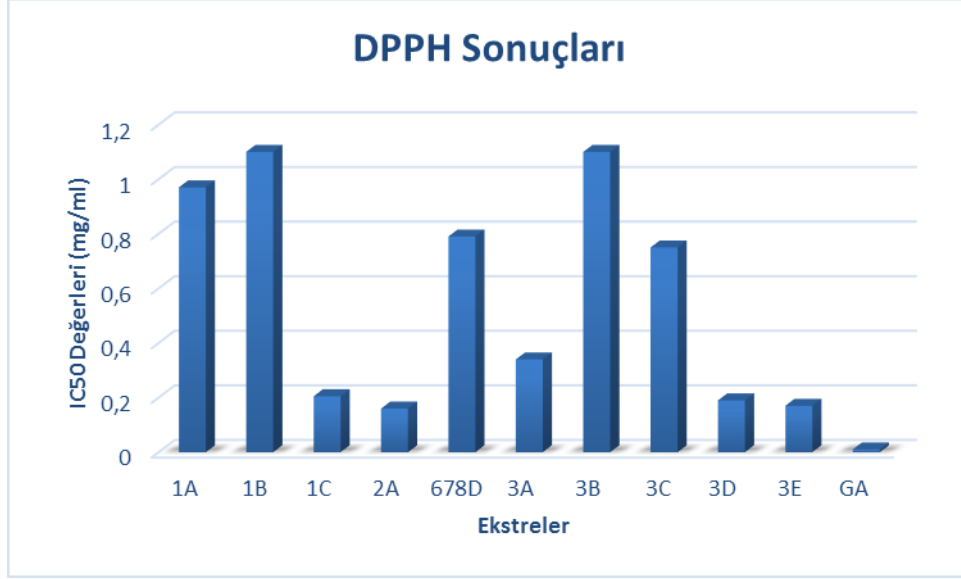
Şekil 24. DPPH• deneyinde ekstraların kolorimetrik görünüşleri

Sonuçlar test edilen konsantrasyonlarda IC₅₀ değeri olarak verilmiştir ve standart antioksidan gallik asitin değerleriyle karşılaştırılmıştır. Örneklerin serbest radikal süpürücü etkileri **Çizelge 11**'de verilmiştir.

Çizelge 11. *Ajuga* ekstrelerinin DPPH• serbest radikali üzerinden tayin edilmiş inhibisyon değerleri

Ekstreler	IC₅₀ Değerleri (mg/ml)
ES1A	0,97
ES1B	> 1 mg/ml
ES1C	0,205
ES2A	0,16
BE678D	0,79
ES3A	0,34
ES3B	> 1 mg/ml
ES3C	0,75
ES3D	0,19
ES3E	0,17
GA 1 mg/ml	0,01

DPPH• serbest radikal süpürücü etkinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada düşük IC₅₀ değerleri yüksek antioksidan aktivite göstermektedir. Buna göre GA > 2A > 3E > 3D > 1C > 3A > 3C > BE678D > 1A > 1B = 3B şeklinde ekstreler sıralanmıştır. Elde edilen sonuçlar **Şekil 25**'de verilmiştir.



Şekil 25. Ajuga ekstrelerinin serbest radikal süpürücü etkileri

ABTS•+ Radikal Süpürücü Etki (TEAC)

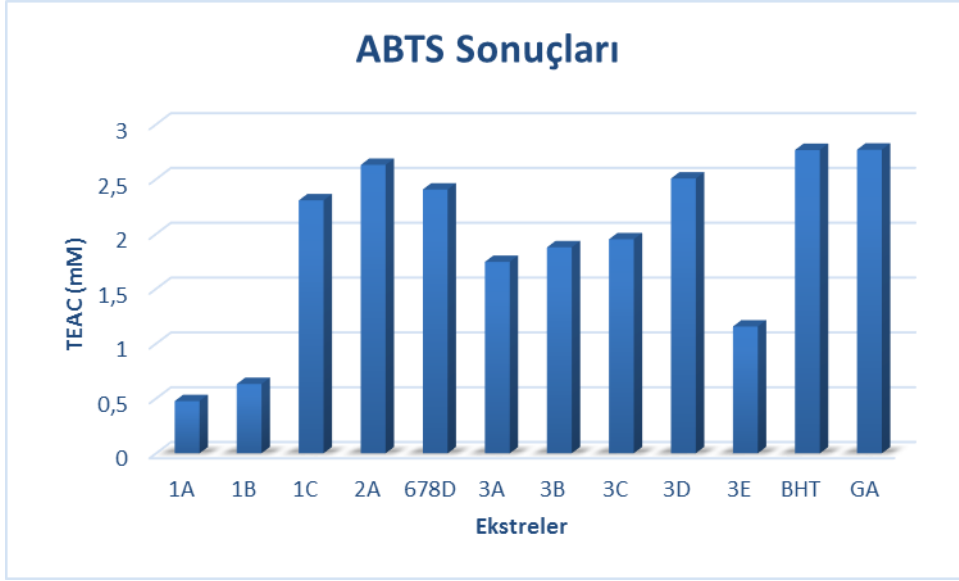
Yapılan bu deney ile bileşiklerin sahip oldukları antioksidan aktiviteler ile ABTS•+ (2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate) radikalini süpürücü etkinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışılan ekstrelerin ABTS•+ serbest radikalini inhibe etme sonuçları **Çizelge 12**'de verilmiştir.

Çizelge 12. Ajuga ekstrelerinin 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS•+) antioksidan aktivite sonuçları

Ekstreler	mMTEAC Sonuçları
ES1A	0,476
ES1B	0,63
ES1C	2,30
ES2A	2,63
BE 678 D	2,40
ES3A	1,74
ES3B	1,87
ES3C	1,95
ES3D	2,50
ES 3E	1,15

BHT	2,76
Gallik Asit	2,76

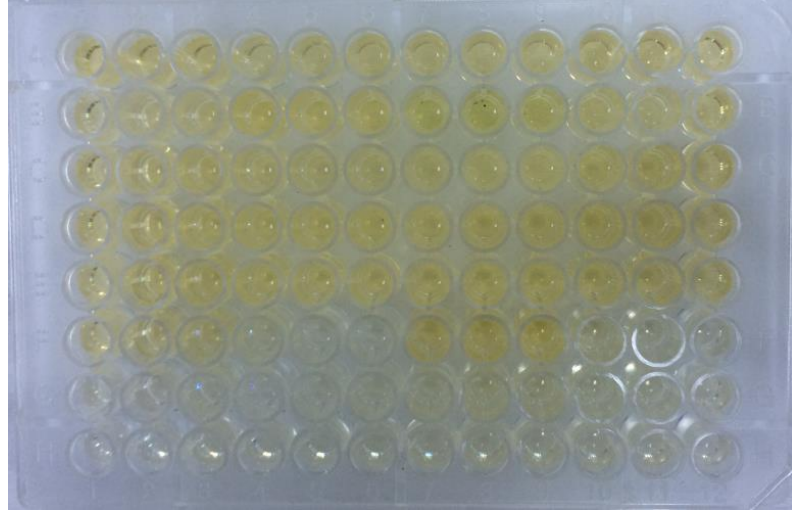
Yapılan TEAC deneyine göre ekstrelerin ABTS•+ radikalini süpürmede gösterdikleri etkinlikler sırası ile şu şekildedir: BHT = GA > 2A > 3D > BE678D > 1C > 3C > 3B > 3A > 3E > 1B > 1A'dır. Sonuçlar **Şekil 26**'da verilmiştir.



Şekil 26. 2,2'- azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS•+) sonuçları

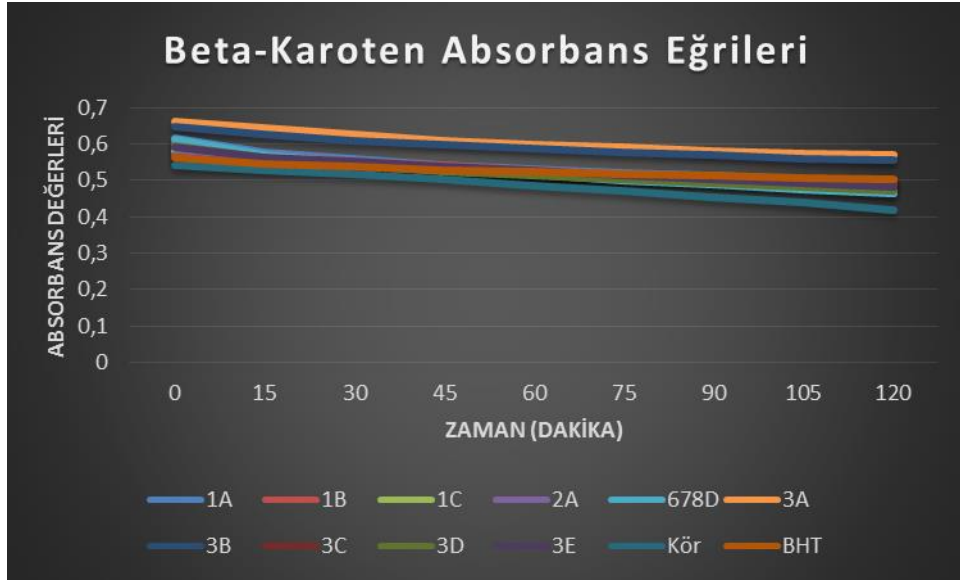
β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini

Antioksidan aktivitenin belirlenmesine yönelik olarak yaptığımız bir diğer deneyde β -karoten/linoleik asittir. Linoleik asit peroksidasyon için kullanılan bir model lipittir. Burada β -karotenin solmasının önlenmesi yüksek oranda antioksidan aktivitenin varlığını göstermektedir. Yapılan çalışmada kullanılan *Ajuga* cinsine ait örneklerin ekstrelerinden elde edilen kolorimetrik sonuçlar **Şekil 27**'de gösterilmiştir.



Şekil 27. β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu deneyinde ekstrelerin kolorimetrik görünüşleri

Çalışmada kullanılan ekstrelerin zamana bağlı olarak okunan absorbans değerlerindeki değişimleri Şekil 28'de verilmiştir.

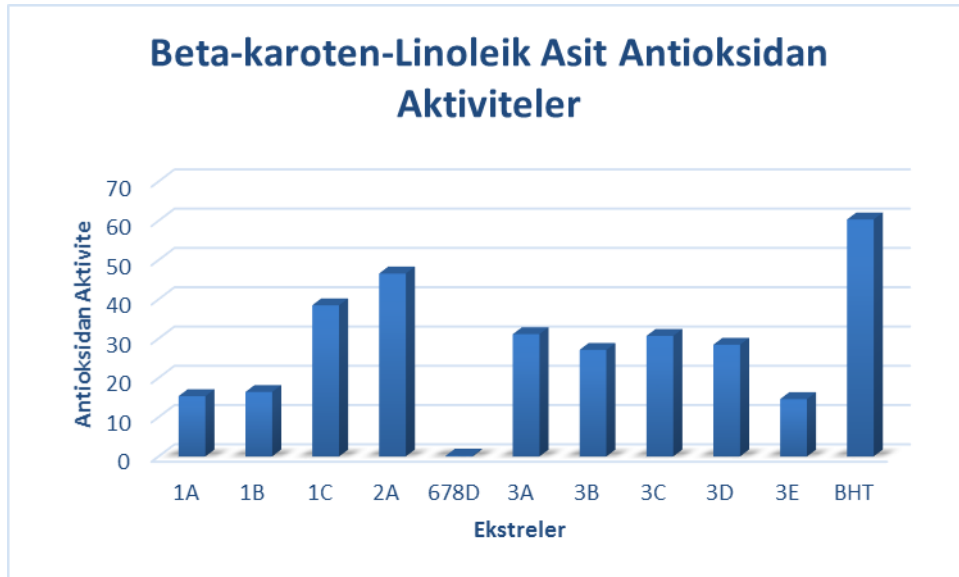


Şekil 28. *Ajuga* ekstrelerinin β -karoten-linoleik asit sisteminde absorbans eğrileri

Ekstrelerin % antioksidan değerleri BE678D < ES3E < ES1A < ES1B < ES3B < ES3D < ES3C < ES3A < ES1C < ES2A < BHT şeklindedir (Çizelge 13, Şekil 29).

Çizelge 13. *Ajuga* ekstrelerinin β -karoten-linoleik asit deneyinde % antioksidan aktivite değerleri

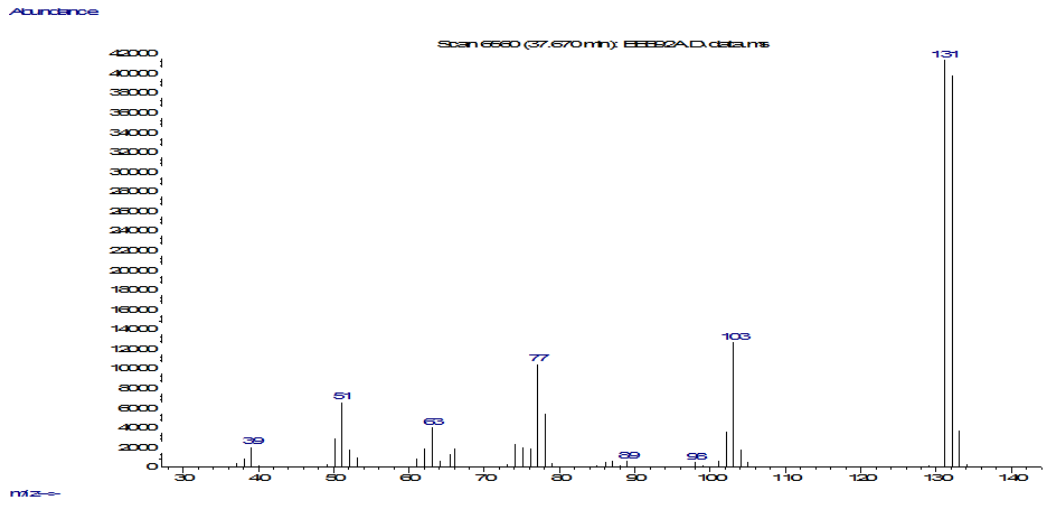
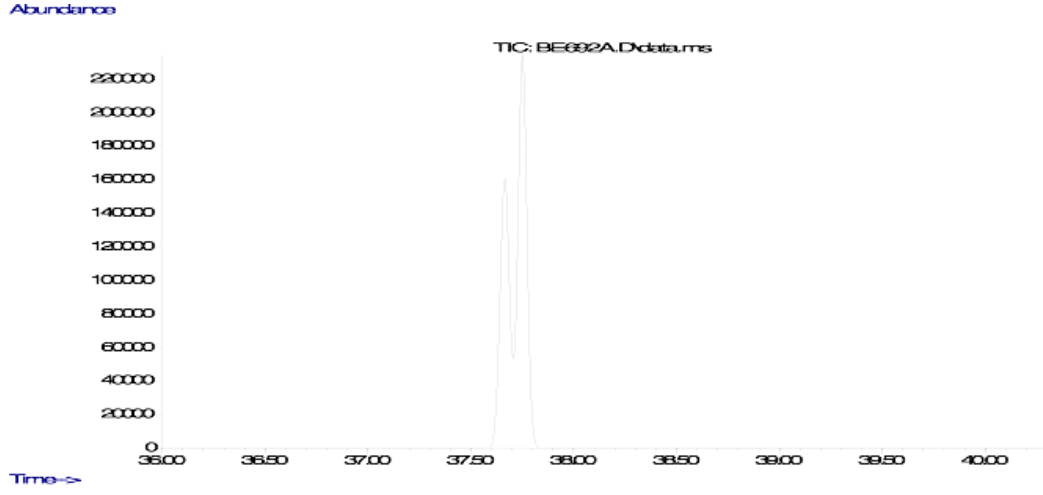
Ekstreler	Sonuçlar
ES1A	15,349
ES1B	16,419
ES1C	38,486
ES2A	46,576
BE678D	0,23
ES3A	31,141
ES3B	27,129
ES3C	30,692
ES3D	28,453
ES3E	14,598
BHT	60,34



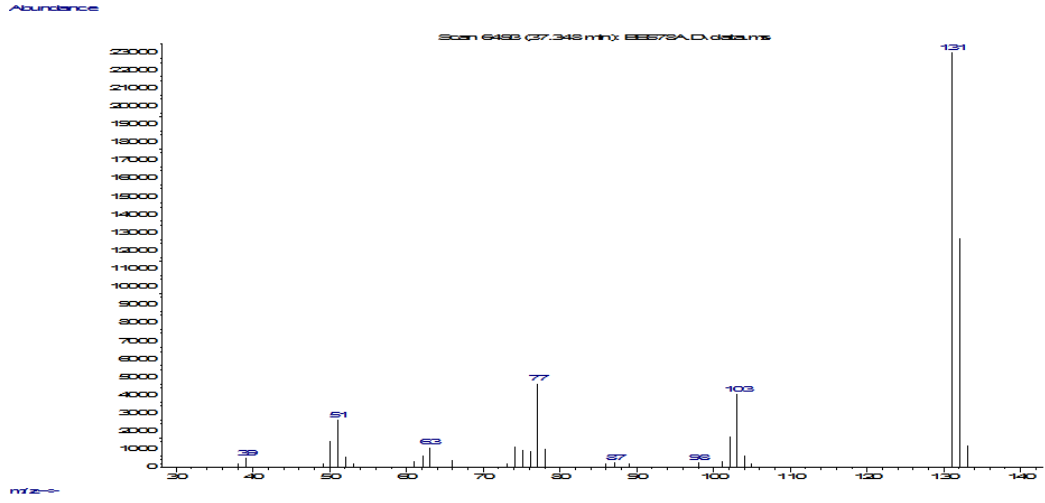
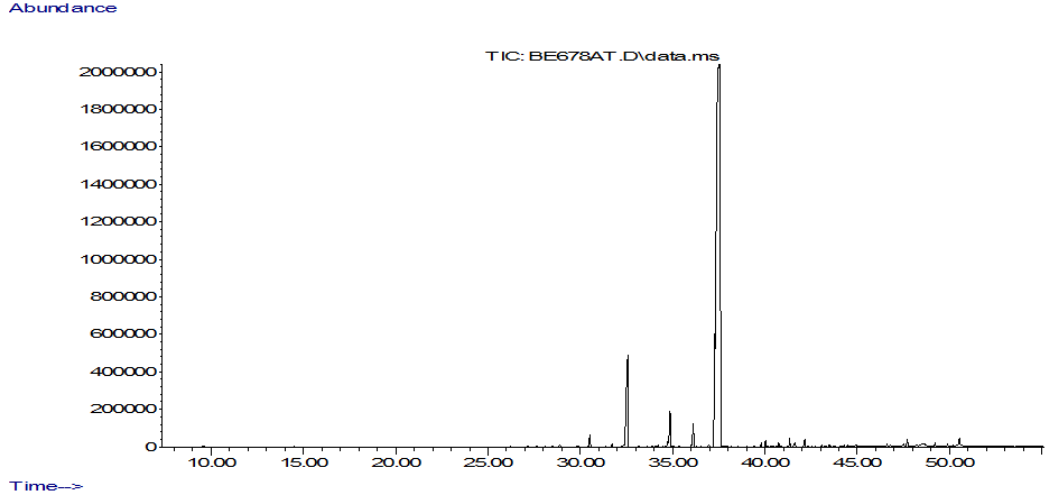
Şekil 29. *Ajuga* türlerine ait ekstrelerin β -karoten-linoleik asit deneyine göre antioksidan aktiviteleri

Uçucu Yağ Analizlerine Ait Bulgular

Ajuga reptans ve *A. reptans* taksonlarına ait uçucu yağ analiz sonuçları Şekil 30 ve 31’de verilmiştir.



Şekil 30. *A. reptans* uçucu yağ analizi spektrofotometre sonuçları



Şekil 31. *A. relict*a uçucu yağ analizi spektrofotometre sonuçları

A. postii Hatay ve Mersin Bölgesi'nde, *A. relictta* ise Kahramanmaraş-Çimen Dağı'nda sınırlı bir alanda bulunmaktadır. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Ekim ve ark., 2000)'na göre; *A. relictta* tehlike altında (EN) ve *A. postii* ise zarar görebilir (VU) kategorisinde yer almaktadır. IUCN Tehlike Altındaki Türlerin Kırmızı Listesi (http-1) (2015)'ne göre; tehlike altındaki (EN) ve zarar görebilir seviyesindeki (VU) türlerin tanımı şöyledir;

Endangered (EN): Takson tehlike altındadır ancak bu düzey kritik değerde değildir. Taksonun yakın gelecekte yüksek oranda yok olma tehlikesi vardır. Habitat 500 km² ile 5000 km² arasında tahmin edilmektedir. Populasyon parçalanmış veya beşten az lokalitede rastlanmaktadır. Ergin bireylerin sayısı yaklaşık 2.500 dür. Azalma oranı beş yıl içinde ya da iki kuşak sonrası % 20 olabilir. Tüm bireyler tek bir populasyonda yer alabilir. Olgun bireylerin sayısı 250 nin altında kalabilir. Gelecek yirmi yıl içinde ya da takip eden beş kuşak sonrası azalma oranı yaklaşık % 20 olarak tahmin edilmektedir.

Vulnerable (VU): Takson gelecekte orta vadede yok olma tehlikesiyle karşı karşıyadır. Önümüzdeki on yıl içerisinde ya da takip eden üç kuşak sonrasında azalma oranı yaklaşık % 50 dir. Habitat 2000 km² ile 20 000 km² arasında tahmin edilmektedir. Populasyonda 10.000 den az olgun birey bulunmaktadır. Takip eden on yıl ya da üç kuşak sonrasında azaltma oranı yaklaşık % 10 dur. Tüm bireyler tek bir altpopulasyonda yer alabilir. İnsan etmenine bağlı olarak ergin bireylerin sayısı 1000'den az olabilir.

Türkiye yaşanan buzul çağları sırasında sahip olduğu iklim çeşitliliği ve korunaklı alanlarının bulunması ile birçok bitki türünün yaşamını devam ettirebildiği bir ülkedir (Sekercioğlu ve ark., 2011). Üzerinde çalıştığımız *A. postii* ve *A. relictta* taksonları da belirtilen özellikler sonucu bulunmaktadırlar. *Ajuga* taksonları Lamiaceae üyeleridir. Lamiaceae üyelerinde tüy örtüsü, bitkileri Akdeniz ikliminin kuru ve sıcak iklim özelliklerinden koruyan bir adaptasyondur (Navarro ve El Oualidi, 2000). *A. relictta*'nın gövdesi üzerinde tüy oluşumu görülmezken, *A. postii*'nin gövdesi üzerinde seyrek tüy oluşumu gözlemlenmiştir. Bunun yanında *A. relictta*'nın taban ve gövde yaprakları ile brakteleri tüysüz iken; *A. postii*'nin gövde yaprakları ve brakteleri seyrek tüylüdür. Tüy oluşumları *A. relictta*'da kaliks, korolla ve filamentte görülürken; *A. postii*'de kaliks dişleri, korolla iç kısmı ve filamentler tüylüdür.

Yapmış olduğumuz çalışma ile *A. postii* ve *A. relictta*'nın anatomik özellikleri ilk kez tespit edilmiştir. Her iki taksonda çok yıllık bitkilerdir. Buna bağlı olarak kök anatomik kesitlerinde sekonder gelişim görülmektedir. Her iki türün de kök korteks yapılarında sklerankima hücreleri dikkati çekmektedir. Her iki türün kök anatomik kesitlerinde floem ve ksilem arasında kambiyum tabakası gözlemlenmemiştir.

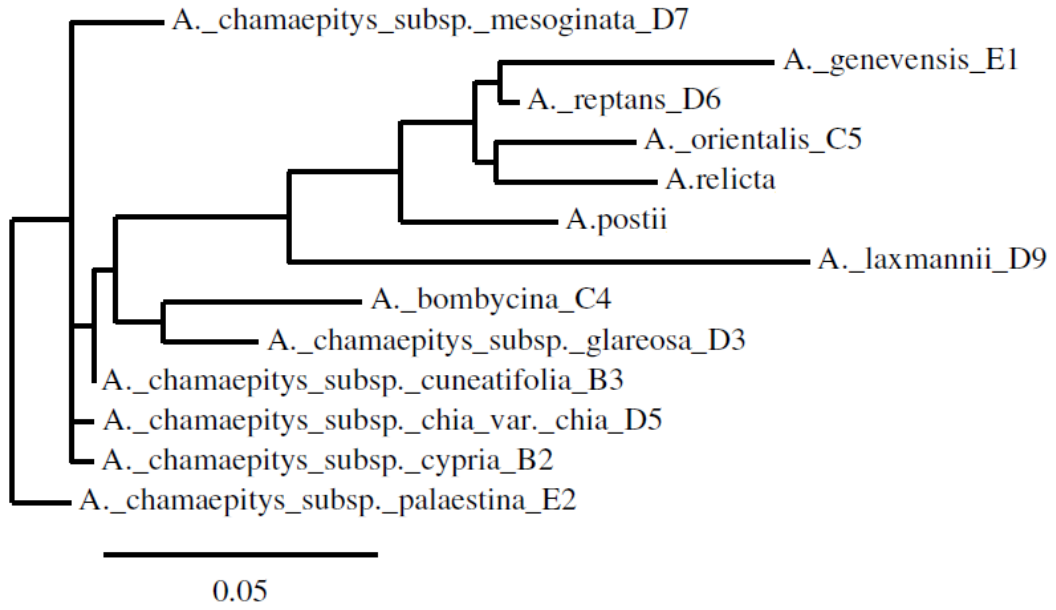
Metcalf ve Chalk (1972) tarafından yapılan çalışmada Lamiaceae'nin sahip olduğu anatomik özellikler belirtilmiştir. Buna göre; dört köşeli gövde yapısı ile familia üyeleri karakteristiktir. Köşelerde kollenkima hücreleri belirgindir. Benzer özellikler yapmış olduğumuz çalışmada da gösterilmiştir. Her iki türde de gövdede epidermanın altında bulunan korteks tabakasında klorankima bulunması fotosentezin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Vasküler sistemde floem dar bir alanı kaplarken ksilem elemanları belirgin olarak daha geniş bir alanı kaplar. Floem ve

ksilem arasında kambiyum tabakası belirgin değildir. Gövde öz bölgeleri parenkimatik olup öz kolları 1-2 sıralıdır.

Birçok *Ajuga* türü sahip oldukları anatomik yapılar bakımından çalışılmıştır (Erkara ve Koyuncu, 2009; Akçın ve ark., 2006; Köse ve ark., 2011; Çalı, 2014). Akçın ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan çalışmada *A. reptans* gövde anatomik kesitinde örtü ve salgı tüyleri ve *A. chamaepitys* ssp. *chia* var. *chia*'da ise hem gövde hem de yaprak anatomik kesitlerinde örtü ve salgı tüyleri gözlenmiştir. Çalı (2014) tarafından *A. orientalis* üzerinde yapılan anatomik incelemelerde kaliks ve korolla üzerinde salgı tüyelerine, gövde, yaprak ve yaprak sapında ise örtü tüyelerine rastlanmıştır. Köse ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışmada *A. chamaepitys* subsp. *cuneatifolia*'da piloz, yarı sessil salgı tüyleri ile *A. bombycina*'da tomentoz tüy örtüsü gözlemlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada ise; yaprak enine kesitlerinde salgı tüyelerine rastlanmamıştır. Sadece örtü tüyleri gözlemlenmiştir. Epidermanın dış kısmında ince bir kutikula tabakası bulunmaktadır. Epidermis her iki türde de tek sıralıdır. Lamiaceae üyelerinde çoğunlukla diasitik tip stoma görülmektedir (Metcalf ve Chalk, 1972). Benzer sonuçlar *A. postii* ve *A. relictta* için de söylenebilir. Stomalar diasitik tip olup yapraklar bifasiyaldir. Mezofil tabakası her iki türde de geniş bir alanı kaplamaktadır. Palizat ve sünger parankimaları birbirlerine benzer yapıdadır. Yaprak vasküler sistemlerinde ksilem, floem hücrelerinden daha geniş bir alanı kaplamaktadır.

Morfolojik ve anatomik özellikler türlerin fenolojik benzerliklerinin karşılaştırılmasına olanak verirken moleküler çalışmalar genlerde meydana gelen varyasyonlar sonucunda yeni tür oluşumları ve akrabalık ilişkileri hakkında bilgi vermektedir. Elde ettiğimiz ITS bölgesi dizi analiz sonuçlarına göre, her iki *Ajuga* türü *A. reptans* ile yakın akraba türlerdir. Benzerlik oranları % 90'dan fazladır (**Çizelge 5**). Gen bankasındaki verilerle sonuçlarımızı karşılaştırdığımızda *A. postii* ve *A. relictta* türleri ile diğer bazı *Ajuga* taksonlarının akrabalık ilişkileri **Şekil 32**'de verilmiştir. Buna göre *A. relictta*, *A. postii*, *A. orientalis*, *A. genevensis* ve *A. reptans* türleri bir grup oluşturmaktadırlar. Bu türler aynı zamanda *Ajuga* cinsinin Türkiye'de yetişen mor-mavi-krem çiçekli türleridir. Sarı çiçekli olan taksonlar ayrı gruplar oluşturmuşlardır. Fenotipik olarak benzer türlerin moleküler verilerle yapılan analizlerde aynı grupta yer alması sonuçların doğru olduğunu göstermektedir.

Kaliks yapıları incelendiğinde ise *A. postii*, *A. relictta* ve *A. reptans* 5 dişli iken *A. orientalis* 5-7 dişlidir. Kaliks tüy örtüleri *A. relictta* ve *A. orientalis*'de gri lanat villoz iken, *A. reptans* tüysüze yakın kısa tüylüdür. Taksonlar arasında görülen yapı farklılıkları ile tür çeşitlilikleri ortaya çıkmıştır.



Şekil 32. Bazı *Ajuga* taksonlarının ITS bölgelerinin baz dizilimlerine göre akrabalık ilişkileri

A. postii ve *A. relicta* ile yakın akraba türler olan *A. reptans* ve *A. orientalis* geniş yayılışlı türler iken *A. postii* ve *A. relicta* sınırlı alanlarda bulunmaktadır. Burada bitki türleri ile tozlaşmayı sağlayan böcekler ve kuşlar dikkati çekmektedir. Lamiaceae üyelerine özgü iki dudaklı çiçekler kendileri ile tozlaşan böcekler ve kuşlar ile evrimleşmiştir (Claßen-Bockhoff, 2007). Lokal endemik türler sınırlı alanlarda kaldıklarından tozlaşmayı sağlayan canlılarında beslenme mekanizmaları sınırlandırılmıştır.

Antioksidan etkiye sahip fenolik bileşikler, flavanoidler, flavanoller ve triterpenoidler gibi bileşikler pek çok bitkide doğal olarak bulunmakta ve insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir (Uysal ve Aktumsek, 2015). Yapmış olduğumuz çalışmada *Ajuga* cinsine ait taksonların toplam fenolik, flavanoid ve flavanol madde miktar tayinleri yapılmıştır. Buna göre; toplam fenolik madde miktar tayinlerinde *A. postii* ve *A. relicta*'ya ait olan uçucu yağ balon altı sularında en yüksek oranda madde miktarları tespit edilmiştir. Toplam flavanoid madde miktarlarında ise *A. postii* uçucu yağ balon altı suyunda yüksek değerler görülürken, *A. relicta*'da %70 metanol içeren ekstrenin değerleri yüksektir. Toplam flavanol madde miktarları deneyinde ise *A. postii*'nin %70 metanol içeren ekstresi ile *A. relicta*'nın metanollü ekstrelerinde en yüksek değerler tespit edilmiştir.

Çalışılan ekstreler içerisindeki antioksidan aktiviteli bileşiklerin araştırılması amacıyla LC/MS analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda alınan spektrumlarında fragmanlar tam olarak belirlenememektedir. *A. relicta* ekstrelerinin ölçümlerinden *A. postii*'den daha fazla pik tespit edilmiş olup yapılan literatür taramaları ile çalışılan *Ajuga* türlerine ait m/z (Kütle/yük oranı) değerlerinde eşleşmelere rastlanmamıştır.

Lamiaceae üyeleri sahip oldukları fenolik bileşikler ile yüksek antioksidan aktivite gösterirler. Antioksidan aktiviteler bitkileri normal hücre metabolizmalarında oluşan ya da UV gibi radyasyon içeren zararlı ışınlar ile toprakta ve havada oluşan kirlilik etmenleri ile hastalıklara bağlı olarak ortaya çıkan serbest radikallerin zararlı etkilerinden korur (Trivellini ve ark., 2016). Yapmış olduğumuz çalışmada

bitkilerde kompleks fitokimyasallar bulunduğundan birden fazla antioksidan aktivite deneyi yapılmıştır. Bu amaçla DPPH•, TEAC ve Beta-karoten/Linoleik asit deney sistemlerinden yararlanılmıştır. Antioksidan aktivite çalışmalarında oksijen ve nitrojen gibi serbest radikalleri süpürücü etkiler araştırılmaktadır (Yumrutas ve ark., 2012). Çalışmamızda radikal süpürücü etkilerin gözlemlenmesi DPPH• ve TEAC deneyleri ile gerçekleştirilmiştir. Burada DPPH• anyon ve ABTS•+ katyon etkili radikaller için kullanılmıştır. Buna göre DPPH• deneyinde *A. relictta* için en yüksek değer %70 metanol (2A) ekstresinden ve *A. postii* için ise uçucu yağ balon altı suyundan (3E) elde edilmiştir. TEAC deneyinde ise *A. relictta* ve *A. postii* için yine en yüksek değer %70 metanol (2A ve 3D) ekstrelerinden elde edilmiştir. Antioksidan aktivite çalışmalarından Beta-karoten/Linoleik asit etkinliğinin inhibisyonu deney sonuçlarına göre en yüksek değerler *A. relictta* için %70 metanol (2A) ekstresinden ve *A. postii* için ise hekzan (3A) ekstresinden elde edilmiştir. Antioksidan aktivite sonuçları genel olarak toplam fenolik madde miktarları ile benzer sonuçlar göstermelerine rağmen çalışmamızda benzer durum gözlenmemiştir. Toplam fenolik madde miktarlarında en yüksek değerler *A. postii* ve *A. relictta* için uçucu yağ balon altı sularında gözlenirken, antioksidan deneylerinde farklı sonuçlar alınmıştır. %70 oranında metanol (2A) içeren *A. relictta* ekstresi her üç antioksidan deneyinde de en yüksek aktiviteyi gösterirken, *A. postii* 'de farklı ekstreler yüksek etkinlik göstermişlerdir.

Yapılan uçucu yağ analizleri sonucunda safa yakın bilinmeyen maddeler belirlenmiş olup daha sonraki aşamalarda bu maddelerin teşhisi Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR) çalışmaları ile gerçekleştirilecektir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında endemik türler olan *A. postii* ve *A. relictta* taksonları farmasötik botanik özellikleri bakımından incelemiştir. Bu amaçla *A. postii* Mersin'den, *A. relictta* ise Kahramanmaraş-Çimen Dağı'ndan toplanmıştır. *Ajuga* L. cinsine ait olan *A. postii* ve *A. relictta* taksonlarının morfolojik özellikleri Türkiye Florası ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Flora deskripsiyonunda eksik olan bitki kısımlarının ölçümleri yapılmıştır. Lamiceae familyası içerisinde yer alan *Ajuga* cinsine ait olan iki taksonun anatomik özellikleri yapmış olduğumuz çalışma ile ilk kez gösterilmiştir. Anatomik kesitler elle alınmış olup preparatlara Sartur reaktifi uygulanmıştır. Taksonların morfolojik ve anatomik özellikleri orijinal fotoğraflarla desteklenmiştir. Yapmış olduğumuz moleküler çalışmalar sonucunda taksonların *A. reptans* ile yakın akraba oldukları belirlenmiştir. Sahip oldukları benzer genlerin oranları *A. postii* için %92, *A. relictta* için ise %95'dir. Buna ek olarak filogenik ilişkileri gösterilmiştir. Taksonların toprak üstü kısımlarından hekzan, etil asetat, metanol, %70 metanollü ve uçucu yağ balon altı sularından ekstratlar hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstratlar ile taksonların içerdikleri fenolik, flavanoid ve flavanol madde miktarları belirlenmiş olup kimyasal bileşik analizleri yapılmıştır. Bitkilerin içerdikleri sekonder bileşikler antioksidan aktivite yönünden zengindir. Bu amaçla DPPH• ve ABTS•+ radikallerini süpürücü etki deneyleri ile Beta-karoten/Linoleik asit inhibisyonun belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Son olarak uçucu yağ kompozisyonunun belirlenmesine yönelik araştırmalar gerçekleştirilmiştir.

Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı'na göre; *A. relictta* tehlike altında (EN) olup yakın zamanda yok olma tehlikesi ile karşı karşıyadır, *A. postii* ise zarar görebilir (VU) kategorisinde yer almaktadır. *A. postii* kritik düzeyde olmasa da orta vadede gelecekte yüksek tehdit altında bulunmaktadır. Bu nedenlere bağlı olarak çalışmanın önemi artmaktadır.

A. postii ve *A. relictta* taksonları relikt türler olup tehlike kategorileri de dikkate alınarak koruma stratejileri uygulanması biyoçeşitlilik açısından önemlidir. Yapmış olduğumuz çalışma ile *Ajuga* cinsine ait olan *A. postii* ve *A. relictta*'nın belirlenen morfolojik ve anatomik özellikleri diğer *Ajuga* taksonlarının özelliklerinin karşılaştırılmasında kullanılabilir. Moleküler sonuçların gelecekte yapılacak çalışmalara kaynak oluşturması muhtemeldir. Antioksidan aktivite çalışmalarına ait bulgular farmakolojik çalışmalarda farklı kullanım amaçlarına kaynak oluşturabilir. Aynı şekilde benzer önerileri uçucu yağ bileşenleri için de söylemek mümkündür.

KAYNAKLAR

- Abbasi, A.M., Khan, M.A., Ahmad, M., Zafar, M., Jahan, S., Sultana, S., Ethnopharmacological Application of Medicinal Plants to Cure Skin Diseases and in Folk Cosmetics Among the Tribal Communities of North-West Frontier Province, Pakistan, *J. Ethnopharmacol.*, 128, 322–335 (2010).
- Abu-Asab, M.S., Cantino, P.D., Phylogenetic Implications of Pollen Morphology in Tribe Ajugeae (Labiatae), *Syst. Bot.*, 18 (1), 100-122 (1993).
- Ahmad, I., Ibrar, M., Barkatullah, Ali, N., Ethnobotanical Study of Tehsil Kabal, Swat District, KPK, Pakistan, *J. Bot.*, 1-9 (2011).
- Ahmed, D. ve Chaudhary, M.A., Medicinal and Nutritional Aspects of Various Trace Metals Determined in *Ajuga bracteosa*, *J. Appl. Sci. Res.*, 5 (7), 864-869 (2009).
- Akbay, P., Çalış, I., Heilmann, J., Sticher, O., Ionone, Iridoid and Phenylethanoid Glycosides from *Ajuga salicifolia*, *Z. Naturforsch.*, 58c, 177-180 (2003).
- Akbay, P., Çalış, I., Heilmann, J., Sticher, O., New Stigmastane Sterols from *Ajuga salicifolia*, *J. Nat. Prod.*, 66 (4) (2003).
- Akçın, Ö.E., Özyurt, M.S., Şenel, G., Petiole Anatomy of Some Lamiaceae Taxa, *Pak. J. Bot.*, 43 (3), 1437-1443 (2011).
- Akçın, Ö.E., Şenel, G., Akçın, Y., The Morphological and Anatomical Properties of *Ajuga reptans* L. and *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *chia* (Schreber) Arcangeli var. *chia* (Lamiaceae) taxa, *Pak. J. Biol. Sci.*, 9 (2), 289-293 (2006).
- Alvarenga, S.A.V., Gastmans, J.P., Rodrigues, G.V., Moreno, P.R.H., Emerenciano, V.P., A computer-assisted approach for chemotaxonomic studies - diterpenes in Lamiaceae, *Phytochemistry*, 56 (6), 583–595 (2001).
- Ardekani, M.R.S., Khanavi, M., Taheri, P., Samadi, N., Safaripour, E., Salimpour, F., The Essential Oil Composition of *Ajuga chamaecistus* Ging. subsp. *tomentella* Rech. f., *J. Essent. Oil. Bear. Pl.*, 13 (1), 49-51 (2010).
- Arot Manguro, L.O., Wagai, S.O. ve Lemmen, P., Flavonol and iridoid glycosides of *Ajuga remota* aerial parts, *Phytochemistry*, 67, 830–837 (2006).
- Azizan, J., Fallah-Bagher-Shaidaei, H., Kefayati, H., Chemical Constituents of the Essential Oil of *Ajuga chamaepitys* Growing in Iran, *J. Essent. Oil Res.*, 14 (5), 344-345 (2002).
- Bachmann, M., Keller, F., Metabolism of the Raffinose Family Oligosaccharides in Leaves of *Ajuga reptans* L. (Inter and Intracellular Compartmentation), *Plant Physiol.*, 109 (3), 991-998 (1995).
- Baser, K.H.C., Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey, *Pure Appl. Chem.*, 74 (4), 527–545 (2002).
- Baser, K.H.C., Kurkcuoglu, M., Erdemgil, F.Z., The Essential Oil of *Ajuga bombycina* From Turkey, *Chem. Nat. Compd.*, 37 (3), (2001).

- Baytop, T., Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 268, 370, 1999.
- Boissier, E., Flora Orientalis, Vol. 1-6, Genova, (1867-1888).
- Calcagno, M.P., Camps, F., Coll, J., Mele, E., Acetylated ecdysteroids from *Ajuga reptans* var. *atropurpurea* (Lamiales: Lamiaceae), Eur. J. Entomol., 92, 287-294 (1995).
- Callebaut, A., Terahara, N., Haan, M., Declaire, M., Stability of anthocyanin composition in *Ajuga reptans* callus and cell suspension cultures, Plant Cell Tiss. Org., 50, 195–201 (1997).
- Carbonell, P ve Coll, J., Ajugatansins, neo-clerodane Diterpenes from *Ajuga reptans*, Phytochem. Anal., 12, 73–78 (2001).
- Chen, H., Tan, R.X., Liu, Z.L., Zhang, Y., Antibacterial Neoclerodane Diterpenoids from *Ajuga lupulina*, J. Nat. Prod., 59 (7), 668–670 (1996).
- Chenni, A., Yahia, D.A., Boukortt, F.O., Prost, J., Lacaille-Dubois, M.A., Bouchenak, M., Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet, J. Ethnopharmacol., 109 (2), 207–213 (2007).
- Claßen-Bockhoff, R., Floral Construction and Pollination Biology in the Lamiaceae, Ann. Bot.-London, 100, 359-360 (2007).
- Cronquist, A., An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, (1981).
- Çalı, I.Ö., Cansaran, A., Yıldırım, C., Trichome Morphology of *Ajuga orientalis* L. (Lamiaceae) From Turkey, Bangladesh J. Bot., 43 (1), 91-95 (2014).
- Çalı, I.Ö., An anatomical study of medicinal species *Ajuga orientalis* L. (Lamiaceae) from Turkey, J. Med. Plant Res., 8 (6), 331-338 (2014).
- Çıplak, B., Distribution of Tettigoniinae (Orthoptera, Tettigoniidae) bush-crickets in Turkey: the importance of the Anatolian Taurus Mountains in biodiversity and implications for conservation, Biodivers. Conserv., 12, 47–64 (2003).
- Davis, P.H., Mill, R.R. and Tan, K. (eds), Flora of Turkey and the East Aegean Islands, (Supplement), University Press, Edinburgh, Vol 10, (1988).
- Davis, P.H. (ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol 1-9, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, (1985).
- Davis, P.H. (ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol 1-9, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, (1965).
- De Clavijo, R., A Comparative Study of the Reproductive Biology of Two *Ajuga* Species (Lamiaceae) in the Southwest of the Iberian Peninsula, Int. J. Plant Sci., 158, 282-291 (1997).
- Delazar, A., Delnavazi, M., Yassa, N., Parkhideh, S., Delazar, N., Nahar, L. ve Sarker, S. Essential oil composition and isolation of free-radical-scavenging phenolic glycosides from the aerial parts of *Ajuga chamaepitys* growing in Iran, Rev. Bras. Farmacognos., 22 (2), 299-305 (2011).

- Dirmenci, T. (*Teucrium* L.), Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M.T. (editörler), Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, 595–598 (2012).
- Edward, G., Flora of Syria, Palestine and Sinai; from the Taurus to Ras Muhammad, and from the Mediterranean Sea to the Syrian desert, Beirut, Syria, Syrian Protestant College, (1838-1909).
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N., Red Book of Turkish Plants, Türkiye Tabiatını Koruma Derneği, Ankara, (2000).
- Elbrecht, A., Chen, Y., Jurgens, T., Hensens, O.D., Zink, D.L., Beck, H.T., Balick, M.J., Borris, R., 8-O-Acetylharpagide is a nonsteroidal ecdysteroid agonist, Insect Biochem. Molec., 26 (6), 519–523 (1996).
- Erkara, İ.P., Koyuncu, O., The Anatomical and Palynological Properties of *Ajuga reptans* L. (Lamiaceae) at Risk, earsiv.anadolu, 10 (2), 593-601 (2009).
- Fakir, H., Babalik, A.A., Important Medicinal-Aromatic Plant Species for Beekeeping in Isparta Region Rangelands, J. Anim. Vet. Adv., 8 (7), 1406-1411 (2009).
- Fekete, G., Polgar, L., B'athori, M., Coll, J., Darvas, B., Peros efficacy of *Ajuga* extracts against sucking insects, Pest. Manag. Sci., 60, 1099–1104 (2004).
- Firdous, S., Ahmed, H., Hussain, M., Shah, M., Pollen Morphology of *Ajuga* L., *Lamium* L. and *Phlomis* L. (Lamiaceae) From District Abbottabad Pakistan, Pak. J. Bot., 47 (1), 269-274 (2015).
- Fujimoto, Y., Ohyama, K., Nomura, K., Hyodo, R., Takahashi, K., Yamada, J. ve Morisaki, M., Biosynthesis of Sterols and Ecdysteroids in *Ajuga* Hairy Roots, L8274 in Lipids 35, 279–288 (2000).
- Golovko, T.K., Dymova, O.V., Ecophysiology of *Ajuga reptans* L. at the Northern Boundary of Its Distribution, Handbook of Plant and Crop Stress, Revised and Expanded, 963-972, 1999.
- Göger, F., Köse, Y.B., Göger, G., Demirci, F., Phytochemical characterization of phenolics by LC-MS/MS and biological evaluation of *Ajuga orientalis* from Turkey, Bangladesh J. Pharmacol., 10, 639-644 (2015).
- Gören, A.C., Zhou, B.N., Topcu, G., Kökdil, G., Kingston, D. G. I., DNA Damaging Activities of Methanol Extract of *Ajuga postii* and Iridoid Glucoside Reptoside, Nat. Prod. Res., 19 (5), 457-460 (2005).
- Guo, P., Li, Y., Jind, D., Xu, J., He, Y., Zhang, L., Guo, Y., Neo-Clerodane diterpenes from *Ajuga ciliata* and their inhibitory activities on LPS-induced NO production, Phytochemistry Lett., 5 (3), 563–566 (2012).
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M., Türkiye Bitkileri Listesi Damarlı Bitkiler, Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul (2012).
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Baser, K. H. C. (ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Supplement 2), Vol. 11, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, (2000).

- Güneş, F., Özhatay, N., An ethnobotanical study from Kars (Eastern) Turkey, *Biodicon*, 4 (1), 30-41 (2011).
- Harley, R.M., Atkins, S., Budantsev, A., Cantino, P.D., Conn, B.J., Grayer, R., Harley, M.M., Kok, R., Krestovskaja, T., Morales, R., Paton, A.J., Ryding, O., Upson, T., Labiatae. In: Kubitzki, K. (ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants*, Springer-Verlag, 7, 167-275 New York, NY (2004).
- Hamill, F.A., Apio, S., Mubiru, N.K., Bukenya-Ziraba, R., Mosango, M., Maganyi, O.W., Soejarto, D.D., Traditional herbal drugs of Southern Uganda, II: literature analysis and antimicrobial assays, *J. Ethnopharmacol.*, 84, 57-78 (2003).
- Heywood, V.H., Brummitt, R.K., Culham, A., Seberg, O., *Flowering Plant Families of the World, Lamiaceae: 179–181*, New York, NY, Firefly Books (2007).
- Hoffmann-Thoma, G., Bel, A.J.E. ve Ehlers, K., Ultrastructure of minor vein phloem and assimilate export in summer and winter leaves of the symplically loading evergreens *Ajuga reptans* L., *Aucuba japonica* Thunb., and *Hedera helix* L., *Planta*, 212, 231-242 (2001).
- Inceer, H., Hayırlıoğlu-Ayaz, S., Ozcan, M., Chromosome numbers of the twenty-two Turkish plant species, *Caryologia*, 60 (4), 349-357 (2007).
- Inomata, Y., Terahara, N., Kitajima, J., Kokubugata, G. ve Iwashina, T., Flavones and anthocyanins from the leaves and flowers of Japanese *Ajuga* species (Lamiaceae), *Biochem. Syst. Ecol.*, 51, 123–129 (2013).
- Israili, Z.H., Lyoussi, B., Ethnopharmacology of the Plants of Genus *Ajuga*, *Pak. J. Pharm. Sci.*, 22(4), 425-462 (2009).
- Janicsák, G., Máthé, I., Miklóssy-Vári, V., Blunden, G., Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species, *Biochem. Syst. Ecol.*, 27 (7), 733–738 (1999).
- Jannet, H.B., Harzallah-Skhiri, F., Mighri, Z., Simmonds, M.S.J. ve Blaney, W.M., Responses of *Spodoptera littoralis* larvae to Tunisian plant extracts and to neoclerodane diterpenoids isolated from *Ajuga pseudoiva* leaves, *Fitoterapia*, 71, 105-112 (2000).
- Javidnia, K., Miri, R., Soltani, M., Khosravi, A.R., Chemical Constituents of the Essential Oil of *Ajuga austro-iranica* Rech. f. (Lamiaceae) from Iran, *J. Essent. Oil Res.*, 22, 392-394 (2010).
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*, USA, (2008).
- Kabbaj, F.Z., Meddah, B., Cherrah, Y., Faouzi, M.E.A., Ethnopharmacological profile of traditional plants used in Morocco by cancer patients as herbal therapeutics, *Phytopharmacol.*, 2 (2), 243-256 (2012).
- Karakuş, H., Türkmen, N., The Floristic Characteristics of Plants in Gardens and Streets in Urban Areas of Adana, Turkey, *Pak. J. Bot.*, 46 (6), 1935-1944 (2014).
- Kariba, R.M., Antifungal activity of *Ajuga remota*, *Fitoterapia*, 72 (2), 177–178 (2001).

- Kaul, S., Das, S., Srivastava, P.S., Micropropagation of *Ajuga bracteosa*, a medicinal herb, *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 19 (2), 289–296 (2013).
- Keter, L.K. ve Mutiso, P.C., Ethnobotanical studies of medicinal plants used by Traditional Health Practitioners in the management of diabetes in Lower Eastern Province, Kenya, *J. Ethnopharmacol.*, 139, 74–80 (2012).
- Khaled-Khodja, N., Boulekbache-Makhlouf, L., Madani, K., Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae, *Ind. Crop. Prod.*, 61, 41–48 (2014).
- Khatun, S., Parlak, K.U., Polat, R., Cakilcioglu, U., The endemic and rare plants of Maden (Elazig) and their uses in traditional medicine, *J. Herb. Med.*, 2, 68–75 (2012).
- Khidoyatova, S.K., Ulchenko, N.T., Gusakova, S.D., Chernenko, T.V., Sagdullaev, S.S., Nigmatullaev, A.M., Comparative study of lipids and lipophilic constituents from separate organs of *Ajuga turkestanica*, *Chem. Nat. Compd.*, 48 (5), 732-736 (2012).
- Kılıç, O., Bağcı, E, An ethnobotanical survey of some medicinal plants in Keban (Elazığ-Turkey), *J. Med. Plant Res.*, 7 (23), 1675-1684 (2013).
- Kokdil, G., Topcu, G., Goren, A.C., Voelterd, W., Steroids and Terpenoids from *Ajuga relictta*, *Z. Naturforsch. B.*, 57 (8), 957-960 (2002).
- Kokubugata, G., Kurihara, T., Hirayama, Y., Obata, K., Molecular Evidence for a Natural Hybrid Origin of *Ajuga x mixta* (Lamiaceae) Using ITS Sequence, *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B.*, 37 (4), 175–179 (2011).
- Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H., Nishino, H., Cancer Chemopreventive Activity of An Iridoid Glycoside, 8-Acetylharpagide, from *Ajuga decumbens*, *Cancer Lett*, 157(1), 87-92 (2000).
- Koyuncu, O., Yaylacı, Ö.K., Öztürk, D., Erkara, İ.P., Savaroğlu, F., Akçoşkun, Ö., Ardiç, M., Risk categories and ethnobotanical features of the Lamiaceae taxa growing naturally in Osmaneli (Bilecik/Turkey) and environs, *Biodicon*, 3 (3), 31-45 (2010).
- Köse, Y.B., Alan, S., Demirci, B., Başer, K.H.C., Geographical Variation of *Ajuga laxmannii* (L.) Bentham Essential Oil, *Nat. Volatiles Essent. Oils*, 2 (1), 32-36 (2015).
- Köse, Y.B., Mutlu, M.B., Alan, S., “ITS Sequence Analysis of Some Medicinal *Ajuga* taxa from Turkey”, NATPRO4, 28-30 November, Chiang Mai, Thailand, (2012).
- Köse, Y.B., Erkara, I.P., Alan, S., Pollen Morphology of Some Turkish *Ajuga* L. (Lamiaceae) and Its Taxonomic Value, *Bangladesh J. Bot.* 40 (1), 29-33 (2011).
- Köse, Y.B., Alan, S., Mutlu, M.B., Güner, T., Batı Anadolu Bölgesinde Yayılış Gösteren *Ajuga* L. Cinsine Ait Taksonların Taksonomik ve Ekolojik Özellikleri, Bilimsel Araştırma Projesi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir (2011).

- Kumar, M., Paul, Y., Anand, V.K., An Ethnobotanical Study of Medicinal Plants used by the Locals in Kishtwar, Jammu and Kashmir, India, *Ethnobot. Leaflets*, 13, 1240-1256 (2009).
- Küçükbay, F.Z., Kuyumcu, E., Yıldız, B., Essential Oil Composition from the Aerial Parts of *Ajuga orientalis* L. Growing in Turkey, *Asian J. Chem.*, 25 (16), 9126-9128 (2013).
- Liu, Y., Nielsen, M., Staerk, D., Jäger, A. K., High-resolution bacterial growth inhibition profiling combined with HPLC–HRMS–SPE–NMR for identification of antibacterial constituents in Chinese plants used to treat snakebites, *J. Ethnopharmacol.*, 155, 1276–1283 (2014).
- Maćukanović-Jocić, M., Duletić-Laušević, S.N., Jocić, G., Nectar production in three melliferous species of Lamiaceae in natural and experimental conditions, *Acta Vet.*, 54 (5-6), 475-487 (2004).
- Mamadaliyeva, N.Z., El-Readi, M.Z., Ovidi, E., Ashour, M.L., Hamoud, R., Sagdullaev, S.S., Azimova, S.S., Tiezzi, A., Wink, M., Antiproliferative, antimicrobial and antioxidant activities of the chemical constituents of *Ajuga turkestanica*, *Phytopharmacol.*, 4 (1), 1-18 (2013).
- Mansour, M.B., Balti, R., Rabaoui, L., Bougatef, A., Guerfel, M., Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from south Tunisian *Ajuga pseudoiva* Rob. Lamiaceae, *Process Biochem.*, 48 (4), 723–729 (2013).
- Marin, P.D., Sajdl, V., Kapor, S., Tatić, B., Petkovic, B., Fatty acids of the Saturejoideae, Ajugoideae and Scutellarioideae (Lamiaceae), *Phytochemistry*, 30 (9), 2979–2982 (1991).
- Menkovic, N., 'Savikin, K., Tasi'c, S., Zduni'c, G., Stesevi'c, D., Milosavljevi'c, S., Vincek, D., Ethnobotanical Study on Traditional Uses of Wild Medicinal Plants in Prokletije Mountains (Montenegro), *J. Ethnopharmacol.*, 133, 97-107 (2011).
- Metcalf, C.R., Chalk, L., *Anatomy of Dicotyledons*. Clarendon Press, Oxford (1972).
- Mitić, V.D., Stankov-Jovanović, V.P., Jovanović, O.P., Palic, I.R., Djordjević A.S., Stojanović, G.S., Composition and Antioxidant Activity of Hydrodistilled Essential Oil of Serbian *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber ssp. *chia* (Schreber) Arcangeli, *J. Essent. Oil. Res.*, 23 (6), 70-74 (2011).
- Mohammadhosseini, M., Pazoki, A., Zamani, H.A., Akhlaghi, H., Chemical Composition of the Essential Oil from Aerial Parts of *Ajuga chamaecistus* Ging. subsp. *scopria* in Brackish Regions of Iran, *J. Essent. Oil Bear. Pl.*, 14 (1), 101-105 (2011).
- Mothana, R.A., Alsaid, M.S., Hasoon, S.S., Al-Mosaiyb, N.M., Al-Rehaily, A.J., Al-Yahya, M.A., Antimicrobial and antioxidant activities and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) analysis of the essential oils of *Ajuga bracteosa* Wall. ex Benth. and *Lavandula dentata* L. growing wild in Yemen, *J. Med. Plant Res.*, 6 (15), 3066-3071 (2012).

- Muthaura, C.N., Rukunga, G.M., Chhabra, S.C., Mungai, G.M., Njagi, E.N.M., Traditional Phytotherapy of Some Remedies Used in Treatment of Malaria in Meru District of Kenya, *S. Afr. J. Bot.*, 73, 402–411 (2007).
- Naghibi, F., Mosaddegh, M., Motamed, S.M., Ghorbani, A., Labiatae Family in Folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology, *Iran. J. Pharma. Res.*, 2, 63-79 (2005).
- Navarro T., El Oualidi J., Trichome morphology in *Teucrium* L. (Labiatae). A taxonomic review, *Anales Jard. Bot. Madrid*, 57, 277–297 (2000).
- Nawaz, H.R., Malik, A., Muhammad, P., Ahmed, S. ve Riaz, M., Chemical Constituents of *Ajuga parviflora*, *Z. Naturforsch.* 55b, 100-103 (2000).
- Oran, S.A.S., Al-Eisawi, D.M.H., Ethnobotanical survey of the medicinal plants in the central mountains (North-South) in Jordan, *J. Bio. Env. Sci.*, 6 (3), 381-400 (2015).
- Orhan, I., Deliorman-Orhan, D., Özçelik, B., Antiviral activity and cytotoxicity of the lipophilic extracts of various edible plants and their fatty acids, *Food Chem.*, 115, 701–705 (2009).
- Ouhaddou H., Boubaker H., Msanda F., El Mousadik A., An Ethnobotanical Study of Medicinal Plants of the Agadir Ida Ou Tanane Province (Southwest Morocco), *J. Appl. Biosci.*, 84, 7707-7722 (2014).
- Özhatay, F.N., Kültür, S., Gürdal, M.B., Check-list of additional taxa to the supplement Flora of Turkey V., *Turk. J. Bot.*, 35, 1–36 (2011).
- Preiffer, T., Sexual or clonal origin? A morpho-ecological and molecular analysis in a patch of *Ajuga reptans* L. (Lamiaceae), *Feddes Repertorium*, 116 (3-4), 183-190 (2005).
- Qureshi, R., Waheed, A., Arshad, M., Umbreen, T., Medico- Ethnobotanical Inventory of Tehsil Chakwal, Pakistan, *Pak. J. Bot.*, 41 (2), 529-538 (2009).
- Rasikari, H.L., Leach, D.N., Waterman, P.G., Spooner-Hart, R.N., Basta, A.H., Banbury, L.K., Forster, P.I., Acaricidal and Cytotoxic Activities of Extracts from Selected Genera of Australian Lamiaceae, *J. Econ. Entomol.*, 98(4), 1259-1266 (2005).
- Redzic, S.S., The Ecological Aspect of Ethnobotany and Ethnopharmacology of Population in Bosnia and Herzegovina, *Coll. Antropol.*, 31 (3), 869–890 (2007).
- Rich, T.C.G., Kay, G.M., Sydes, C., Distribution and ecology of pyramidal bugle (*Ajuga pyramidalis* L., Lamiaceae) in the British Isles, *Botanical J. Scotland*, 51 (2), 181-193 (1999).
- Sadati, N., Ostad, S.N., Karimian, Z., Ardekani, M.R. Shams., Akbarzadeh, T., Phytochemical Study and in vitro Cytotoxic Effect of *Ajuga chamaecistus* ssp. *tomentella*, *Asian J. Chem.*, 24 (7), 2871-2874 (2012).
- Sajjadi, S.E., Ghannadi, A., Volatile oil composition of the aerial parts of *Ajuga orientalis* L. from Iran, *Z. Naturforsch.*, 59, 166-168 (2004).

- Sarac, N., Ugur, A., Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey, *EurAsia. J. BioSci.*, 4, 28-37 (2007).
- Schäferhoff, B., Fleischmann, A., Fischer, E., Albach, D.C., Borsch, T., Heubl, G., Müller, K.F., Towards resolving Lamiales relationships: insights from rapidly evolving chloroplast sequences, *BMC Evol. Bio.*, 10, 352 (2010).
- Singh, N., Mahmood, U., Kaul, V.K., Jirovetz, L., A new phthalic acid ester from *Ajuga bracteosa*, *Nat. Prod. Lett.*, 20(6), 593-597 (2006).
- Sprenger, N., Keller, F., Allocation of Raffinose Family Oligosaccharides to Transport and Storage Pools in *Ajuga reptans*: the Roles of Two Distinct Galactinol Synthases, *Plant J.*, 21(3), 249–258 (2000).
- Steinmetz, E.F., *Materia Medica Vegetabilis*, Amsterdam, Holland, (1969).
- Sekercioğlu, Ç.H., Anderson, S., Akçay, E., Bilgin, R., Can, Ö.E., Semiz, G., Tavsanoğlu, Ç., Yokes, M.B., Soyumert, A., Ipekdal, K., Sağlam, I.K., Yücel, M., Dalfes, H.N., Turkey's globally important biodiversity in crisis, *Biol. Conserv.*, 144, 2752–2769 (2011).
- Taleb-Senouci, D., Ghomari, H., Krouf, D., Bouderbala, S., Prost, J., Lacaille-Dubois, M.A., Bouchenak, M., Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats, *Phytomedicine*, 16 (6–7), 623–631 (2009).
- Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M., *Farmasötik Botanik*, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 93, Ankara (2007).
- Tanker, N., *Farmasötik Botanik Uygulama*, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 85, Ankara (2002).
- Terahara, N., Callebaut, A., Ohba, R., Nagata, T., Ohnishi-Kameyama, M., Suzuki, M., Acylated anthocyanidin 3-sophoroside-5-glucosides from *Ajuga reptans* flowers and the corresponding cell cultures, *Phytochemistry*, 58 (3), 493–500 (2001).
- Terahara, N., Callebaut, A., Ohba, R., Nagata, T., Ohnishi-Kameyama, M., Suzuki, M., Triacylated anthocyanins from *Ajuga reptans* flowers and cell cultures, *Phytochemistry*, 42 (1), 199–203 (1996).
- Topçu, G., Tümen, G., Kiliç, T., Gören, A.C., Barla, A., Türkmen, Z., Kingston, D.G.I., *Bioactive Turkish Plant Extracts and Their Constituents*, *Innovations in Chemical Biology*, Springer, 61-81 (2009).
- Topcu, G., Ulubelen, A., Structure Elucidation of Organic Compounds from Natural Sources Using 1D and 2D NMR Techniques, *J. Mol. Struct.*, 834, 57-73 (2007).
- Trivellini, A., Lucchesini, M., Maggini, R., Mosadegh, H., Villamarin, T.S.S., Vernieri, P., Mensuali-Sodi, A., Pardossi, A., Lamiaceae phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress”, *Ind. Crop. Prod.*, 83, 241–254 (2016).
- Turker, H., Yıldırım, A.B., Karakaş, F.P., Sensitivity of Bacteria Isolated from Fish to Some Medicinal Plants, *Turk. J. Fish. Aquatic Sci.*, 9, 181-186 (2009).

- Turkoglu, S., Turkoglu, I., Kahyaoglu, M., Celik, S., Determination of antimicrobial and antioxidant activities of Turkish endemic *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *euphratica* P.H. Davis (Lamiaceae), *J. Med. Plant Res.*, 4 (13), 1260-1268 (2010).
- Tümen, G., Malyer, H., Başer, K.H.C., Öz Aydın, S., Plants used in Anatolia for wound healing, *Proceedings of the IVth International Congress of Ethnobotany (ICEB 2005)*, 217-221 (2006).
- Ulukanli, Z., Ulukanli, S., Ozbay, H., İlçim, A., Tuzcu, M., Antimicrobial Activities of Some Plants from the Eastern Anatolia Region of Turkey, *Pharm. Biol.*, 43 (4), 334-339 (2005).
- Upadhyay, S.U., Patel, V.B., Patel, A.A., Upadhyay, U.M., Patel, N.M., *Ajuga bracteosa*: A Promising Herb, *Pharma S. M.*, 3 (3), 2085-2104 (2012).
- Uysal, S., Aktumsek, A., A phytochemical study on *Potentilla anatolica*: An endemic Turkish plant, *Ind. Crop. Prod.*, 76, 1001–1007 (2015).
- Varol, O., Ilcim, A., Tatli A., New Observation on Two Poorly Known Turkish Species, *Thaiszia Kosice*, 8, 53-56 (1998).
- Velasco-Negueruela, A., Pérez-Alonso, M.J., Palá-Paül, J., Iñigo, A., Sanz, J., Volatile Constituents of the Essential Oil of *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber. ssp. *chamaepitys* from Spain, *J. Essent. Oil Res.*, 16 (4), 372-373 (2004).
- Xu, D., Huang, Z., Cen, Y.-J., Chen, Y., Freed, S., Hu, X.-G., Antifeedant activities of secondary metabolites from *Ajuga nipponensis* against adult of striped flea beetles, *Phyllotreta striolata*, *J. Pest Sci.*, 82 (2), 195-202 (2009).
- Yaldız, G., Some Antimicrobial Activity Plants Growing in Rize Region Used in Alternative Medicine, *J. Life Sci.*, 6, 624-631 (2012).
- Yıldız, B., Aktoklu, E., *Bitki Sistematığı*, Palme Yayıncılık, Ankara, (2012).
- Yuan, Y.W., Mabberly, D.J., Steane, D.A., Olmstead, R.G., Further disintegration and redefinition of *Clerodendrum* (Lamiaceae): implications for the understanding of the evolution of an intriguing breeding strategy, *Taxon*, 59 (1), 125–133 (2010).
- Yumrutas, O., Saygideger, S.D., Sokmen, M., DNA Protection and Antioxidant Activities of *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber Essential Oil and its Volatile Compounds, *Jeobp* 15 (4), 526-530 (2012).
- Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., Benjelloun, W., Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco, *J. Ethnopharmacol.*, 58, 45–54 (1997).
- http-1** IUCN Red List of Threatened Species, http://www.iucnredlist.org/static/categories_criteria_2_3 (22.04.2015).