

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

***IN VITRO VE IN VIVO* OLARAK YETİŞTİRİLEN VE DOĞAL
ORTAMDAN TOPLANAN *URTICA DIOICA* L. BİTKİSİNDE TOTAL
PROTEİN VE PEROKSİDAZ (POX) İÇERİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Sibel GÜMÜŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 21/06/2013

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Cüneyt AKI

ÇANAKKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

SİBEL GÜMÜŞ tarafından DOÇ. DR. CÜNEYT AKI yönetiminde hazırlanan “*IN VITRO VE IN VIVO OLARAK YETİŞTİRİLEN VE DOĞAL ORTAMDAN TOPLANAN URTICA DIOICA L. BİTKİSİNDE TOTAL PROTEİN VE PEROKSİDAZ (POX) İÇERİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI*” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Cüneyt AKI

Danışman

Prof. Dr. Hakan TURHAN

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Okan ACAR

Jüri Üyesi

Sıra No :

Tez Savunma Tarihi: 21/06/2013

Doç. Dr. Zeki KARACA

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Sibel GÜMÜŞ

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, tüm sabır ve özverisi ile bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Cüneyt AKI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında her ihtiyacım olduğunda yardımına koşan ve bana ışık tutan sevgili hocam Arş. Gör. Dr. Nurşen Çördük'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Yüksek lisansım boyunca gerek ders, gerek laboratuvar çalışmaları, gerekse yazım aşamasında hep yanımda olup manevi ve fiziki desteklerini benden esirgemeyen arkadaşlarım Gülru Yücel, Arş. Gör. Rabia Özlem KIPRAK, Arş. Gör. Nihan Akıncı, Çilem ÖZAYAZ, Didar GÜZEY, Deniz ÇAKMAK, Merve BALLI ve Mustafa Eray BOZYEL'e teşekkür ederim.

Değerli bilgilerini tüm içtenliği ile benimle paylaşan hocam Arş. Gör. Dr. Sefer Demirbaş'a teşekkür ederim.

Bitkimin doğal ortamdan toplanan örneklerini her ihtiyacım olduğunda büyük bir titizlikle toplayıp bana getiren değerli arkadaşım Güral KUZU'ya çok teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında desteklerini hep hissettiğim, beni daima ilerleme konusunda yönlendiren, bana olan inanç ve güvenlerini hep bildiğim ve yaşamım boyunca haklarını asla ödeyemeyeceğim canım annem Emine GÜMÜŞ ve canım babam Mehmet GÜMÜŞ'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sibel GÜMÜŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

POX	Peroksidaz
mg	Miligram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
nm	Nanometre
cm	Santimetre
m	Metre
%	Yüzde oranı
L	Litre
BSA	Bovine Serum Albumin
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
MS	Murashige Skoog
g	Gram
kg	Kilogram
CAT	Katalaz
SOD	Süperoksit Dismütaz
C	Karbon
H	Hidrojen
N	Azot
Mg	Magnezyum
NAA	Naftalenasetik asit
BAP	Benzil amino pürin
YA	Yaş Ağırlık
ROT	Reaktif Oksijen Türleri

ÖZET

IN VITRO VE IN VIVO OLARAK YETİŞTİRİLEN VE DOĞAL ORTAMDAN TOPLANAN *URTICA DIOICA* L. BİTKİSİNDE TOTAL PROTEİN VE PEROKSİDAZ (POX) İÇERİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Sibel GÜMÜŞ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Doç. Dr. Cüneyt AKI

21/06/2013, 65

Tamamlanan araştırmamızda tıbbi ve ekonomik açıdan oldukça önemli olan, *in vitro*, *in vivo* ortamlarda yetiştirilen ve doğal ortamdan toplanan 10 haftalık *Urtica dioica* L. türünün taze yapraklarından hazırlanan özütlerde total protein, peroksidaz [EC 1.11.1.7], klorofil ve karotenoid analizleri karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir. Analizler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. *U. dioica* türünün yaprak özütlerinden hazırlanan homojenantlardan yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda, tüm örnekler arasında en yüksek protein ve karotenoid miktarı doğal ortamdan alınan örneklerde sırası ile 0,384mg/mL ve 0,0004mg/gYA olarak saptanmıştır. Yapılan analizler sonucunda total protein değerlerindeki değişimler incelendiğinde, doğal ortamdan toplanan bitkilerin protein değerleri *in vivo* ortamda yetiştirilenlerden % 50,78, *in vitro* ortamdakilerden ise % 23,85 daha yüksek bulunmuştur. Toplam klorofil miktarı *in vitro* ortamda yetiştirilen bitkilerden alınan örneklerde 1,134mg/gYA, *in vivo* yetiştirilen bitkilerden alınan örneklerde 1,266mg/gYA, doğal ortamdan toplanan örneklerde ise 1,039mg/g YA olarak saptanmıştır.

In vivo ve *in vitro* ortamlarda yetiştirilen fideler protein, klorofil, karotenoid açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında ise *in vitro* ortamda yetiştirilen fidelerin tüm bu değerler açısından daha yüksek sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Peroksidaz aktivitesi *in vivo* ortamda yetiştirilen örneklerde 57,32, *in vitro* ortamda yetiştirilen örneklerde 43,39 ve doğadan toplanan örneklerde ise 25,69 $\mu\text{mol/mgprot/dk}$ olarak saptanmıştır. Bu farklılığın sebebinin, *in vivo* ve *in vitro* ortamda yetiştirilen fidelerde ortam şartlarına bağlı

olarak meydana gelen kısıtlayıcı faktörlerin bitki üzerinde yaratmış olduğu stres olabileceği düşünülmektedir. *Urtica dioica* bitkisinin yetiştiriciliği açısından en uygun alanın doğal ortam olduğu ancak bitkinin tıbbi ve ekonomik önemi düşünüldüğünde daha homojen ve daha fazla sekonder metabolit elde edilebilmesi açısından *in vitro* yetiştiriciliğin de rahatlıkla kullanılabilmesi ortaya konmuştur.

Anahtar sözcükler: *Urtica dioica* L., klorofil, karotenoid, protein, peroksidaz

ABSTRACT

COMPARISON OF TOTAL PROTEIN AND PEROXIDASE (POX) DIFFERENCES OF *IN VIVO* AND *IN VITRO* GROWTH AND NATURALLY SPREAD *URTICA DIOICA* L. SPECIES

Sibel GÜMÜŞ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Biological Science

Advisor : Assoc. Prof. Dr. Cüneyt AKI

21/06/2013, 65

In this research, 10 weeks old seedlings of *Urtica dioica* L. plants which is economically and medical important were grown under *in vivo* and *in vitro* conditions. Some of the samples were collected from their natural habitat. Then comparative analysis of total protein, peroxidase [EC 1.11.1.7] chlorophyll and carotenoids were carried out in fresh leaf extracts of 10 weeks old seedlings of *Urtica dioica* L. All experiments were conducted with tree replicates. As a result of the spectrophotometric measurements, plant extracts obtained from the plants in natural environment had the highest amount of protein and carotenoids 0.384 mg/ mL and 0.0004 mg/g FW respectively. At the end of analyses total protein levels in which plants collected from nature were higher than *in vivo* grown *U. dioica* plants as 50.78 % and higher than 23.85% for *in vitro* plants. Total chlorophyll contents in fresh leaf of *U. dioica* plants were measured *in vitro* condition, *in vivo* condition and natural environment as 1.134 mg/g, 1.266mg/g, 1.039mg/g respectively. Comparison seedlings grown *in vivo* and *in vitro* conditions according to protein, chlorophyll and carotenoid amounts showed that *in vitro* grown seedlings were superior to *in vivo* grown seedlings. Peroxidase activity of *in vivo*, *in vitro* and natural plants were measured as 57.32, 43.39 and 25.69± µmol/mgprot/min., respectively. The reason for this difference among *in vivo*, *in vitro* grown and natural seedlings can be attributed to limiting factors in culture conditions which is showing itself as a stress factor.

In our research, natural condition was found the most suitable environment for *Urtica dioica* in terms of take into account medicinal and economical importance of this

plant, our results show that much more homogenous and secondary metabolites can be obtained from *U. dioica* cultures *in vitro* conditions.

Keywords: *Urtica dioica* L., chlorophyll, carotenoid, protein, peroxidase.

İÇERİK

Sayfa

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	viii
BÖLÜM 1 - GİRİŞ.....	1
1.1. Genel Bilgi	1
1.2. Bitkisel Pigmentler	2
1.2.1. Klorofiller	3
1.2.2. Karotenoitler	4
1.3. Peroksidaz (POX)	5
BÖLÜM 2 - ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	8
2.1. <i>Urtica dioica</i> (Büyük Isırgan Otu) Bitkisi	8
2.1.1. Urticaceae familyasının genel özellikleri	8
2.1.2. <i>Urtica</i> cinsinin genel özellikleri	8
2.1.3. <i>Urtica</i> türlerine ait tayin anahtarı	9
2.1.4. <i>Urtica dioica</i> türünün genel özellikleri	9
2.1.4.1 Morfolojik özellikleri	9
2.1.4.2.Habitat	10
2.1.4.3. Tarımı	11
2.1.4.4. Üretim şekli	11
2.1.5. <i>U. dioica</i> bitkisinin tıp dışı kullanım alanları	12
2.1.5.1. Besin olarak kullanımı.....	12
2.1.5.2. Kâğıt, bez, iplik yapımında kullanımı.....	13
2.1.5.2.1. Isırgan otu lifinin tekstilde kullanımı.....	14
2.2.5.2.2. Lif eldesi.....	14
2.1.5.3. Boyacılıkta kullanımı.....	15
2.1.5.4. Gübre olarak kullanımı.....	15
2.1.5.5. Tarımsal mücadelede kullanımı	16
2.1.5.6. Kozmetikte kullanımı	16
2.2. Bitkilerin Tıbbi Olarak Kullanım Alanları	16
2.2.1.Etnobotanik çalışmalar	16

2.2.2. Tıbbi bir bitki olarak <i>Urtica dioica</i>	19
2.2.2.1. <i>U. dioica</i> bitkisinin farmakolojik özellikleri	19
2.2.2.1.1. Toprak üstü kısımları	19
2.2.2.1.1.1. Flavonoitler	19
2.2.2.1.1.2 Fenolik bileşikler	20
2.2.2.1.1.3. Mineraller	20
2.2.2.1.1.4. Aminler	20
2.2.2.1.1.5. Pigmentler ve karotenoitler	21
2.2.2.1.1.6. Tanenler	21
2.2.2.1.1.7. Lipitler	21
2.2.2.1.2. Kök kısımları	22
2.2.2.1.2.1. Lektinler	22
2.2.2.1.2.2. Lignanlar	22
2.2.2.1.2.3. Steroitler	22
2.2.2.2. <i>U. dioica</i> ile etnobotanik çalışmalar	23
2.2.2.3. <i>U. dioica</i> ile ilgili diğer biyolojik aktivite çalışmaları	26
2.3. Antioksidant Enzimler ve Pigment İçerikleri ile İlgili Yapılan Çalışmalar	28
2.4. Öncül Savunma Enzimlerinden Peroksidaz (POX) [EC 1.11.1.7]	30
2.5. Doku Kültürü	30
2.5.1. Doku kültürü uygulama alanları	31
2.5.2. Doku kültüründe temel aşamalar	32
2.5.3. Doku kültürü besi ortamı bileşenleri	33
2.5.4. Bitki doku kültür şartları	36
BÖLÜM 3 - MATERYAL VE YÖNTEM	37
3.1. Materyal	37
3.1.1. Bitkisel materyal	37
3.1.2. Kimyasal maddeler	37
3.1.1. Sarf Malzemeleri	38
3.2. Yöntem	38
3.2.1. <i>In vivo</i> yetiştiricilik	38
3.2.2. <i>In vitro</i> yetiştiricilik	38
3.2.2.1. Bitki büyüme düzenleyicilerinin hazırlanması (10mg/10ml)	39
3.2.3. Doğadan toplama	39
3.2.3. Yaprak ekstraktlarının hazırlanışı	40
3.2.3.1. Klorofil ve karotenoid tayini için	40

3.2.3.2. Total protein ve peroksidaz (POX) tayini için	40
3.2.4. Standart çözeltilerin hazırlanması	41
3.2.4.1. Sodyum asetat tamponu	41
3.2.4.2. Brilliant blue G-250 ayıracı	41
3.2.4.3. Pyrogallol (0.1M)	41
3.2.4.4. Hidrojen peroksit (90 mm).....	41
3.2.5. Analizler	41
3.2.5.1. Klorofil ve karotenoidlerin analizi	41
3.2.5.2. Protein analizi	42
3.2.5.3. POX [EC 1.11.1.7] enzim aktivitesi analizi.....	433
BÖLÜM 4 - ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	44
4.1. Bitkisel Materyalin Yetiştiriciliği ile İlgili Sonuçlar	44
4.1.1 <i>In vivo</i> yetiştiricilik sonuçları.....	44
4.1.2 <i>In vitro</i> yetiştiricilik sonuçları.....	45
4.2. <i>Urtica dioica</i> L. Türünde Total Protein Bulguları.....	48
4.3. <i>Urtica dioica</i> L. Türünde Peroksidaz (POX) Bulguları.....	49
4.4. <i>Urtica dioica</i> L. Türünde Klorofil ve Karotenoid Bulguları.....	50
4.5. Tartışma.....	51
BÖLÜM 5 - SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	56
Çizelgeler	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekiller	IIHata! Yer işareti tanımlanmamış.
Özgeçmiş	III

BÖLÜM 1**GİRİŞ****1.1. Genel Bilgi**

Doğadaki tüm hayvanlar, bitkiler ve insanlar bir dengenin ürünüdürler. Yaşam için vazgeçilmez bir öneme sahip olan bitkiler; doğrudan veya dolaylı olarak ekolojik hayatın devamlılığının ve doğal dengesinin kaynağıdır. Mitolojide bitkiler tanrıların insana verdiği en değerli armağan olarak ele alınmıştır. Tüm bitkiler insanın hizmetindedir (Gezgin, 2006).

İnsanın varoluşundan itibaren bitkilerle olan ilişkisi başlamıştır. İlk çağlardan kalan arkeolojik bulgulara göre insanlar, besin elde etmek ve sağlık sorunlarını gidermek için öncelikle bitkilerden faydalanmışlardır. Deneme yanılma yoluyla elde edilen bu bilgiler, çağlar boyunca kullanım şekillerindeki bazı değişiklik ve gelişmelerle günümüze kadar ulaşmıştır (Koçyiğit, 2005).

İnsanlık tarihi boyunca birçok hastalık (şeker hastalığı, sarılık, nefes darlığı vb.) bitkiler kullanılarak tedavi edilmeye çalışılmış ve çalışılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünyada yaklaşık 4 milyar insanın sağlık sorunlarını ilk etapta bitkisel droglarla gidermeye çalıştıklarını bildirmektedir (dünya nüfusunun %80'i). Ayrıca, gelişmiş ülkelerde reçeteli ilaçların yaklaşık % 25'ini bitkisel kökenli etken maddeler (vimbilastin, rezerpin, kinin, aspirin vb.) oluşturmaktadır (Farnsworth ve ark., 1985).

Dünyada sayısı 750 000 - 1 000 000 arasında olduğu tahmin edilen bitki türünün 500 000 kadarı tanımlanıp isimlendirilmiştir. Her yıl 2000 civarında yeni tohumlu bitki türü tanımlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü raporuna göre, dünya üzerinde tıbbi amaçlarla kullanılan yaklaşık 70 000 bitkinin 21 000 kadarı ilaç sanayinde kullanılmaktadır.

Türkiye Florası "Flora of Turkey and The East Aegean Islands" kitabına göre, Türkiye 174 familyaya ait 1251 cins ve 12 000'den fazla tür ve tür altı taksonu (alt tür ve varyete) ile oldukça zengin bir floraya sahiptir (Davis,1982; Güner ve ark., 2000). Bu taksonların 234'ü yabancı kaynaklı ve kültür bitkisidir. Geriye kalan diğer türler ise yurdumuzda doğal yayılış gösteren bitkilerdir (Ekim ve ark., 1989; Erik ve ark, 2004).

Türkiye'de tıbbi olarak kullanılan bitkilerin sayısı kesin olarak bilinmemekle birlikte, 500 civarında olduğu tahmin edilmekte; yaklaşık 200 tıbbi ve aromatik bitkinin ihraç potansiyelinin olduğu belirtilmektedir (Baytop, 1999; Ekim ve ark., 2000).

Tıbbi bitkiler, hastalıkları içerdikleri fitokimyasallar (uçucu yağlar, alkoloitler, glikozitler, heterozitler, tanenler, lipidler, flavonozitler, müsilajlar, zamklar, saponozitler vb.) sayesinde tedavi eder veya bu hastalıkları önlerler. Bitkisel drog genel olarak tıbbi

bitkilerin ilaç olarak kullanılan ham kısımlarını ifade eder. Bazı kaynaklar işlenmiş halini de (tentür, ekstre vb.) bitkisel drog olarak isimlendirmektedir (Kendir ve Güvenç, 2010).

Urticaceae familyasından çoğunlukla *Urtica dioica* (büyük ısırgan otu) ve bazen de *Urtica urens* (küçük ısırgan otu) türlerinden drog elde edilmektedir. Ticari madde olarak kullanılan drog, Orta ve Doğu Avrupa’da yabani olarak toplanır, Kuzey Amerika’da kültürü yapılmaktadır. Bitkinin toprak üstü ve toprak altı kısımları kuru veya yaş olarak hastalıklara karşı kullanılmaktadır (Ayan ve ark., 2006). Türkiye’deki organik üretimi 2008 yılında 77.71 ton olarak belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Türkiye’de bazı tıbbi ve aromatik bitkilerin organik üretimi (Ton) (Anonim d., 2013)

Bitkiler	2005	2006	2007	2008
Adaçayı	581.22	1060.45	476.47	404.91
Anason	287.34	345.42	382.14	409.14
Biberiye	411.81	332.37	558.94	500.67
Ebegümeci	101.19	102.15	0.79	103.47
Gül	304.54	283.41	449.99	347.17
Hayıt	162.60	174.20	285.05	170.65
Isırgan Otu	173.45	257.80	103.25	77.71
Kantaron	116.12	60.10	60.55	0.60
Kapari	662.80	369.80	420.05	268.5
Karahan	140.00	225.00	235.00	300.00
Keçiboynuzu	2842.65	2137.00	2065.00	2142.6
Kekik	1912.22	2876.20	1623.58	1682.4
Kimyon	214.68	918.70	328.91	881.0
Melisa	45.74	136.15	76.05	26.45
Mersin	530.05	350.06	105.99	304.56

1.2. Bitkisel Pigmentler

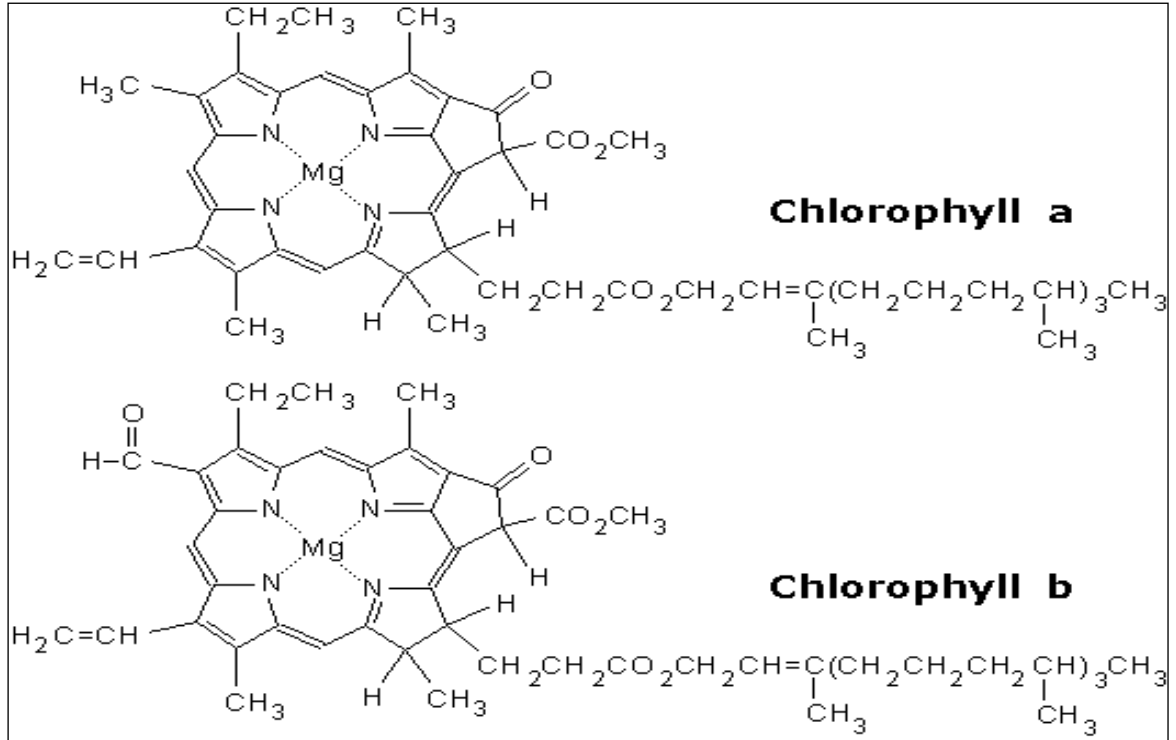
Bitkinin kök, gövde, yaprak, meyve vb. kısımlarına renk veren moleküller bitkisel pigmentler olarak adlandırılmaktadır. Bitkiye renk veren pigmentlerin tüm bilgisi bitki DNA’sında kodlanmış durumdadır. Bu yüzden ki bir bitki türü habitatı neresi olursa olsun hep benzer özelliklere sahip olmaktadır. Bitkinin var olan rengini belirleyen başlıca etken genetik faktörler olsa da besin maddeleri, sıcaklık ve ışık gibi çevresel faktörler de pigmentlerin etkinlik derecesini belirlemede rol oynamaktadırlar. Aynı zamanda bu pigmentlerin sentezlenmesini engelleyen mutasyonlar taç yaprak veya meyve renklenmesini etkilerler (Ratkin ve ark., 2003).

Bitkilerde bulunan başlıca pigmentler;

- Klorofiller (Klorofil a, Klorofil b)
- Karotenoidler (Karoten, Likopen, Ksantofiller)

1.2.1. Klorofiller

Birbirinden kolaylıkla ayırt edilebilen en az sekiz farklı klorofil tipi olduğu bilinmektedir. Bunlar klorofil a, b, c, d, e, bakteriklorofil a, b ve klorobium klorofildir. Klorofillerin fotosentez açısından en önemli iki tipi klorofil a ve b'dir. Klorofil a mavimsi yeşil ve klorofil b sarımsı yeşil renkte olup, klorofil a fotosentezin ışık reaksiyonunu başlatırken, klorofil b fotosentezde yardımcı pigment olarak rol almaktadır. Klorofil pigmenti genel olarak C, H, O, N ve Mg elementlerinden oluşur. Klorofil a ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$), klorofil b ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$) kapalı formülleriyle gösterilirler (Şekil 1).



Şekil 1. Klorofil a ve klorofil b (Anonim b., 20013).

Her iki klorofil için de maksimum ışık absorpsiyonu mavi-mor ışınlar bölgesinde olup klorofil a için en yüksek 429 nm, klorofil b için 453 nm dalga boyundadır. Her iki klorofil için ikinci maksimum ışık absorpsiyonu kırmızı ışınlar bölgesinde oluşur. Klorofil a için 660 nm ve klorofil b için 642 nm dalga boyundadır. Klorofil sentezi ışıktan başka

faktörlerden de etkilenir. Örneğin ortamdaki N, Mg ve Fe eksikliği klorofil oluşumunu geciktirir veya azaltır. Bu nedenle bu elementlerin eksikliğinde yaprakların açık yeşil veya sarı renk aldıkları görülür. Klorofil önemli bir fonksiyona sahiptir. Güneş ışığını kullanarak bitkinin büyüme ve gelişmesinde önemli role sahip olan karbonhidratları oluşturur (Karakurt ve Aslantaş, 2008).

Klorofil özleri boya olarak yaygın bir şekilde mürekkepler, reçineler, sabun ve mumlar, yenebilir yağlar, kozmetik, losyonlar, parfüm, ağız gargaraları ve deri gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Bazı deneysel veriler klorofilin anti-mutajenik olabileceğini de düşündürmektedir. Ayrıca toksinlere karşı korunmak ve bazı ilaçların yan etkilerini iyileştirmek amacıyla anti-karsinojenik potansiyele sahip olabileceği de düşünülmektedir (Hojnik ve ark.,2007).

1.2.2. Karotenoitler

Karotenoidler, fotosentetik mikroorganizmaların ya da bitkilerin metabolizma için temel rol oynayan kısımları tarafından sentezlenirler (Tee, 1992). Yaşayan organizmalardaki pek çok pigment (karotenoidler, klorofiller, antosiyaninler ve porfirinler) çok çeşitli renk oluşumundan sorumludur. Karotenoid isminin *Daucus carota* havuç kökünde baskın pigment olmasından ileri geldiği düşünülmektedir ve karotenoidler renk pigmentleri içinde en yaygın bulunan, oldukça önemli bir pigmenttir; bitkilerden, balık, kuş ve diğer hayvanlara kadar doğada pek çok canlıda bulunmaktadır. Açık sarıdan koyu kırmızıya varan farklı tonlarda renk oluşumundan sorumlu olan karotenoidler, proteinlerle kompleks oluşturduklarında yeşil ve mavi renk verirler (Tee, 1992; Britton, 1995; Francis, 1985).

Karotenoidler olarak sınıflandırılan bileşikler çoğu bitkide oluşan renkli terpenler ve ya terpen türevleridir. Pek çok bitkinin yapraklarında mavi-yeşil ve mavimsi ışığı absorbe eden, sarı ışığı yansıtması nedeniyle bu şekilde görünmektedirler. Karotenoidler tarafından absorbe edilen ışık enerjisi fotosentezde kullanılmak üzere klorofile taşınmaktadır. Karotenoidlerin fotosentezde yardımcı pigment olarak görev almasından başka klorofillerin ışık ve oksijen karşısında parçalanmasını da (Fotooksidasyon) engellerler. Doğal bitki pigmentleri arasında, biyolojik yapılarındaki değişimler ve yüksek seviyedeki yapısal farklılıklarla karotenoidler geniş dağılım göstermektedir. Doğada 600'den fazla karotenoid bulunmasına karşın bunlardan ancak 40 tanesinin düzenli olarak diyetle tüketildiği bildirilmektedir (Kopsell ve Kopsell, 2006).

Karotenoidler, ikincil bitki pigmentleridir ve 40 karbonlu izoprenoid polien yapıdan oluşmaktadır. Karotenoidler; lutein, zeaksantin, violaksantin gibi oksijen içeren ksantofiller ile β -karoten, α -karoten, likopen gibi hidrokarbon karotenler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Simpson, 1985).

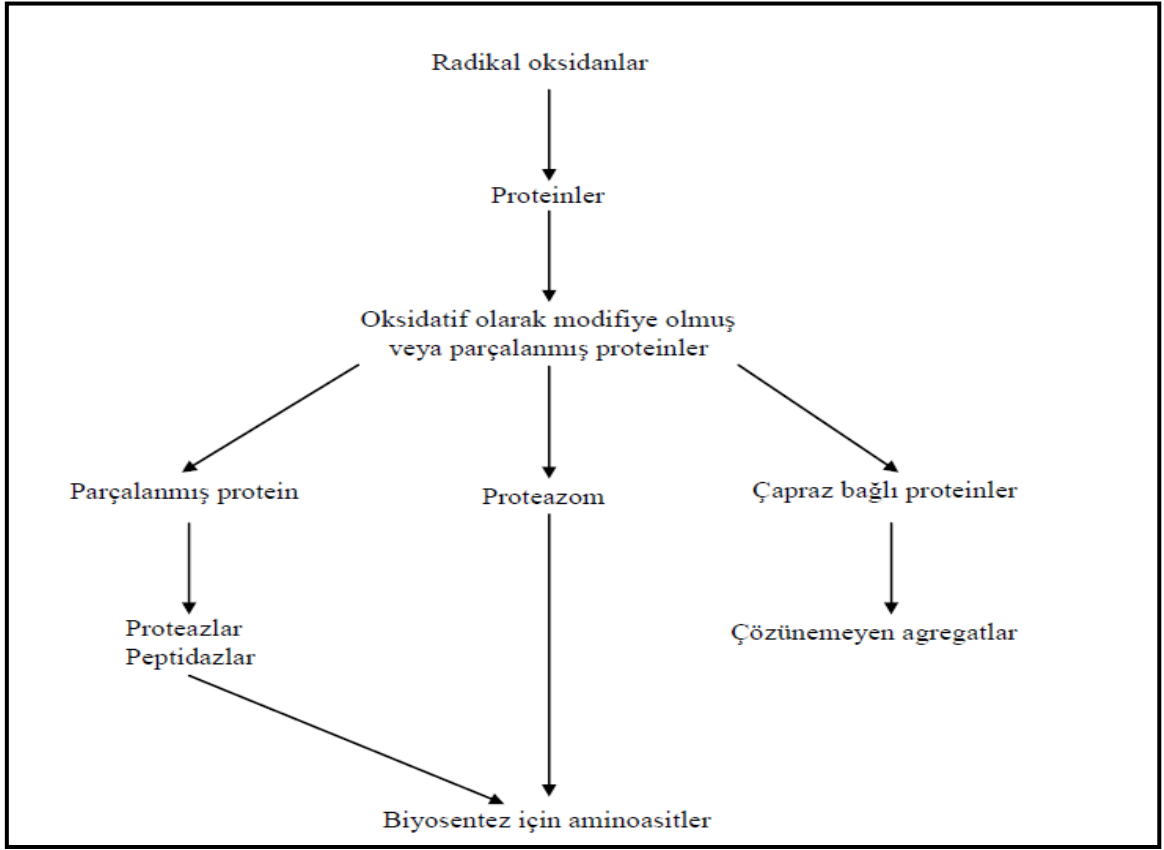
Karotenoidlerin özellikle konjuge karbon-karbon çift bağ sisteminden dolayı tekli oksijeni yakalayarak antioksidant özellik gösterdikleri bilinmektedir (Stahl ve ark., 1998).

1.3. Peroksidaz (POX)

Atomik yada moleküler yapılarda çiftlenmemiş bir veya daha fazla tek elektron taşıyan moleküllere serbest radikal denir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen türleri (ROT)'de denilmektedir. Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir (Çavdar ve ark., 1997).

Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar vitamin A, C, E, koenzimQ10, selenyum, çinko gibi mineraller, melatonin hormonu, karotenoidler; likopen, α -karoten, β -karoten, lutein, zeaksantin, astaksantin, flavonoller; quercetin, rutin, tanninlerdir. Enzimatik antioksidan grubunda ise Katalaz (CAT), Peroksidaz (POX) [H_2O_2 'nin moleküler oksijene dönüşümünü katalizler], Askorbat peroksidaz (APX) [H_2O_2 'nin su ve monodehidroaskorbata dönüşümünü katalizler], Glutasyon redüktaz (GR) [okside glutasyonu (GSSH) indirgenmiş Glutatyona (GSH) katalizler] ve Glutasyon peroksidaz [hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzim], Glutasyon S-transferaz [başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar] bulunmaktadır (Koç ve Üstün, 2008).

Oksidatif stres durumunda reaktif oksijen ve azot türlerinin miktarında artış olur ve Dolayısı ile bu ürünlerin reaksiyon hızları artar. Bu durumdan başta lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere metabolizmadaki birçok sistem olumsuz etkilenir (Şekil 2) (Lambeth, 2004).



Şekil 2. Serbest oksijen radikallerinin proteinlere etkisi (Akkuş, 1995).

Reaktif bir tür olan H_2O_2 suda rahatlıkla çözünebilen ve mekanizması bilinmemesine rağmen hücre membranından su gibi kolaylıkla geçebilen bir moleküldür. Genellikle 50 μM ve üzeri konsantrasyonlardaki H_2O_2 , muamele süresine ve fizyolojik şartlara bağlı olmakla beraber birçok hayvan, bitki ve bakteri hücre kültürü üzerine toksik etkiye sahiptir. Bu sebeple H_2O_2 'in in vivo olarak çok toksik olduğu ve hızlı bir şekilde uzaklaştırılması gerektiği düşünülmektedir. Bu da katalaz ve peroksidaz enzimleri tarafından yapılmaktadır (Gutteridge, 1989; Aruoma, 1998). Peroksidaz bitkilerdeki çoklu savunma sisteminin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır ve bitkilerin çoğunda kloroplastlarda sentezlenmektedir (Malolepsa ve Urbanek, 1994). Hidrojen peroksidin oluşumu ve peroksidaz faaliyeti şekil 3'de gösterilmektedir.



Şekil 3. Süperoksit dismutaz (SOD) ve peroksidaz (POX) faailyeti (Anonim c., 2013).

Araştırmamızın amacını, tıbbi anlamda yaygın ve farklı kullanım alanları olan, ekonomik anlamda çeşitli sektörlerde kullanımı bulunan *Urtica dioica* L. türünün *in vivo*, *in vitro* ortamlarda yetiştirilen ve doğal ortamdan toplanmış olan örneklerinin yaprak ekstraktlarından total protein ve peroksidaz içeriklerinin karşılaştırılması oluşturmaktadır.

Savunma mekanizmasının *in vivo* ve *in vitro* ya da doğal koşullardan hangisinde daha fazla uyarıldığı belirlenmiştir. Farklı ortamlarda yetiştirilen ve gelişen bitkilerin bu ortamlarda vermiş oldukları fizyolojik cevaplar protein ve öncül savunma enzimlerinden peroksidaz [EC 1.11.1.7] düzeyinde saptanmıştır. Toplam klorofil, karotenoid miktar tayinleri yolu ile de pigment içerikleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca yapılan literatür araştırmalarında *Urtica dioica* L. türü ile ilgili daha önce yapılmış olan bir doku kültürü çalışmasına da rastlanmamıştır. Araştırmamız sonucunda bitkinin doku kültürü ortamına uyum sürecinin optimizasyonu sağlanmıştır.

BÖLÜM 2**ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR****2.1. *Urtica dioica* (Büyük Isırgan Otu) Bitkisi****2.1.1. Urticaceae familyasının genel özellikleri**

Bu bitkiye Romalılar “Urtica”, İngilizler “Nettle”, Almanlar “Brennessel”, İtalyanlar “Ortica”, Fransızlar “Ortie“, İspanyollar “Ortiga” olarak isimlendirmişlerdir. Urtica ismi Latince Uro (yakmak) ve Ürere (sokmak) manasındadır.

Urtica dioica türünün sistematigi:

Sınıfı: Magnoliopsida

Takımı: Urticales

Familyası: Urticaceae

Cinsi: *Urtica*

Tür: *Urtica dioica*

Dünya üzerinde yaygın dağılım gösteren familyada yaklaşık 79 cins 2600 tür bulunmaktadır. Ülkemizde 2 cins ve 9 türü vardır. Çoğunlukla otsu veya çalı şeklindeki bitkilerin yer aldığı familyada küçük ağaç ve tırmanıcılara da rastlanmaktadır.

Bir ya da iki evcikli, süt içermeyen, tek ya da çok yıllık otsular ya da çalılar, nadiren ağaçlar ya da tırmanıcılardır. Birçok cinsinde yakıcı tüyler bulunur. Yapraklar basit; almaçlı ya da karşılıklıdır. Çiçekler yaprak koltuklarında kimoza durumunda ya da tek çiçeğe kadar indirgenmiş, tek ya da iki eşeylidir. Periant ışımsal simetrik, 4-5 parçalı, erkek çiçekte Stamenler 4; filamentler tomurcukta çiçeğin ortasına doğru kıvrıktır. Çiçek açılınca filamentler aniden geriye doğru gider ve böylece polenler etrafa yayılır. Dişi çiçekte, Stamenler pul şeklinde körelmiş, ginekeum 1 pistilli, ovaryum üst ya da alt durumlu, 1 lokuluslu, 1 karpelli, 1 ovüllüdür. Plasentasyon bazaldır. Meyve kalıcı periant ile örtülü aken ya da drupadır.

2.1.2. *Urtica* cinsinin genel özellikleri

Tek veya çok yıllık, üzeri batıcı tüylerle kaplı otsu bitkiler. Yapraklar opozit dizilişli, dentat, stipulalı. Yaprak koltukçuklarındaki yalancı spikalar rasemoz, nadiren salkım halinde globoz. Çiçekler yeşil renkli, monoik veya dioik. Erkek çiçeklerde eşit 4 periant

parçası ve 4 stamen gelişmemiş ovaryum etrafında dizilmiş, dişi çiçekler de tetramer, fakat periant parçalı ikili çift halinde bulunmaktadır.

Anavatanı Avrasya'dır. Kuzey yarıkürenin ılıman bölgelerinde, özellikle duvar, çit ve tarla kenarlarında doğal olarak yetişmektedir.

2.1.3. *Urtica* türlerine ait tayin anahtarı

1. Stipulalar, her nodusta 2 adet ise, konnat çiftler halinde; erkek çiçek durumu eksenli 2 kanatlımembranaceae

1'. Stipulalar tamamen serbest, her nodusta 4 adet; erkek çiçekler dişilerle karışmış veya ayrı çiçek durumları halinde ise çiçek durumu eksenli kanatlı değil

2. Ana sap yaprakları lanseolat, 3-4 X uzunluğa kadar genişlikte; yaprak yüzeyi görünür batıcı tüyler taşıyor.....hausknechtii

2'. Ana sap yaprakları ovat, 3 X uzunluğu kadar genişlikten daha az; yaprak yüzeyi belirgin bazen dağınık batıcı tüylerle kaplı.

3. Dişi çiçekler globoz, saplı çiçek durumu halinde

.....pilulifera

3' Dişi çiçekler erkeklerle karışmış veya ayrı fakat spikaya benzer çiçek durumunda.

4. Monoik, tek yıllık, piloz dişi periant parçalarının kenarları boyunca meyve verirler

.....urens

4'Dioik, çok yıllık, piloz dişi periant parçalarının bütün yüzeyi boyunca meyve verirlerdioica

(Davis 1982)

2.1.4. *Urtica dioica* türünün genel özellikleri

Urtica dioica adı, yaprağın üzerine dokununca yakan ince tüylerle kaplı olduğundan yakan anlamına gelen 'urere' ve iki ev anlamına gelen, erkek ve dişi çiçeklerin ayrı bireylerde olması (dioik-iki evcikli) durumundan dolayı kelimelerinden türetilmiştir. Çok yıllık ve otsu bir bitkidir.

2.1.4.1 Morfolojik özellikleri

Yaygın dağılım gösteren, birbirine dolanmış kök sistemi bulunan, kümeler oluşturan, 30-150 cm boyunda bir bitkidir. Özellikle Türkiye'de yetişen türü dioik, nadiren monoiktir. Yapraklar geniş kısımda ovat, daralan kısımda lanseolatır.

Yaprağın boyutları 4-11 x 3-10 cm, dentat ve akuminattır. Dişi ve erkek çiçek durumları benzer formdadır, 8 cm ye kadar uzayan dallanmış yapılardır. Dişi çiçekler göze çarpan eflatun renkli penisillat stigma taşırlar. Periantın iç taraftaki çift segmenti 1,5 cm ye kadar gelişir; tüm yüzeyi tüylerle kaplıdır.

60-150 cm boylanır. Karşılıklı, çapraz olarak dizilen yapraklar, dekussat dizilişli, koyu yeşil renkli, saplı, oval ya da kalp şeklinde, dişli kenarlı ve yakıcı tüylerle kaplıdır. Yaprakların koltuğundan yeşilimsi renkli ve tek eşeyli çiçeklerin oluşturduğu çiçek kümeleri çıkar. Tüm ılıman iklimlerde, yerleşim bölgelerinde, orman içi açıklıklarda, yetişir. Yaygın bir türdür. Yaprakları, pazarlarda sebze olarak satılır. Belli belirsiz olan sarıntrak renkteki çiçekleri mayıs-eylül arasında açar. Yaprakları bu dönemde, toprak üstü kısımları yıl boyunca, kökü sonbaharda toplanır (Davis, 1982).

2.1.4.2.Habitat

Ormanlarda, güneş görmeyen dere kenarları ve kayalarda 2700 m yüksekliğe kadar yetişir. Isırgan her iki yarım kürenin tropikal ve subtropikal alanlarında yaygın olarak yetişir. Türkiye’de ise açık ormanlık alanlarda, nehir ve yol kenarlarında kendiliğinden yetişen bir bitkidir. Özellikle Karadeniz Bölgesi’nde yoğun olarak yayılış gösterir. Azotça zengin gübrelili topraklarda daha geniş bir yayılış göstermekte ve daha hızlı büyümektedir. *Urtica* cinsinin türlerinin dünya üzerindeki yayılışı Çizelge 2’de gösterilmektedir.

Çizelge 2. Dünya genelinde yayılış gösteren bazı *Urtica* türleri ve yayılış alanları (Ayan ve ark. 2006)

Türler	Yayılış Alanları
<i>Urtica angustifolia</i>	Çin, Japonya, Kore
<i>Urtica ardens</i>	Çin
<i>Urtica atrichocaulis</i>	Himalayalar, Güneybatı Çin
<i>Urtica atrovirens</i>	Batı Akdeniz
<i>Urtica cannabina</i>	Batı Asya
<i>Urtica dioica</i>	Avrupa, Asya, Kuzey Amerika
<i>Urtica dubia</i> (Geniş yapraklı ısırgan otu)	Kanada
<i>Urtica ferox</i> (Ağaç ısırgan otu)	Yeni Zelanda
<i>Urtica fissa</i>	Çin

<i>Urtica galeopsifolia</i>	Merkez ve Doğu Avrupa
<i>Urtica hyperborea</i>	Himalayalar
<i>Urtica incisa</i> (Çalı ısırgan otu)	Avustralya
<i>Urtica laetivirens</i>	Japonya, Mançurya
<i>Urtica morifolia</i>	Kanarya adaları
<i>Urtica parviflora</i>	Himalaya
<i>Urtica pilulifera</i> (Romen ısırgan otu)	Avrupa
<i>Urtica platyphylla</i>	Çin, Japonya
<i>Urtica pubescens</i>	Güneybatı Rusya
<i>Urtica rupestris</i>	Sicilya
<i>Urtica sondenii</i>	Güneydoğu Avrupa, Kuzey Asya
<i>Urtica taiwaniana</i>	Tayvan
<i>Urtica thunbergiana</i>	Japonya
<i>Urtica urens</i> (Bodur ısırgan otu, tek yıllık ısırgan otu)	Avrupa, Kuzey Amerika

2.1.4.3. Tarımı

U. dioica bitkisi diğer bitkilere baskın olması ve nemli alanlarda hızla gelişmesi nedeniyle yetiştiriciliği kolaydır. Aynı arazide uzun yıllar verim alınabilen bir bitkidir.

2.1.4.4. Üretim şekli

Isırganın tarla tesisi, tohumla veya fide ile yetiştirerek yapılmaktadır. *U. dioica* ayrıca stolonlar ve tepe sürgünlerinin köklendirilmesi ile vejetatif olarak da çoğaltılabilmektedir. Tohumlar küçük olduğundan “bin tane ağırlığı” düşüktür. *U. dioica*'nın bin tane ağırlığı 0.14 g iken tek yıllık tür olan *U. urens*' de ise 0.50 g civarındadır. Tohum kullanılarak doğrudan tarlaya ekim için, dekara atılacak tohum miktarı tür ve çimlenme oranına bağlı olarak değişiklik gösterir. Mesela *U. urens* için 0.1 kg/da, *U. dioica* için ise 0.4 kg/dk tohumluk kullanılması tavsiye edilmektedir. Ekim derinliğinin 1- 1.5 cm olması istenir.

Fide ile üretimde ise önce hazırlanmış olan fide yastıklarında fidelerin yetiştirilmesi gereklidir. Isırgan için Nisan- Haziran ve Eylül-Ekim dönemleri olmak üzere 2 farklı zamanda tarla tesisi yapılabilir. Ancak, Eylül dönemi tarla tesisi sıcak bölgeler için tavsiye edilebilir, aksi takdirde genç bitkiler kıştan zarar görür. Tohumların çıkışı 10-15 gün

civarında bir süre aldığı için yapılacak fidelğin özelliğine ve iklim değerlerine bağlı olarak fideliklere tohum ekimi yapılmalıdır. Fideliklerin güneşli bir bölgede ve örtü altı yetiştiriciliği şeklinde yapılması durumunda daha kısa sürede fide gelişimi sağlanabilmektedir. Elde edilen fideler lif üretimi amaçlanıyor ise 75 cm aralıklarla tarlaya şaşırtılmalıdır.

Çoğaltım materyali olarak stolonların kullanılması durumunda 10 cm boyunda ayrılmış olan stolonlar 30 cm veya daha fazla mesafelerle sıralara yerleştirilmeli ve üzerleri örtülerek bastırılmalıdır. 3-4 hafta içinde bitkinin toprak üzerinde görülmesi meydana gelmektedir. Tepe sürgünleri de Mayıs' dan Haziran ortasına kadar sürgün uçları veya henüz odunlaşmamış sap kısımları köklendirme hormonuna batırılarak, 2 cm aralıklarla yastıklara yerleştirilir. 2-3 hafta içerisinde köklenmektedir. Yeterince gelişim sağlandığında tarlaya şaşırtma işlemi yapılmalıdır.

Isırgan bitkisi tür özelliklerine göre gelişim göstermektedir. Örneğin *U. dioica* 1.5 m ve bazı araştırmacılara göre 2-4 m boylanabilir (Ayan, 2006).

2.1.5. *U. dioica* bitkisinin tıp dışı kullanım alanları

2.1.5.1. Besin olarak kullanımı

Isırganın taze yaprakları vitamin ve mineral bakımından zengindir. Ayrıca en iyi kaliteli protein de taşımaktadır. Taze yapraklar özellikle Haziran ayı başında toplanır ve çeşitli yemekler (çorba, börek, zeytinyağlı) yapımında kullanılır. Taze yapraklar süt veren hayvanlara yedirilirse sütün miktarı ve kalitesi artar.

Besin değerinin yüksek olması, ısırganotu yaprakları bünyesindeki flavonoidler, klorofiller ve karetonoidler ile onların indirgenme ürünleri, vitaminler, proteinler, mineral maddeler, organik asitler, yağ ve diğer komponentler yönünden zengin içeriğinden kaynaklanmaktadır. Özellikle demir, vitamin ve klorofil içeriği yüksek olmasından dolayı kansızlığa karşı kullanımını tavsiye edilmektedir (Ayan ve ark. 2006)

Rafojlawska ve ark (2002), Makedonya'dan topladıkları ısırgan otu yaprakları analizi sonucunda % 8.3 nem %27.2 protein, %12.5 mineral madde ve % 7 uçucu yağ tespit etmişlerdir. Weatherbee ve Bruce (1979), C ve A vitamini düzeyinin yüksek olmasından dolayı ısırgan otunun gıda olarak tüketilmesini tavsiye etmiştir.

Guil-Guerrero ve ark. (2003) yabani ısırgan otunun yenilebilir parçalarını (farklı olgunluk aşamalarında yaprak, gövde, kök ve tohum) yağ asidi için GLC, karotenoitler ters-faz HPLC ve gradient ayrıştırma yöntemleri ile analiz etmişlerdir. Yaprakların tüm

olgunluk seviyeleri için, lutein, lutein izomerleri, beta-karoten ve b-karoten izomerleri başta olmak üzere dokuz farklı karotenoit tespit edilmiştir

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, *U. dioica* yapraklarının içerdikleri esansiyel yağ asitleri ve karotenoid dikkate alarak sağlıklı bir gıda olarak insanlar tarafından kullanılabilceğini gösterdiğini belirtmişlerdir. Farklı test elemanlarının sonuçlarına göre besin değerleri en çok n-3 yağ asitleri ve bazı karotenoitler dikkate alındığında yüksek miktarları nedeniyle insan tüketimi için genç yaprakların en uygun olduğu görmüşlerdir. Bununla birlikte, n-6 yağlı asitleri kaynağı olarak tohumlar da alternatif beslenme için dikkate alınmalıdır.

2.1.5.2. Kâğıt, bez, iplik yapımında kullanımı

Isırgan türleri kâğıt yapımında ve pamuk gibi el dokumalarında, kumaş yapımında kullanılır. Nepal yerlileri tarafından (Nepal de ısırgan bitkisine ALLO denir) ev dokuma tezgâhlarında ipeksi keten görünümünde kumaşlar dokunur. Ayrıca bu ipliklerden balık ağı da yapılır. Canvas denilen kumaş ısırgan bitkisinden yapılır.

Kenevir ve keten lifine çok benzediği için ısırgan otu lifi tekstil endüstrisinde kullanılabilir. Isırgan otu bitkisi, yelkenli yapımında kullanılmak amacıyla lif kaynağı olarak yüzyıllardır İskandinavya’da ekilip biçilmektedir (Gordon, 1984). Isırgan ipliği Polonya’da 12. y.y.’dan 17.y.y.’a kadar kullanılmış, fakat 17. yüzyılda ipek ısırgan ipliğinin yerini almıştır. Avrupa’da kumaş üretimi için ısırgan otunun üretimine 19.yy’da başlanmıştır (Vogl ve Hartl, 2003).

I. Dünya Savaş’ında Almanlar ısırgan otundan elde edilen lifleri çadır, sırt çantası, iç giyim ve çorap yapmak için kullanmıştır. O dönemlerde Almanlar kıyafetlerin %85’ini ısırgan otu liflerinden üretmişlerdir. Isırgan lifleri ordu tarafından kamuflaj ekipmanı olarak değerlendirilmiştir. Fakat daha sonraki zamanlarda ısırgan lifi teknik ve maliyet-verimlilik sebepleri yüzünden tekstil endüstrisindeki önemini kaybetmiştir. Isırgan lifi eldesi tamamıyla makineleştirilemediği için iş gücü maliyetlerinin artması ile birlikte ısırgan otu tarımı karlılığını kaybetmiş ve bu yüzden ısırgan otu yetiştiriciliği durmuştur. Bu durum keten, kenevir ve ısırgan otu gibi daha küçük tekstil endüstrilerinin yerini alan güçlü pamuk endüstrisi tarafından pekiştirilmiştir (Bodros ve Baley, 2008).

Fakat son yıllarda iplik eğirme teknolojisindeki gelişmeler ve melezleme konusundaki ilerlemeler ile süper yoğun lifli bitkilerin üretimine başlanmış ve ısırganda bu olumlu çalışmalardan payını almıştır. Isırgan lifinin kendine özgü karakteristik özelliği

olan içi oyuk boşluklu (hollow) lif yapısındaki boşluklarda kalan hava doğal bir izolasyon sağlamaktadır. Yazın serin tutan lif yaratmak için, iplikler lifin merkezindeki boşlukları kapatacak şekilde bükülmekte ve izolasyon azalmaktadır. Kışık kumaşlar için ipliklere daha düşük büküm verilerek içi boşluklu oyuk lif yapısı muhafaza edilerek sıcaklığın sabit kalması sağlanmaktadır.

Isırgan lifleri doğal, biyo bozunabilir, yenilenebilir kaynaklıdır ve üretimlerinde az enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Bu yüzden ısırgan otu lifleri çevre dostudur ve ekolojik avantaja sahiptir. Ayrıca ısırgan lifinin kullanılmasıyla tekstil lif üretimi için kullanılan su miktarlarında tasarruf sağlanılabileceği bildirilmiştir. 1 kg pamuk lifi üretimi için yaklaşık 7000-29000 litre su kullanıldığı belirtilmiştir. Çevresel etkiler açısından bu kadar büyük miktarlarda suyun harcanması uzun vadede çevresel olumsuzluklara yol açabileceği ifade edilmiştir. Barlow ve Neal ısırgan otu lifinin pamuk lifinin yerini alması ile su kullanımında büyük miktarlarda tasarruf edilebileceğini belirtmişlerdir (Barlow ve Neal, 2011).

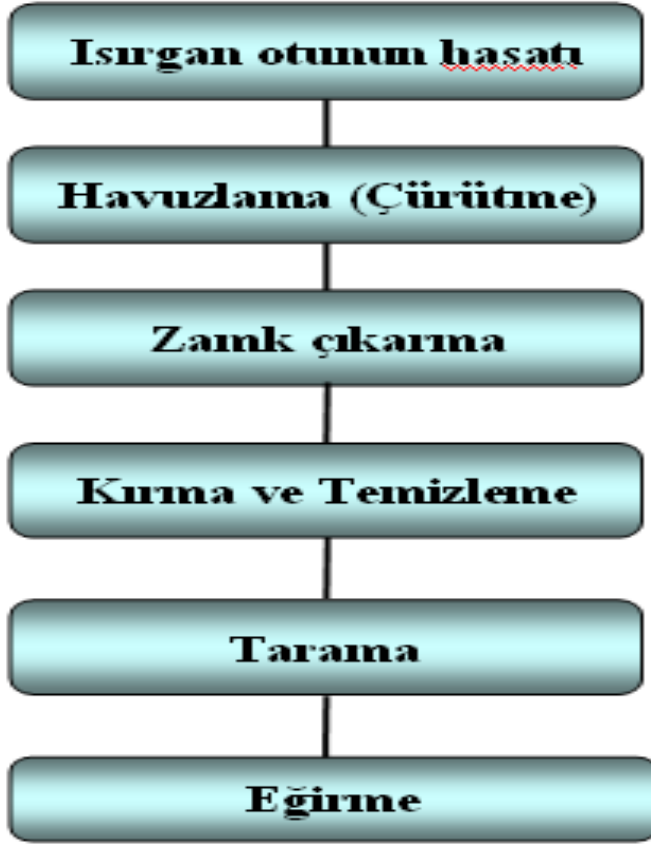
2.1.5.2.1. Isırgan otu lifinin tekstilde kullanımı

1990'ların ortalarından beri ısırgan otunun yetiştirilmesi, işleme metotları ve bunların iyileştirilmiş tekstil süreci Almanya'da, Avusturya'da ve Finlandiya'da araştırma konusu olmuştur. Araştırma enstitülerine bağlı fabrikalar ısırgan otu lifi tekstilinin tanıtımı için çalışmalar yapmaktadır. Doğal lif olarak ısırgan otu lifinin gelecek vaad etmesi bitki üretiminin özellikle başta Almanya olmak üzere Avrupa'nın merkezinde artış göstermesini sağlamıştır (Vogl ve Hartl, 2003).

Isırgan otu lifinin düşük sürtünme yüzeyi ve düzgün ve pürüzsüz yapısından dolayı saf ısırgan otu karışımından iplik eğirmek zordur. Çok kısa lifler temizleme ve tarama işlemleri ile uzaklaştırıldıktan sonra istenilen iplik eldesi için diğer lifler ile harmanlanabilmektedir. Diğer liflerle yapılan harmanlama sonrası daha iyi sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Yapılan çalışmalar ısırgan otu lifinin tekstil için uygun olduğunu ve pamuğun yerini alabileceğini göstermiştir (Huang, 2005).

2.2.5.2.2. Lif eldesi

Isırgan otunun tekstilde kullanılabilmesi için çeşitli lif elde etme yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemlerden en sık kullanılanı şekil 4'de belirtildiği gibidir.



Şekil 4. Isırgan otundan lif eldesinin aşamaları (Kurban ve ark., 2011).

2.1.5.3. Boyacılıkta kullanımı

Yapraklarının güzel yeşil renginden dolayı, özellikle yün kumaşların boyanmasında kullanılır. Klorofil ekstraksiyonu yöntemi ile elde edilen boyar madde (E140) ticari anlamda yeşil boya olarak kullanılmaktadır. İkinci Dünya Savaşı'nda Avrupa'da asker elbiselerinin boyanmasında kullanılmış, kamuflaj malzemesi olarak yararlanılmıştır.

Isırgan otu köklerinden sarı renkli boya elde edilmektedir. İhtiyaç duyulan alanlarda kök boya olarak kullanılmakta; aynı zamanda köklerin soğan kabuğu ilave edilerek boya elde edilmektedir (Bown, 1995).

2.1.5.4. Gübre olarak kullanımı

Isırgan otunun yapısında ihtiva ettiği mineral madde zenginliği, onun gübre olarak veya çiftlik gübresine katkı sağlayarak organik bitki yetiştiriciliğinde ön plana çıkmasına sebep olmuştur. Özellikle hayvan gübresine demir katkısı sağlamak amacıyla katıldığı bildirilmektedir (Raupp ve Konig, 1996).

Günümüzde biyodinamik tarım olarak adlandırılan, toprak sağlığı ile gıda kalitesinin öneminin kavranmasıyla ortaya çıkan ve bunun üzerine geliştirilen organik tarım sistemi içerisinde ısırgan otunun önemli bir yeri vardır. Bitki besleme amacıyla hazırlanacak olan biyodinamik kompostlarda ısırgan otunun yanı sıra civanperçemi, papatya, meşe kabuğu, karahindiba ve kediotu gibi bitkilerin kullanılması tavsiye edilmektedir (Diver, 1999).

2.1.5.5. Tarımsal mücadelede kullanımı

Isırgan otunun bazı bitki zararlılarına karşı koruma sağladığı yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur. Örneğin Öden ve ark. (2004) tütünde görülen orabanş zararlısına karşı yeşil gübre olarak bakla ve ısırganotu ekstraktı kullanmışlar ve kontrol bitkilerinde orabanş %38 olarak gözlenirken, ısırganotu ekstraktı uygulanan bitkilerde bu oranın % 8.3'e gerilediğini tespit etmişlerdir.

Ayrıca organik tarımda kimyasal ilaçlamadan kaçınıldığı için zararlı böcek ve hastalıklarla mücadele etmek için doğal yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bazı küçük böcek ve yaprak bitleri ile mücadelede ısırgan otu ekstresi kullanıldı da bilinmektedir.

2.1.5.6. Kozmetikte kullanımı

Isırgan otu bitkisinin kozmetikteki en yaygın kullanım alanı saç dökülmelerine karşı hazırlanan şampuanların üretimidir. Günümüzde ısırgan otu otlu şampuanlara marketlerde rastlamak mümkündür. Yine ısırgan otu tozu ile hazırlanmış sabunlarda saç dökülmelerini önleme ve saç kuvvetlendirme amacına yönelik olarak üretilmektedir (Ayan ve ark., 2006).

2.2. Bitkilerin Tıbbi Olarak Kullanım Alanları

2.2.1. Etnobotanik çalışmalar

İlk çağlardan kalan arkeolojik bulgulara göre insanlar, besin elde etmek ve sağlık sorunlarını gidermek için öncelikle bitkilerden faydalanmışlardır. Yüzyıllardan beri süregelen insan ve bitki arasındaki bağ sonucunda, günümüzde tüm dünyanın önemini kabul ettiği ve ciddi araştırmaların yapıldığı etnobotanik bilim dalı doğmuştur (Koçyiğit, 2005).

Etnobotanik kelimesinin kökü olan etno- insanların çalışılması, botanik de bitkilerin çalışılması ya da bitki bilimi anlamına gelir. Etnobotanik, geniş anlamda, farklı insan topluluklarındaki bitki-insan ilişkilerini ifade etmektedir. Etnobotanik terimi, ilk kez 1895

yılında, bir biyoloji profesörü olan John W. Harshberger tarafından kullanılmaya başlanmış olup, basitçe “bitkilerin yerel halk tarafından kullanımı” olarak tanımlanmıştır (Heinrich ve ark.,2004).

Etnobotaniğin ortaya çıkışında, çeşitli hastalıkların tedavi edilmesi amacıyla binlerce yıldan beri tıbbi bitkilerin kullanılması büyük rol oynamıştır. Eski çağlardan günümüze gelen etnobotanik kitapları veya belgeleri tıbbi bitkilerin kullanımı üzerinedir. Bitkilerden en çok gıda ve tedavi edici olarak yararlanılmakla beraber, yakıt, yapı malzemesi, süs eşyası yapımı, boyar madde ve büyü, nazar gibi inançsal amaçlı vb. kullanımlar da yaygındır (Baytop,1999).

İnsanlık tarihi boyunca birçok hastalık (seker hastalığı, sarılık, nefes darlığı vb.) bitkiler kullanılarak tedavi edilmeye çalışılmış ve çalışılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünyada yaklaşık 4 milyar insanın sağlık sorunlarını ilk etapta bitkisel droglarla gidermeye çalıştıklarını bildirmektedir (dünya nüfusunun %80’i). Ayrıca, gelişmiş ülkelerde reçeteli ilaçların yaklaşık % 25’ini bitkisel kökenli etken maddeler (vimbilastin, rezerpin, kinin, aspirin vb.) oluşturmaktadır (Farnsworth ve ark., 1985).

Türkiye’de tıbbi olarak kullanılan bitkilerin sayısı kesin olarak bilinmemekle birlikte, 500 civarında olduğu tahmin edilmekte; yaklaşık 200 tıbbi ve aromatik bitkinin ihraç potansiyelinin olduğu belirtilmektedir (Baytop, 1999; Ekim ve ark., 2000).

Türkiye’de İstanbul Üniversitesi’ne bağlı, “Geleneksel İlaçlar Araştırma ve Uygulama Merkezi (GİLAM)” geleneksel tıpta kullanılan bitkilerle ilgili çalışmalar gerçekleştirmiş ve gerçekleştirmektedir. Geleneksel tıp ve tıbbi bitkiler konusunda, kitaplar, raporlar ve çeşitli dergilerde etnobotanik çalışmalar yayımlanmaktadır. Ospankulova tarafından hazırlanan tez çalışması kapsamında da yurt içinde ve yurt dışındaki tüm etnobotanik araştırmacıların bu konudaki çalışmalara kolayca ulaşabilmesi amacı ile Türk Etnobotanik Veri Tabanı (TEBVET) hazırlanmıştır. Bu kapsamda 658 çalışma değerlendirilerek veri tabanına 7965 veri aktarılmıştır (Ospankulova, 2005).

İlisulu (1992), İlaç ve Baharat Bitkileri adlı yayınında ulusal ekonomiye, halkın sağlık ve beslenmesinde, aynı zamanda endüstride önemli yer tutan ilaç, baharat ve keyif bitkilerinin alfabetik bir düzende tanıtımı, özellikleri, yararlanılması, etken maddeleri, drogları, ekonomik değeri, yayılış alanları ve tarıma alınma olanakları konularında temel bilgiler vermiştir.

Bozdoğanlı (1996), Çukurova Bölgesinde doğal olarak bulunan tıbbi ve çeşitli amaçlarla kullanılan 224 cins ve 1012 tür bitkinin bulunduğunu tespit etmiştir. 244

bitkiden ilaç olarak, bunun yanı sıra 26'sının boya, 16'sının insektisit, 43'ünün sebze olarak, 8'inin hayvan hastalıklarında, 32'sinin uçucu yağ ve sabit yağdan, 14'ünün reçine ve zamkından yararlanıldığını belirtmiştir.

Tuzlacı ve Erol (1998), Isparta Eğridir'de medikal amaçlı kullanılan 66 bitki türü tespit etmişlerdir. Bunlardan 56'sının kültür, 10'unun ise kültür bitkisi olduğunu belirtmişlerdir. Bu bitkilerin çoğunlukla böbrek taşları, ülser, hemoroit, romatizma, soğuk algınlığı, idrar söktürücü, gaz giderici ve analjezik reaksiyonlar için kullanıldığını bildirmişlerdir. Bazı bitkilerin iki veya daha fazla türün karışımı halinde kullanıldığını aktarmışlardır. *Laurus nobilis* yalnızca tarımsal bir bitki olarak bilinmesine rağmen doğal varlığını tespit etmişlerdir. Kaynatma ve infüzyon bitkilerin kullanımı için en sık kullanılan yöntemler olarak belirlenmiştir.

Tuzlacı ve Aymaz (2001) Balıkesir'in Gönen ilçesinde yaptıkları çalışmada 73 doğal ve 11 kültür olmak üzere toplam 84 tıbbi bitki tespit etmişlerdir. *Origanum ulgare subsp. hirtum*, *Asplenium adiantum-nigrum*, *Arum elongatum*, *Hypericum perforatum*, *Urtica dioica*, *Thymus longicaulis subsp. longicaulis var. subisophyllus*, *Salvia tomentosa*, *Plantago major*, ve *Sambucus ebulus* birçok hastalığın tedavisinde kullanılan en popüler bitkiler olarak belirtilmiştir. Bu tıbbi bitkiler halk arasında en fazla hemoroit, romatizma, mide ve böbrek rahatsızlıklarının tedavisinde kullanıldığını belirtmişlerdir.

Yücel ve Tülüklüoğlu (2000), Gediz (Kütahya) çevresinde halk ilacı olarak kullanılan bitkileri araştırmışlardır. 6 familyaya ait 9 türden 11 yöresel kullanım belirlemişler; bunlardan 4'ü solunum sistemi hastalıkları (sinüzit, öksürük, soğuk algınlığı), 3'ü sindirim sistemi hastalıkları (midede şişkinlik, karın ağrısı, iltihaplanmalar), 2'si dolasım sistemi hastalıkları (damar tıkanıklığı), 1'i diyabet, 1'i sıtma ve 1'inin teskin edici olarak kullanıldığını bulmuşlardır.

Şimşek ve ark. (2002), Anadolu'da halk arasında sıklıkla tüketilen, yenilebilen yabani bitkilerin kullanım amaçlarını araştırmışlardır. Araştırmayı Anadolu'nun 14 il, ilçe ve köylerinde bulunan 2246 kişi üzerinde gerçekleştirmişlerdir. Bitkinin hangi kısmının, hangi amaçlarla (gıda, ilaç, vd.) kullanıldığı ve tedavi amacıyla kullanılması durumunda ise ne şekilde hazırlanarak (dekoksasyon, infüzyon, lapa veya merhemi, kuru veya taze formu şeklinde) hangi etkiyi elde etmek amacıyla kullanıldığını sorgulayarak kaydetmişlerdir. Tüketildiği belirlenen yabani bitkileri usulüne uygun şekilde toplayarak, herbaryum materyalleri hazırlanıp bilimsel adlandırmasını yapmışlardır. *Plantago sp.*,

Malva sp., *Rumex sp.*, *Thymus sp.*, *Urtica sp.*, *Chenopodium sp.* ve *Rosa sp.* cinslerinin halk arasında en sık kullanılanlar olduğunu belirtmişlerdir.

Sarı ve ark. (2010) Ege ve Güney Marmara bölgesindeki Afyon, Aydın, Balıkesir, Bursa, Çanakkale, Denizli, İzmir, Manisa, Muğla, Uşak ve Yalova illerinden halkın ilaç amaçlı kullandığı bitkilerle ilgili kayıtlı bilgileri toplamışlardır. Bu kaynaklara göre halkın ilaç olarak kullandığı bitkilerin %74'ü doğadan toplama yolu ile elde ettikleri, %33'ünün toprak üstü aksamından, %12,8'inin çiçeğinden, %10,3'ünün de meyvesinden yararlandığı belirlenmiştir. Kekik için 41, kantaron 21, karabaş otu 19 ve ısırgan için 13 kayıt elde edilmiştir. Hemen hemen her türlü rahatsızlığa karşı bir veya birden fazla bitki önerilirken, toplanan örneklerden 65 familyaya ait, 168 tür tespit edilmiştir.

2.2.2. Tıbbi bir bitki olarak *Urtica dioica*

2.2.2.1. *U. dioica* bitkisinin farmakolojik özellikleri

2.2.2.1.1. Toprak üstü kısımları

Bitkinin toprak üstü kısımlarında kafeik asit esterleri, özellikle kafeik malik asit gibi fenolik asitler, flavonoidler, çeşitli vitamin ve mineraller, tanenler, yağ asitleri ve klorofil gibi maddeler bulunmaktadır. Batıcı tüyler ise, yakıcı özelliği oluşturan, aminlerce zengindir.

2.2.2.1.1.1. Flavonoidler

Bitkide bulunan toplam flavanoidler ortalama %0.7-1.8 oranındadır. Rutin, izokuersitrin (%0.02), astragalin, kamferol-3-O-rutinozit tespit edilen flavonoidlerden bazılarıdır (Ankaferd BloodStopper Araştırma Etkinlikleri Raporu, 2008).

Chaurasia ve Wichtl (1987) yaptıkları çalışmada *U. dioica* erkek ve dişi çiçekleri üzerinde kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle gerçekleştirilen incelemeler sonucunda 7 flavonoid heteroziti (izoramnetin-3-O-glikozit, kemferol-3-O-glikozit, kersetin-3-O-glikozit, izoramnetin-3-O-rutinozit, kemferol-3-O-rutinozit, kersetin-3-O-rutinozit ve izoramnetin-3-O-neohesperidozit) izole edilmişlerdir.

Ji ve ark. (2007) Modern spektroskopik yöntemlerle (NMR, MS, vb) yürüttükleri çalışmalarında, farklı 7 bileşiğin yanısıra bitkinin toprak üstü kısımlarında rutin ve kersetin flavonoidlerinin bulunduğu gösterilmişlerdir.

2.2.2.1.1.2 Fenolik bileşikler

Roslon ve Weglarz (2003) dişi ve erkek ısırgan formlarıyla yapıları çalışmalarında kuru yapraklarının polifenolik bileşiklerini farklı dönemlerde incelemişlerdir. Bu bileşiklerin özellikle çiçeklenme döneminde konsantrasyonlarının arttığı, sonra tekrar düştüğü görülmüştür. Özellikle asit hidrolizinden sonra erkek formlarda m-hidroksibenzoik asit, p-hidroksibenzoik asit ve elajik asit; dişi formlarda ise elajik asit konsantrasyonlarının yüksek olduğu gözlenmiştir.

Fiamegos ve ark. (2004) ile Protetos ve ark. (2006) ısırganın metonollü ekstresinin analizinde homovanilik asit, vanilik asit, 2- hidroksi sinnamik asit, 4-hidroksisinnamik asit, gallik asit, sirinjik asit ve ferulik asite rastlamışlardır.

2.2.2.1.1.3. Mineraller

Szentmihalyi ve ark. (1998) bitkilerin organik bileşiklerinin dışında bu bileşiklerin bitkideki konsantrasyon oranlarının da etki mekanizması üzerinde önemli rol oynadığı düşünerek, *Urtica dioica* bitkisinin içeriğindeki potasyum:sodyum oranını değerlendirmişlerdir. Herhangi bir işlem uygulanmamış bitki yapraklarında potasyumun sodyuma oranı 63:1 iken, yaprakların dekoksilyonunda bu oran 448:1 olarak ölçmüşlerdir.

Miktarsal olarak da yapraklarda potasyum iyonları miktarının taze yapraklarda % 0,6, nitrat miktarı ise % 1,5-3 olarak belirlenmiştir (Ankaferd Blood Stopper Araştırma Etkinlikleri Raporu, 2008).

2.2.2.1.1.4. Aminler

U. dioica bitkisinin dikkati çeken ilk özelliği yakıcı olmasıdır. Bu yüzden araştırmacılar da ilk çalışmaları bunun sebebini bulmaya yönelik olarak yapmışlardır. Bu konuda ilk araştırmayı Emmelin ve Feldberg 1947 yılında tamamlamış; bitki tüylerinde yapılan çalışmada; bitki tüylerinde bulunan sıvıda %0.25 ile %0.1 oranında batma etkisini sağlayan histaminin, %1 ile daha fazla konsantrasyonda yanma etkisini sağlayan asetilkolinin ve kaslarda hafif kasılmalara neden olan tanımlayamadıkları bir bileşiğin varlığını deneysel olarak göstermişlerdir.

1949 yılındaki çalışmalarında ise bitkinin diğer kısımları da incelendiğinde yaprak, kök ve rizomlarda da asetilkolin ve histamine rastlanmış, bu maddelerin toprak altı kısımlarda bulunan bir bakteri tarafından veya köklerdeki bir enzim sayesinde üretilerek yapraklara taşınıp buradaki tüylerde depolandığı düşünülmüştür. Collier ve Chesher

(1956) daha sonra yaptıkları çalışmada, tanımlanamamış üçüncü bileşiğin yapısı da 5-hidroksitriptamin olarak aydınlatmışlardır.

Barlow ve Dixon (1973) bitkide yoğun olarak bulunan asetilkolinin sentezi incelerken kolin asetil transferaz enziminin de bulunduğu tespit edilmişlerdir. Memelilerdeki enzimlerle benzer özellikler gösterdiği tespit edilen enzimin bitkinin yaşamının sonuna kadar etkinliğini devam ettirdiği görmüşlerdir.

Bununla birlikte taze bitkinin yakıcı tüylerinde ayrıca formik asit ve lökotrienler (LTB₄, LTC₄, LTD₄) de bulunmaktadır (Ankaferd BloodStopper Arastırma Etkinlikleri Raporu, 2008).

2.2.2.1.1.5. Pigmentler ve karotenoitler

Guil-Guerrero ve ark. (2003) *U. dioica* bitkisinde renkli bileşikler olan karotenoitlerin bulunduğu göstermişlerdir. Bitkinin yapraklarından 9 farklı karoten türevi izole etmişler, bunların başında lutein ve izomerlerini tespit edilmişlerdir. β karoten , β karoten izomerleri, likopen ve likopen izomerlerinin de Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) analizinde belirgin pikler verdiğini belirtmişlerdir. Daha düşük oranda bulunan diğer bileşikler ise violaksantin, neoksantin, β siriptoksantin ve zeaksantin olarak bildirilmiştir. Karotenoitlerin genç ve olgun yapraklardaki miktarları arasında belirgin farklar bulunmuştur.

Sovova ve ark. (2004) ısırgan yapraklarının Supercritical Fluid Extraction (SFE) yöntemiyle sıvı CO₂ kullanılarak, farklı ısı ve farklı basınç uygulamalarının yapıldığı analizinde klorofil a, klorofil b, lutein ve β karoten bileşiklerinin varlığı tespit etmişlerdir.

2.2.2.1.1.6. Tanenler

U. dioica bitkisinde kafeoilmalik asit, klorojenik asit, (+) kateşin ve (-)epikateşin, klorojenik asit, neoklorojenik asit, kefeoilmalik asitin yanı sıra kriptoklorojenik asit, 2-kafeoiltartarik asit ve pkumaroilkinik asit gibi tanenler tespit edilmiştir (Budzianowski, 1991; Bucar ve ark., 2006; Protetos ve ark., 2006)

2.2.2.1.1.7. Lipitler

Bitkinin çeşitli kısımlarında yağ asitlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Özellikle genç yapraklarda daha fazla olmak üzere palmitik asit, palmitoleik asit, stearik asit, linoleik asit, α -linolenik asit, erusik asit, oleik asit ve gadoleik asite rastlanmıştır.

Tohumların ise daha çok linolenik asit bakımından zengin olduğu görülmüştür (Guil-Guerrero ve ark., 2003).

2.2.2.1.2. Kök kısımları

2.2.2.1.2.1. Lektinler

Bitkisel lektinler; glikoproteinlerden meydana gelen, eritrositlerin aglutinasyonuna sebep olan heterojen bir grup maddedir. Isırganın kökünde bulunan lektin yapısındaki bu önemli bileşiklerin hepsine birden *Urtica Dioica* Agglutinin (UDA) denir. Kan gruplarına karşı seçici olmadan diğer lektinlere oranla düşük aglutinasyon özellik göstermektedir (Peuman ve ark., 1983).

Kompleks halde izolektinleri içeren karışımın iyon değiştirme kromatografisi ile analizi sonucunda birbirinden sadece bir veya birkaç tane amino asitle ayrılan ve birbirinden farklı aglutinasyon özelliği göstermeyen 6 farklı izolektin yapısındaki madde elde edilmiştir (Van Damme ve ark., 1998). Dah sonra yürütülen çalışmalarda ise bu sayı 11'e kadar çıkmıştır (Ganzera ve ark., 2005).

2.2.2.1.2.2. Lignanlar

Isırgan kokunun değişik pH'lardaki organik solvanlarla hazırlanan ekstralarının trimetilsilillenmesinden sonra GK-KS ile analizi yapılmış içeriğinde 8 tane lignan bileşiğine rastlanmıştır (Kraus ve Spiteller, 1990).

U. dioica'nın köklerinden 4:1 oranında su:metanol kullanılarak perkolasyon yöntemiyle hazırlanan ekstre Gaz Kromatografisi (GK) ve YBSK yöntemleriyle analiz edilmiş ve sonuça (+)-neoolivil, (-)-sekoizolarisiresinol, dihidrodikoliferil alkol, izolarisiresinol, pinosresinol ve 3,4-divanililtetrahidrofuran bileşikleri elde edilmiştir (Schnöttner ve ark., 1997).

2.2.2.1.2.3. Steroitler

Isırgan köklerinin gaz kromatografisi yöntemi ile yağ asitleri bakımından incelenmiş ve konsantrasyon miktarı bakımından çoktan aza sırasıyla linoleik asit, palmitik asit, oleik asit, palmitoleik asit, stearik asit, gadoleik asit ve erusik asite rastlanmıştır (Guil-Guerrero ve ark., 2003).

Başka bir çalışmada ise *U. dioica* bitkisinin bütün lipitleri nötral ve polar lipitler olmak üzere ayrılmış ve YBSK yöntemiyle analizleri yapılmıştır. Kök ekstresinin

analizinde yaprak ve gövdeden daha az miktarda olmak üzere görülen nötral lipidler şu şekilde sınıflandırılmıştır: Trigliseritler, sterol esterleri, yağ asitleri, yağ asiti metil esterleri, galaktosildigliseritler, gliserileterler, steroller, tokoferoller, digliseritler. Polar lipidler ise 4 ana fosfolipit sınıfına ayrılmıştır. Bunlar; fosfatidilinositol, fosfatidilkolin, lizofosfatidilkolin, fosfatidiletanolamindir (Antonopoulous ve ark., 1996).

2.2.2.2. *U. dioica* ile etnobotanik çalışmalar

Dioscorides'in Tıbbi botanik kitabı olan "Materia Medica" kitabında 700 kadar endemik bitki türü ve 1000 den fazla da tıbbi drog kaydedilmiştir. Türkçemizde "ısırgan" olarak bilinen bitki Materia Medica'da "Akaluphe" olarak geçmektedir.

Tıbbi etkisi sayılamayacak kadar çok olan *Urtica*; romatizma, ekzema, astım, deri hastalıkları, diüretik olarak ve prostat büyümesinde kullanıldığı çeşitli hayvan deneylerinde ve klinik araştırmalarla ortaya konmuştur. Dışardan saç toniği olarak saç şampuanlarında etkinliği kanıtlanmıştır. Dioscorides'e göre ısırgan bitkisi köpek ısırmalarına, ülser, tümör oluşumuna ve ağrılara karşı kullanılır. Ayrıca diüretik ve mide bulantısında da etkili olduğu bilinmektedir. Galen "De Simplicibus" adlı eserinde ısırganın laksatif ve diüretik olarak, ayrıca kangrende, iltihaplı yaralarda, şişmelerde, burun kanamalarında, ağız yaralarında kullanıldığından bahsedilmiştir (Kavalalı, 2011).

1995-2003 Arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde faaliyet gösteren "Bitkisel İlaçlar Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde Ülkemizde yetişen ve kullanılan ısırgan türleri üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmıştır bunlar;

1. *Urtica dioica* türünden antikoagülan etkili bir madde izole edilmiş ve aktivitesi trombin zamanı (TT), protrombin zamanı (PT) ve kısmi tromboplastin zamanı (aPTT) ölçülerek ispatlanmış. Bu izole edilen maddenin 1mg.nın 0.28 mg heparin aktivitesine eşit olduğu gösterilmiştir.

2. Gaz Likid Kromatografi metodu ile ısırgan bitkisinin tohum yağı incelenmiş, en fazla linoleik asitin olduğu bulunmuştur.

3. Isırgan bitkisinin tohumu petrol eteri ile ekstre edilmiş ve sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada doza bağımlı anti-inflamatuar etkisi incelenmiştir.

4. Isırgan tohumundan lektin adlı protein yapısındaki bir madde elde edilmiştir. Bu sıçanlarda adjuvan artritte uygulanarak uygulamadan sonraki 25. günde alınan kan örneklerinde karaciğer enzimlerinden alkali fosfataz ve aminotransferaz enzimleri tayin

edilmiştir. Ayrıca alınan kesitlerle histolojik olarak karaciğer dokusu üzerindeki rejeneratif oluşum gösterilmiştir.

5. Isırgan tohumlarından elde edilen lektin maddesinin hipoglisemik aktivitesi sıçanlarda yapılan diyabet modelinde incelenmiş, bu çalışma da aynı zamanda histolojik olarak değerlendirilmiştir (Kavalalı, 2003).

U. dioica bitkisinin etnobotanik çalışmalardan elde edilen bulgulara göre tıbbi kullanım alanları Çizelge 3’de belirtilmiştir.

Çizelge 3. *U. dioica* bitkisinin tıbbi kullanım alanları (Tuzlacı ve Erol, 1999; Tuzlacı ve Tolon, 2000; Tuzlacı ve Aymaz, 2001; Tuzlacı ve ark., 2010; Polat ve Satıl, 2012)

Hastalık	Bitki Kısmı	Kullanım Şekli
Ağrı	Tüm Bitki	Sıcak suya daldırıp ağrıyan bölgeye bez ile sarma
Akciğer Kanseri	Tohum	Bal ile karıştırarak yeme
Alerji	Toprak Üstü Kısımları	İnfüzyon
Antihelmintik	Tüm Bitki	Kaynatıp suyunu içme
Antifungal	Tüm Bitki	Kaynatıp suyunu içme
Astım	Tüm Bitki	Kaynatıp suyunu içme
Bel Ağrısı	Toprak Üstü Kısımları	Alkolde kaynatılıp (1kg. bitki/0.5 l alkol) 24 saat sonra haricen
Böbrek taşı	Kök	Kaynatıp suyunu içme
Burun Kanaması	Tohum	Kaynatarak buharını koklama
Diyabet	Tüm Bitki	Kaynatıp suyunu içme
Egzama	Toprak Üstü Kısımları	Suda haşlayıp yeme
	Kaynatıp suyunu içme	Kaynatıp suyunu içme
Hemoroit	Toprak Üstü Kısımları	Suda haşlayıp yeme
	Tohum	Kaynatıp suyunu içme
	Tohum	Ezerek yeme
	Yaprak	Kaynatıp suyunu içme
Kan Durdurucu	Yaprak	Ezerek yaraya bağlama

Kanser	Tüm Bitki Tohum Toprak Üstü Kısımları Kök	Kaynatıp suyunu içme Bal ile karıştırılarak yeme Suda haşlayıp yeme Kaynatıp suyunu içme
Karın Ağrısı	Tüm Bitki Toprak Üstü Kısımları	Kaynatıp suyunu içme Pişirip yeme İnfüzyon
Kellik	Toprak Üstü Kısımları	Kaynatıp suyunu içme
Profilaktik	Yaprak	Pişirip yeme
Prostat	Tüm Bitki	Kaynatıp suyunu içme
Sedef	Tüm Bitki	Kaynatıp suyunu içme
Sistit	Toprak Üstü Kısımları	Yemeklerden önce pişirerek yeme
Siyatik	Toprak Üstü Kısımları	Kaynatıp suyunu içme
Romatizma	Toprak Üstü Kısımları Taze yapraklar Yaprak Kök	Haricen uygulama Yeme Kaynatıp suyunu içme Kaynatılıp haricen uygulama Kaynatıp suyunu içme
Ülser	Yaprak	Bal ile karıştırarak yeme
Yara	Toprak Üstü Kısımları	İnfüzyon
Yüksek Tansiyon	Tüm Bitki	Kaynatıp suyunu içme (kahvaltılardan önce)

Sarı ve ark. (2010) Ege ve Güney Marmara Bölgelerinde halk ilacı olarak kullanılan bitkiler üzerine yaptıkları çalışmada ısırgan otu hakkında da bilgilere değinmişlerdir. Isırganın tam zamanında toplanmaması ve deformasyonu nedeniyle türü tespit edilememiş olmasına rağmen elde edilen kaynaklardan halk dilinde ısırgan, ısırgan otu, dalgan denildiği, pazardan satın alınarak yada toplanarak elde edildiği, tohum ve toprak üstü kısımlarından faydalandığı bilgilerine ulaşılmıştır. Kanser, şeker hastalığı, idrar zorluğu, saç dökülmesi, hücre yenilenmesi ve kan yapımı, böbrek rahatsızlığı, romatizma, siyatik, burun kanaması, çıban, soğuk algınlığı, mide, bağırsak rahatsızlıkları, demir eksikliği,

kemik hastalığı, karın ağrısı, iştah açıcı, kanamayı önleyici, gut ve idrar yolları rahatsızlıkları, karaciğer, pankreas ve safra kesesi salgılarını artırıcı etkilerinin olduğu bildirilmiştir.

2.2.2.3. *U. dioica* ile ilgili diğer biyolojik aktivite çalışmaları

Urtica dioica hidroalkolik yaprak ekstresinin, kanserin başlamasını engelleyici, seyrini yavaşlatıcı veya durdurmaya yönelik etkilerini değerlendirmek amacıyla, belirli organlar (karaciğer, akciğer, böbrek ve mide) üzerindeki biyolojik aktivitesi araştırılmıştır. Ekstrenin fare karaciğeri ve midedeki glutatyon-S-transferaz ve DT-diaforaz aktivitesinin önemli ölçüde yükselmesinde etkisi olduğu gözlenmiştir.

Yine aynı çalışmadan çıkan sonuçlara göre *U. dioica* bazı ilaçların metabolizasyonunda rol alan, detoksifikasyonu sağlayan veya hücreleri korumada önemli rolleri olan enzim sistemlerini etkileyebildiğini belirlemişlerdir. *U. dioica* bitkisinin reaktif serbest radikallerin eliminasyonunda da biyolojik farklılıklar yarattığı tespit edilmiştir.

Bitkinin aktif bileşikleri, glutatyonreduktaz, glutatyonperoksidaz, superoksitdismutaz ve katalazın reaktif serbest radikalleri temizlemesini regüle edebildiğini belirlenmiştir (Özen ve Korkmaz, 2003).

İtalya’da aralarında *Urtica dioica* bitkisinin de bulunduğu birkaç bitki ekstresinin antiviral etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, kedi böbrek Crandell hücrelerinde (CrFK) sinsityum oluşumunun inhibe edilmesinin, feline immunodeficiency virüsün (FIV) neden olduğu enfeksiyonu engelleyebilecek bileşiklerin bulunmasında kullanılan bir tespit metodundan yararlanılmıştır. FIV, kedilerde yaygın olarak bulunan Human Immunodeficiency Virus (HIV) ile benzer patojenik ve biyolojik özellikleri olan bir lentivirüstür. Çalışma sonucunda *Urtica dioica* bitkisinin sulu ekstresinin düşük dozlarda sinsityumun gelişimini inhibe ettiği, artan dozlarda %84 seviyesine kadar antiviral etkinlik gösterdiği görülmüş; fakat bu seviyede sitotoksik etkinin de ortaya çıktığı belirtilmiştir (Mangelli ve ark., 2005).

Alt üriner sistem semptomları özellikle yaşlanmaya başlayan erkeklerde sık rastlanan sorunlardan biridir. Hastalık ile ilgili farklı hipotezler ortaya atılmışsa da mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Prostata karşı etkide çoğunlukla seks hormonu bağlayan globulinin, aromataz enziminin, epidermal büyüme faktörünün, prostat steroid membran reseptörlerinin, daha nadir olarak da 5 α - redüktaz enziminin veya androjen reseptörlerinin rol oynadığı düşünülmektedir.

Avrupa’da Benign Prostat Hipertrofinin (BPH) neden olduğu alt üriner sistem rahatsızlıkları için düzenlenen reçetelerin yaklaşık % 80 inde bitkisel ilaçlar yer almaktadır. Bunlardan en çok tercih edilen bitkilerden olan, *Serenoa repens* meyvelerinin ve ısırgan köklerinin 160/120 oranında karıştırılarak beraber kullanıldığı bir preparat, Alken’in sınıflandırmasıyla BPH’nin I. ve II. basamaklarındaki etkinliği plaseboyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Maksimum üriner akış hızı, idrar miktarı, idrar yapma süresi gibi istatistiksel değerlerdeki iyileşme; aynı zamanda hastaların hayat kalitesindeki artış belirgin olarak gözlenmiştir (Lopatkin ve ark., 2005).

Urtica dioica bitkisinin eski kaynaklarda kan şekerini düşürücü etkisinden bahsedilmektedir. Günümüzde de halk ilacı olarak dünyanın çeşitli bölgelerinde antidiyabetik etkisi nedeniyle kullanılmaktadır.

Hırvatistan’ da ‘antidiabetis’ ismiyle piyasaya sunulan ve kan glikoz seviyesini düşürdüğü gösterilen bir ilaç; içinde ısırgan kök ve toprak üstü kısımlarının da bulunduğu bir bitki karışımıdır.

Son dönemlerde, bu muhtemel etkinin mekanizmaları araştırılmış ve ısırgan yapraklarının sulu ekstresinin pankreasta yer alan Langerhans adacıklarından insülinin sekresyonunu doza bağlı olarak artırdığı görülmüştür (Farzami ve ark., 2003).

Urtica dioica ekstraktı tip 2 diyabetlerde oksidant üretiminin engellenmesi Ca^{2+} mobilizasyonu ve protein tirozin fosforilasyonu ile hiperagregasyonu azaltır. Tip 2 diyabetlerde hiperagregasyonu patojen bir etki yaratmaktadır. Trombin ile uyarılan trombosit agregasyonu endojen etkiler de dahil olmak üzere çeşitli hücre içi yolların aktivasyonuna neden olmaktadır. Bunlar reaktif oksijen türlerinin (ROT) artışı, Ca^{2+} taşınması ve protein tirozin fosforilasyonudur. *Urtica dioica* bitkinin sulu ekstresi yüksek antioksidant kapasite ile sağlıklı ve tip 2 diyabetik bireylerde farklı konsantrasyonlara bağlı olarak trombin-uyarılmış agregasyonunu azalttığı gözlenmiştir (Haouary ve ark., 2007).

Kardiyovasküler rahatsızlıkları olan hastalarda, trombositlerin agregasyonundaki bozukluklar önem taşır. Bu nedenle trombositlerin anormal hiperaktivitelerinin engellenmesi üzerine bitkiler kullanılarak yapılmış birçok çalışma mevcuttur. *Urtica dioica* bitkisinin sulu ekstresi, trombin tarafından induklenen trombosit agregasyonunu doza bağlı olarak inhibe etmiştir.

Bitkinin farklı solventlerle ekstraktları hazırlanmış, etil asetat kullanıldığında bu etkinin çok daha yüksek olduğu görülmüştür. Çözünürlük özellikleri düşünülerek, bitkideki

polar bileşiklerin özellikle de flavonoidlerin ve polifenolik bileşiklerin etkiden sorumlu olduğu düşünülmüştür. Flavonoidler izole edilerek yapılan çalışmalar da bu görüşü destekler niteliktedir (Mekhfi ve ark., 2004).

2.3. Antioksidant Enzimler ve Pigment İçerikleri ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Chahardehi ve ark. (2009) *Urticaceae* familyasından üç farklı tür ile antioksidant kapasite ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. *Urticaceae* familyasının 3 farklı türü olan *Urtica dioica*, *Pilea microphylla* ve *Elatostema umbellatum* bitkilerinin 15 farklı çözücüde ekstraksiyonu yapılmış ve ekstraktlar bitkilerin fenolik içerikleri ve serbest radikal süpürücü doğal antioksidant kapasitelerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Kimyasal ayıraç olarak DPPH [2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl], Quersetin [3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone], gallik asit [3,4,5-Trihydroxybenzoic acid] ve Folin-Ciocalteu's fenol ayırıcı kullanmışlardır. En yüksek DPPH radikal süpürücü yüzdesini *Urtica dioica* türünün bütanol ve etil asetat ekstrelerinin gösterdiğini belirtmişlerdir. *Urtica dioica* türünün etil asetat ekstresi düşük EC₅₀ değeri sergiledini belirtmişlerdir. Düşük EC₅₀ değeri güçlü serbest radikal süpürücü aktivite gösterdiğini belirtmektedir. Ayrıca sonuç olarak çalışılan bitkilerde fenolik içeriklerin serbest radikal süpürücü faaliyette rol oynayabileceğini düşünmediklerini belirtmişlerdir.

Aynı zamanda ısırgan ekstraktlarını gram (+) ve gram (-) bakterilerin üzerinde antimikrobiyal aktivite değerlendirmesi için de kullanmışlardır. Bunun için besinlerden izole ettikleri *Bacillus subtilis* IP 5832, *Lactobacillus plantarum* 299v (Lp299v), *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* bakterilerini kullanmışlardır. Amfisilin, eritromisin, ciprofloksacin, ve gentamisin antiyotiklerini pozitif kontrol için kullanılmıştır. Deneylerinin sonucunda antimikrobiyal aktivitesi düşük bulunmuştur. Ancak gıda maddesi, tıbbi amaçlı kullanım, lif vb. alanlara insanlık için kullanımının önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Isırgan otu (*Urtica dioica* L.) bitkinin yenilebilir çeşitli parçaları (farklı olgunluk aşamalarında yaprak, gövde, kök ve tohum) yağ asidi için GLC, karotenoitler için ters-faz HPLC ve gradient ayırıştırma yöntemleri ile analiz edilmiştir. Yapraklarda dokuz farklı karotenoit tespit edilmiş, yaprakların tüm olgunluk seviyeleri için, lutein, lutein izomerleri, beta-karoten ve b-karoten izomerleri büyük karotenoitler olarak belirlenmiştir. Yaprakların olgunlaşma seviyesinde neoksantin, vialoksantin ve likopenin önemli bir katkısı olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre özellikle de *Urtica dioica* yapraklarının içerdikleri esansiyel yağ asitleri ve karotenoit dikkate alınarak sağlıklı bir gıda olarak insanlar tarafından kullanılabileceğini göstermiştir. Farklı test elemanlarının besin değerleri en çok n-3 yağ asitleri ve bazı karotenoitler dikkate alındığında yüksek miktarda nedeniyle insan tüketimi için genç yaprakların en uygun olduğu görünmüştür. Bununla birlikte, n-6 yağlı asitleri kaynağı olarak tohumlar da alternatif beslenme için dikkate alınması gerektiği belirtilmiştir (Guerrero ve ark., 2003).

Özkan ve arkadaşları 2011 *Tymbra spicata*, *Gundelia tournefortii*, *Urtica dioica* L., *Malva sylvestris* ve *Mentha pulegium* bitkilerinin metanolik ekstraktlarının antioksidant aktivite ve toplam fenolik bileşik ve flavonoidlerini belirlemeye yönelik bir çalışma yapmışlardır. Ekstraktların antioksidant kapasiteleri DPPH serbest anyon radikal ve ABTS serbest katyon radikal süpürücü, güç azaltıcı ve metal şelat aktivitesi bakımından ölçülmüştür. Bu bitkilerin metanolü ekstreleri farklı analizler sonucunda önemli bir antioksidan aktiviteleri sergilemişlerdir. Fenolik bileşikler ve flavanoit miktarları da önemli düzeyde olduğu belirtilmiştir. *Urtica dioica* bitkisinin ABTS 40,59 mmol TE/g DPPH 10,03 mmol TE/g metal şelat aktivite 3,05 mmol EDTAE/g ve güç azaltıcı 38,65 mmol AAE/g değerlerinde olduğu bildirilmiştir. Toplam fenolik içerik (Galik Aside karşı) 332,19 mg g-1 toplam flavonoid (quersetine karşı) 33,94 mg g-1 değerlerinde ölçülmüştür. Değerler karşılaştırıldığında ise bitkiler arasında en düşük flavonoid miktarı *U. dioica* bitkisinde ölçülmüştür. Bu sonuçlar bitkilerin metanolik ekstrelerinin gıda olarak, farmakoloji ve tıp sektörü için alternatif bir kaynak olarak kabul edilebilir olduğunu göstermiştir.

Kukrić ve ark. (2012) *Urtica dioica* türünün farklı gelişim aşamalarındaki taze yapraklarını klorofil a ve b, karotenoit, çözünebilir protein ve peroksidaz aktivitesinin ölçümü, kurutulmuş ısırgan yapraklarının etanol ekstraktlarını ise toplam fenol, flavanol ve flavanoit içeriğinin belirlenmesinde kullanmışlardır. Ayrıca enzimatik olmayan antioksidant aktivitesini belirlemek için FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), DPPH (2,2-diphenyl-picrylhydrazyl), ve ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) gibi farklı yöntemler kullanmışlardır.

Elde edilen sonuçlara göre klorofil, karotenoit, çözünebilir protein ve antioksidant aktivitenin genç yapraklarda istatistiksel olarak anlamlı olmasada daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca ısırgan yapraklarında peroksidaz enziminin iki izoformunu belirlemişlerdir. Isırgan yapraklarının etanol ile ekstraksiyonu ile elde edilen örneklerde

toplam fenolik birleşiklerin yüksek ancak flavanoid ve flavanollerin oldukça düşük olduğunu belirtmişlerdir.

2.4. Öncül Savunma Enzimlerinden Peroksidaz (POX) [EC 1.11.1.7]

Bitkilerde savunma mekanizmasında görev alan çeşitli enzimler sentezlenmekte ve gerekli durumlarda bitkiyi korumaktadır. Savunma mekanizmasının işleyişinde etkin bir şekilde yer alan öncül enzimlerden biri POX'tur. POX bitkilerdeki çoklu savunma sisteminin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır ve bitkilerin çoğunda kloroplastlarda sentezlenmektedir (Gara ve ark., 2003; Karabay ve ark., 2003; Türküsay ve Tosun, 2005).

POX'un işlevi meydana gelen metabolik olaylardan sonra ortaya çıkan toksik özellikteki H_2O_2 'yi su ve oksijene parçalamaktır, dolayısıyla POX reaksiyonu oksijen oluşumu izlenerek ölçülmektedir (Christensen, 1998; Çaylak, 2011).

Metabolik reaksiyon sonucu meydana gelen H_2O_2 ile birlikte POX uyarılır ve patojenin penetrasyonu engellenir (Koç ve Üstün, 2006).

Pestisit, metal içerikli sentetik gübreler, bitki büyüme düzenleyicileri gibi ürünlerin doz aşımı kullanımı, bitkide serbest oksijen radikallerinin açığa çıkmasına neden olmakta, strese giren bitkiler serbest oksijen radikallerinin, hücrelerinde meydana gelen oksidasyonunu önlemek amacıyla POX, CAT, SOD enzimleri gibi antioksidanlar meydana getirmektedirler (Vardar ve Ünal, 2009).

POX [EC 1.11.1.7] bitki metabolizmasında, hidrojen akseptörü olarak biyolojik oksidasyonlarda kritik bir rol oynar (Maranon ve ark., 1994). POX, bir yara, hasar bölgesinde patojenlerin girişiyle uyarılan savunma ve iyileştirme mekanizmalarını artırdığı düşünülmektedir (Kerby ve Somerville, 1992). Tüm yüksek bitkilerde bu enzimin varlığı belirlenmiştir. pH aralığı 3.5-9.5 arasında değişen bazik ve asidik olmak üzere iki ana izoperoksidaz grubu ayırt edilmiştir (Pomar ve ark., 1997).

2.5. Doku Kültürü

Doku kültürü, bitkilerin yaprak, hipokotil, kök vb. gibi kısımlarının aseptik koşullar altında alınarak (eksplant) tek bir hücreden ya da doku parçasından *in vitro* koşullar altında farklı besin ortamlarında üretilmesi ve üretilen embriyo ya da sürgünlerin olgunlaştırılarak tam bir bitkiye dönüşmesi olarak tanımlanmaktadır.

2.5.1. Doku kültürü uygulama alanları

- Propagasyonda (Çoğaltma)
- Genotip modifikasyonu, genetik mühendisliğinde
- Sekonder bileşiklerin üretiminde (biyomas)
- Bitki patolojisinde
- Bitkisel gen kaynaklarının muhafazasında
- Kaybolmakta olan türlerin korunmasında
- Çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde ve birçok çeşitli araştırma alanlarında

bitki doku kültüründen faydalanılmaktadır.

Doku kültürleri 1838-39'da Scheilden ve Schwalk'ın hücre çalışmasıyla başlamış, bunu 1902'de Haberland'ın aseptik kültürde bitki dokusunu geliştirmesi, 1904'te Hanning'in Cruciferae (Turpgiller familyası) de embriyo kültür çalışmaları takip etmiştir. 1934'te White, domates köklerini, B vitamini sağlayan bira mayası ekstresi kullanarak sürekli olarak geliştirmeyi başarmıştır. İlk defa 1950 yılında Prof. F.C. Stewart, Dr. Georges Morel bitkilerin doku kültürleriyle yetiştirilebileceğini göstermişlerdir.

Türkiye'de bu konudaki ilk çalışmalar 1970'li yılların ilk yarısında başlamıştır. 1973'te ilk bitki doku kültürü laboratuvarı Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde kurulmuş ve konuyla ilgili üretime yönelik çalışmalar başlatılmıştır. 1978'de Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığına bağlı Ege Bölge Zirai Araştırma Enstitüsünde, hemen arkasından Yalova'da Atatürk Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsünde ve Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nde doku kültürü laboratuvarları kurulmuş ve çalışmalar başlamıştır.

Yapılan ilk çalışmalar, besin ortamına konulan bitki hücre, doku ya da organ gibi kısımlarının *in vitro* çoğaltılması ve rejenerasyonun sağlanması üzerine olmuştur. Olgun embriyoların kültürü, kök kültürü, apikal meristem kültürü, kallus ve hücre süspansiyon kültürü ilk çalışmalar olarak sayılabilmektedir

Doku kültürü alandaki çalışmalar, daha sonraki yıllarda çeşitlilik göstermeye başlamıştır. Germplazm muhafazası, somatik hibridizasyon, haploid bitki üretimi, doğada tozlaşması mümkün olmayan türlerin hibridizasyonu, somaklonal varyasyon ve gen transferi gibi bitki ıslahında uygulama alanlarının yanı sıra ticari ve ıslah dışı çalışmalarda, hastaliksız bitki üretimi, mikroçoğaltım, sentetik tohum üretimi ve sekonder metabolit üretimi gibi çok çeşitli doku kültürü çalışmaları yapılmaktadır. Günümüzde ise doku

kültürü, daha çok genetik mühendisliğinde bir araç olarak kullanılmaktadır (Çördük, 2007).

Gen aktarım çalışmalarında en önemli aşama, bitkinin *in vitro* rejenerasyonunun sağlanmasıdır. Bir bitki hücre, doku veya organ gibi kısımlarının *in vitro* ortama alınması ve çeşitli doku kültürü çalışmalarının yapılabilmesi için bu bitki kısımlarından *in vitro* rejenerasyonun sağlanması gerekmektedir. Besi ortamına konulan bitki kısımlarından rejenerasyonun sağlanmasında ekzojen ve endojen birçok faktör etkili olabilmektedir.

Bitki genotipi, fizyolojik durumu, bitkinin yaşı gibi faktörler arasında rejenerasyonu yöneten en önemli faktör bitki büyüme düzenleyicileridir (İşlek ve ark., 2010).

Uygun bitki büyüme düzenleyicisi konsantrasyonu ve kombinasyonları seçilerek bir bitkinin hücre, doku veya organ gibi kısımlarından rejenerasyon sağlanabilmektedir (Morsünbül ve ark., 2010).

Son yıllarda hızla gelişen yeni ıslah yöntemleriyle bitkilerin olumlu özelliklerini bozmadan, verim ve kaliteyi yükseltecek bazı yeni özelliklerin eklenmesine ve çıkarılmasına yönelik ümit verici çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar, doğrudan gen aktarımı, rekombinant DNA, protoplast füzyonu ve benzeri ıslah yöntemleri kullanılarak başarılabilmektedir.

Ekonomik önemi olan bitkilerin, verimini arttırmak, hastalık ve zararlılara karşı dirençli hale getirmek amacı ile gerçekleştirilen bilinen ıslah metodlarının yanı sıra günümüzde doku kültürü ile yetiştirilen bitkilerin çok daha kısa sürelerde ve kontrollü koşullar altında istenen özelliklere sahip olması sağlanabilmekte, aklimatizasyon sayesinde doğal koşullarına uyum sağlaması gerçekleştirilmektedir (Dalar, 2008).

Biyolojik ve genetik çeşitliliğin korunabilmesi için endemik, nadir ve tıbbi önemi olan *Sideritis trojana*, *Digitalis trojana* gibi türleri ile ilgili çalışmalar da gerçekleştirilmiştir (Çördük ve Akı, 2011; Çördük ve Akı, 2010).

2.5.2. Doku kültüründe temel aşamalar

- Uygun bir laboratuvar düzeninin kurulması,
- Kullanılacak bitki parçalarının ve besin ortamlarının seçimi, hazırlanması ve sterilizasyonu,
- Kallus ve hücre süspansiyonlarının oluşturulması,

- Kallus veya hücre süspansiyonlarından veya doğrudan somatik veya gametik hücrelerden bitki rejenerasyonunun teşvik edilmesi (organogenez, somatik embriyogenez veya meristem çoğaltımı yoluyla),

- Oluşan sürgünlerin çoğaltılması ve boylarının uzatılması, somatik embriyoların olgunlaştırılması,

- Uzayan sürgünlerin köklendirilmesi,

- Köklenen bitkilerin dış ortama alıştırılması (aklimatizasyon) olarak sıralanabilir.

2.5.3. Doku kültürü besi ortamı bileşenleri

Bitki doku kültürü besi ortamları, tamamen yapay ortamda bitkiden alınan herhangi bir parçanın büyüme ve gelişmesine olanak tanıyacak şekilde hazırlanmaktadır. Hazırlanan bu besi ortamları üç temel bileşen içermektedirler. Bunlar; bitkinin ihtiyaç duyduğu ve çoğunlukla toprakta bulunabilen mineral elementler, organik maddeler (vitaminler, aminoasitler) ve karbon kaynağıdır.

Besi ortamına ilave edilen mineral elementler, bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan elementlerdir ve doku kültüründe yaygın olarak kullanılan besi ortamlarına bitkilerin alabileceği formlarda eklenmektedirler. Bunlar, makro ve mikro elementler olarak ikiye ayrılmaktadırlar (Çizelge 4 ve Çizelge 5). Makro elementler; besi ortamına büyük miktarlarda ilave edilen elementler iken, mikro elementler ise az miktarlarda ilave edilen elementlerdir.

Çizelge 4. Besi ortamına ilave edilen makro elementler (Trigiano ve ark., 1996)

Element	Görevi	İlave Edilen Formu
Kalsiyum	Kalsiyum birçok enzimin ko-faktörü olarak görev alır ve özellikle hücre duvarı sentezi için önemlidir.	CaCl_2 veya Ca NO_3
Magnezyum	Enzimlerin fonksiyonları için kritiktir ve klorofil molekülü için gerekli bileşiktir. Bitkilerde negatif yüklü iyonları dengeleyen katyondur.	MgSO_4
Nitrojen	Genel büyüme için ve bitkinin yaşamı için gereklidir. Çoğunlukla inorganik nitrojen aminoasitlere sonrada proteinlere dönüştürülmektedir.	NO_3^- , NH_4^+
Fosfor	Nükleik asit ve diğer yapısal bileşiklerin önemli bir parçasıdır.	KH_2PO_4
Sülfür	Birçok önemli sülfür içeren aminoasitlerde mevcut önemli proteinlerin yapıları için kritiktir.	$\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Çizelge 5. Besi ortamına ilave edilen mikro elementler (Trigiano ve ark., 1996)

Element	Görevi	İlave Edilen Formu
Bor	Lignin biyosentezinde ve fenolik asit metabolizması ile ilgili enzimatik aktivitelerde gereklidir.	H ₃ BO ₃
Kobal	Bazı vitaminlerin bileşenidir.	CoCl ₂ 6H ₂ O
Bakır	Sitokrom oksidaz sistemini de içeren birçok enzim reaksiyonu için kritiktir.	CuSO ₄ 5H ₂ O
İyot	İyotun etkisi bitki türüne göre çeşitlilik göstermektedir. Kültürde kallus ve kök büyümesini ilerlettiği bulunmuştur.	KI
Demir	Birçok oksidasyon redüksiyon reaksiyonları için gerekli olduğu kadar klorofil sentezi için de gereklidir.	FeSO ₄ 7H ₂ O
Mangan	Enzimatik reaksiyonlar için özellikle solunum ve fotosentezde gereklidir.	MnSO ₄ 4H ₂ O
Molibden	Nitratın amonyuma dönüşmesini içeren iki enzimatik reaksiyonda kofaktör olarak görev alır.	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O
Çinko	Kloroplast gelişimi için önemlidir, birçok enzimatik reaksiyon için gereklidir.	ZnSO ₄ 7 H ₂ O

Makro ve mikro elementlere ilaveten karbon kaynağı olarak ucuz ve kolay ulaşılabilir olması nedeniyle sükroz tercih edilmektedir. Diğer karbonhidrat kaynakları da

sükroz yoksa kullanılabilir. Jel yapıcı madde olarak deniz yosunu olarak bilinen alglerden elde edilen agar kullanılmaktadır.

Bitki büyüme düzenleyicileri olarak bilinen hormonların genel etkileri hormon çeşitlerine göre farklılık göstermektedir (Çizelge 6).

Çizelge 6. Bitki büyüme düzenleyicileri ve genel etkileri (Smith, 2000)

Hormon	Genel Etkisi
Oksinler	Fotoperiyodizm, köklendirme, apikal dominans, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi ve hücre gelişimi.
Sitokininler	Hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma, bitki rejenerasyonu, sürgün çoğaltımını etkiler, sürgünlerde köklenmeyi ve embriyogenesisi engeller.
Giberellinler	Meristemlerden bitki rejenerasyonun uyarılması, sürgünlerin boylarının uzatılması, embriyo ve ovül kültürlerinin gelişiminde, kallus gelişimi, organogenesis ve adventif kök oluşumunu engeller.
Absisik Asit	Doku kültüründeki rolü tam olarak bilinmemekle beraber somatik embriyoların geliştirilmesinde kullanılmaktadır.
Etilen	Köklerin uzamasını engelleyerek enine büyüme ve çoğalmayı arttırmaktadır.

2.5.4. Bitki doku kültür şartları

Sıcaklık : Kültür odalarında kullanım amacına göre 18 ± 2 , 22 ± 2 veya $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanır.

Işık: Genellikle beyaz ve serin olan floresan lambalarıyla sağlanmaktadır. (16 saat ışık ve 8 saat karanlık uzun gün koşuluna ayarlanır).

Nem: %50-70 arasında bir değere ayarlanır.

Hava değişimi için ticari olarak permeabl kapaklar tasarlanmıştır, böylece fotosentez için gerekli olan karbondioksit (CO_2) girişi sağlanır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel materyal

Çalışmamızda bitkisel materyal olarak *Urtica dioica* L. türü kullanılmıştır. Türe ait olan sertifikalı tohumlar Ekodoğa Tohumculuk Zirai ve Tarımsal Ürünler İmalat İnş. Kimya Plastik Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi'nden alınarak bitkinin *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda yetiştiriciliği için kullanılmıştır.

Ayrıca karşılaştırma yapabilmek için doğal örnek olarak Çanakkale Biga, Kalafat Köyü mevkiinden toplanan doğal ortamda gelişmiş olan bitkiler kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasal maddeler

- Pyrogallol,
- Sodyum fosfat,
- Aseton,
- Brilliant blue G-250,
- Bovine serum albumin (BSA),
- Metanol (Sigma 24229),
- Etanol,
- Asetik asit (Glasiyel) (Sigma 27225),
- Murashige and Skoog Basal Medium (MS) (M9274),
- Sükroz (Sigma S9378),
- Agar (Acumedia 7178),
- α - Naphthaleneacetic acid (NAA) (Sigma N0640),
- 6-Benzylamino purine (BAP),
- Alüminyum klorür ($AlCl_3$)
- Hidrojen peroksit,
- Sodyum asetat

3.1.1.Sarf Malzemeleri

Viyol (32'lik), petri kapları, macenta kapları, piset, mezür, pens, bistüri, ependorf, kurutma kağıdı, alüminyum folyo, streçfilm, beher, filtre kağıdı, porselen havan, mikropipet uçları.

3.2. Yöntem

3.2.1. *In vivo* yetiştiricilik

Urtica dioica L. fidelerinin tohumları steril edilmiş 1:1 toprak:perlit içeren viyollere ekilmiştir. Viyoller bölümümüzde bulunan bitki yetiştirme odasında, uzun gün koşulları, (16 saat ışık, 8 saat karanlık altında) $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 28.080 lüks floresan ışık şiddetine sahip ortamda çimlenmeye ve yetiştirmeye tabi tutulmuştur. Her bir viyol gözüne yaklaşık 2cm. derinliğe 4-6 tohum ekilmiştir. Bitkiler gerektiğinde saf su ile sulanmıştır. 10 haftalık bitkilerden yaprak örnekleri alınmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. *In vivo* ortamda yetiştirilen 10 Haftalık *U. dioica* fideleri.

3.2.2. *In vitro* yetiştiricilik

Tohumların yüzeysel sterilizasyonu 6dk. %70'lik etanol ve 4 dk. %5'lik sodyum hidroklorit ile gerçekleştirilmiştir. Ardından tohumlar 3 kez steril saf sudan geçirilmiştir. Yüzeysel sterilizasyonu gerçekleştirilmiş tohumları; her biri 20-25 ml MS0, 1:1 BAP:NAA (2mg/ml: 2mg/ml) ve 1:2 BAP:NAA (2mg/ml: 4mg/ml) içeren petri kaplarına ekimleri yapılmıştır. Her bir ortam için 25 petri kabı, her bir petriye ortalama 8 tohum gelecek şekilde toplam 75 petriye ortalama 600 tohum ekilmiştir.

MS0 ortamındaki tohumlarda çimlenme başarısına ulaşıldığı için, MS0 ortamında çimlenen fideler ekimlerinden 4 hafta sonra, her biri 60ml MS0 içeren 750ml'lik macenta kaplarına alınmıştır. Her bir macenta kabına 2-3 bitki fidesi gelecek şekilde 50 macenta kabına şaşırtma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlerin ardından 10 haftalık bitkilerden yaprak örnekleri alınmıştır (Şekil 6).

3.2.2.1. Bitki büyüme düzenleyicilerinin hazırlanması (10mg/10ml)

10 mg NAA ilk önce 8 ml NaOH (1M) 'da çözündürülmüştür. Daha sonra üzerine 2ml saf su yavaş yavaş eklenmiştir.



Şekil 6. *In vitro* ortamda yetiştirilen 10 haftalık *U. dioica* bitkisi.

3.2.3. Doğadan toplama

Çalışmamızda kullandığımız doğal bitkileri Çanakkale Biga Kalafat köyü mevkiinden trafiğe uzak bir ortamdan toplanmıştır. *U. dioica* çok yıllık bir bitki olduğu için toplama esnasında geç bitkilerin seçilmesine özen gösterilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Doğal ortamdan toplanan *U. dioica* bitkileri a) doğal ortamında b) laboratuvarında.

3.2.3.Yaprak ekstraktlarının hazırlanışı

3.2.3.1. Klorofil ve karotenoid tayini için

Klorofil ve karotenit tayini Arnon'a (1949) göre gerçekleştirilmiştir. Zayıf ışık altında *Urtica dioica* türünün farklı ortamlarda yetişen örneklerinin yapraklarından hassas terazi yardımıyla 0,5g tartılmıştır. Örnekler porselen havan içerisine alınarak mikropipet yardımıyla 15ml aseton (%80) ilave edilmiş ve buz kalıplarının üzerinde yapraklar tamamen ezilinceye kadar karıştırılmıştır. Oluşan homojenat kurutma kağıdından süzülerek katı partiküller uzaklaştırılmıştır. Sıvı özüt santrifüj tüplerine konarak 15 dk. 3000 rpm'de 4°C'de santrifüj edilmiştir. İşlemler esnasında soğuk zincirin kopmamasına dikkat edilmiştir.

3.2.3.2. Total protein ve peroksidaz (POX) tayini için

Protein analizi Bradford (1976) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için belirli bir büyüklüğe erişmiş sağlıklı yapraklar seçilerek hassas terazide 0,5'er gram tartılmıştır. Buz bulunan bir kap içerisine porselen havan yerleştirilmiştir. Yapraklar ve 5 ml soğuk 0,05 M (pH 6.5) sodyum asetat tamponu havana konularak yaklaşık 5dk. boyunca homojenize edilmiştir. Homojenat, kurutma kağıdı yardımı ile buzlu su içerisinde bulunan bir behere süzülmüştür. Süzülen homojenat her örnek için 4 santrifüj tüpüne aktarılmış ve 4°C'de 13000 rpm'de 20 dk. santrifüj yapılmıştır. Tüplerin üzerindeki süpernatant kısmı analizler için kullanılmıştır.

3.2.4. Standart çözeltilerin hazırlanması**3.2.4.1. Sodyum asetat tamponu**

1. 250 ml saf su içerisinde 1.774 gr Na_2HPO_4 eklenir.
2. Manyetik karıştırıcıda çözününceye kadar karıştırılır.
3. Çözeltinin pH'sı 6.2 - 6.5 arasında ayarlanır (pH, 0.1 M HCl ve 0.5 M NaOH kullanılarak ayarlanabilir).
4. Sodyum asetat tamponu 1 haftayı geçmemek şartı ile kullanılacağı zamana kadar buzdolabında saklanabilir.

3.2.4.2. Brilliant blue G-250 ayırıcı

1. 50 mg G-250 tartılır ve üzerine 25 ml 95%'lik etanol ilave edilir
2. Manyetik karıştırıcıda çok yavaş bir şekilde tamamen çözününceye kadar karıştırılır.
3. Üzerine 50 ml orto-fosforik asit eklenir.
4. Final hacim saf su ile 500 ml' ye tamamlanır.
5. Çalışılacak kadar miktar filtre kağıdından süzülür ve kullanılır.
6. Kalan miktar koyu renkli bir şişe içerisinde buzdolabında muhafaza edilir.

3.2.4.3. Pyrogallol (0.1M)

1.26 g Pyrogallol tartılarak 100 ml saf su içerisinde çözdürülür.

3.2.4.4. Hidrojen peroksit (90 mm)

9 ml H_2O_2 91 ml su içerisine karıştırılır.

3.2.5. Analizler**3.2.5.1. Klorofil ve karotenoidlerin analizi**

Hazırlanan homojenatların her biri spektrofotometre tüplerine konularak 663nm, 645nm ve 440nm'de ölçümleri yapılmıştır. Çıkan sonuçlar aşağıdaki hesaplamalar yöntemlerine tabi tutularak sonuçlara ulaşılmıştır.

$$C_a = 0.0127 A_{663} - 0.00269 A_{645}$$

$$C_b = 0.0029 A_{663} - 0.00468 A_{645}$$

$$C_{a+b} = 0.0202 A_{663} + 0.00802 A_{645}$$

$$C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1.90C_a - 63.14C_b}{214}$$

C_a = Bitki ekstresindeki klorofil a konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)

C_b = Klorofil b konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)

C_{a+b} = Total klorofil konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)

C_{x+c} = Total karotenoid konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)

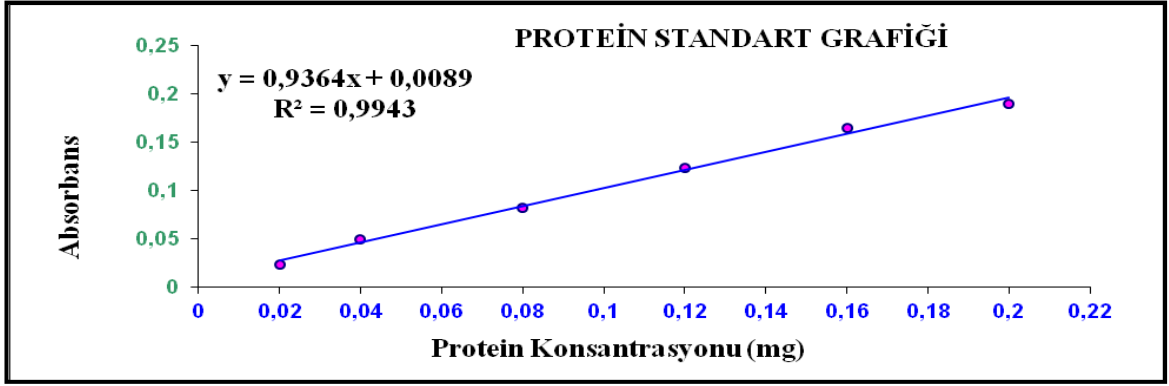
3.2.5.2. Protein analizi

Protein analizi Bradford (1976) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Protein standardı olarak Bovine Serum Albumin (BSA) stok solüsyonundan hazırlanmıştır. Bu amaçla 2 mg/ml'lik ampul BSA'den 0,02 mg/ml; 0,04 mg/ml; 0,08mg/ml; 0,12 mg/ml; 0,16 mg/ml ve 0,20 mg/ml konsantrasyonlar olacak şekilde standart grafik hazırlanmıştır.

Total protein ölçümlerinde kolorimetrik reaksiyon için Brilliant Blue G-250 kullanılmıştır. Son olarak spektrofotometrede 595nm'de ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bulunan absorbanslardan standart grafikten elde edilen eğim grafiğine uygun olarak gerekli hesaplamalar yapılmıştır. Protein standardı verileri ve grafiği ile denklemi aşağıdaki çizelge 7 ve şekil 8' de gösterilmiştir.

Çizelge 7. Protein standart verileri

Protein Konsantrasyonu	Absorbans
0,02 mg protein	0,023
0,04 mg protein	0,050
0,08 mg protein	0,082
0,12 mg protein	0,124
0,16 mg protein	0,165
0,20 mg protein	0,190



Şekil 8. Protein standart grafiği.

3.2.5.3. POX [EC 1.11.1.7] enzim aktivitesi analizi

Peroksidaz aktivitesinin spektrofotometrik ölçümleri için Kanner ve Kinsella (1983) metodu kullanılmıştır. Ölçümlere geçmeden önce 2 adet kör hazırlanarak 300 nm dalga boyunda sıfırlama işlemi yapılmıştır. Ölçümler kuartz küvette yapılmıştır.

Ölçüm yapılacak olan kuartz küvete önce 670 µl önceden hazırladığımız sodyum asetat tamponu, ardından 200 µl pyrogallol (bu değer her zaman sabittir) ve 30 µl bitki örneği konularak spektrofotometredeki kuyucuğa yerleştirilmiştir. Kalan 100µl H₂O₂ (bu değer her zaman sabittir) ise küvet kuyucuğa yerleştirildikten sonra karışıma eklenmiştir. Bunun nedeni H₂O₂ eklendikten sonra reaksiyonun hemen başlamasıdır.

POX kinetik reaksiyonunun analizi için spektrofotometrede 300 nm'de 120 sn süre ile ölçüm yapılmıştır. 120 sn içerisinde her 10 sn'de bir alınan absorbans değerleri kaydedilerek elde edilen absorbans değerleri arasında en büyük farkı gösteren aralık belirlenmiştir. Elde edilen absorbans değerleri arasındaki en büyük fark belirlenerek gerekli seyreltmeler ile çevrimler yapılmıştır ve mg protein düzeyine çevrilerek µmol/mgprot/dk enzim birimi olarak verilmiştir.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Bitkisel Materyalin Yetiştiriciliği ile İlgili Sonuçlar

4.1.1 *In vivo* yetiştiricilik sonuçları

Urtica dioica bitkisinin sertifikalı tohumları bitki yetiştirme odasında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık uzun gün koşullarında $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 28.080 lüks floresan ışıkta, 10 hafta boyunca *in vivo* ortamda yetiştirilmiştir. Tohumlar 32'lik viyollere her bir viyol gözüne ortalama 4-6 tohum gelecek şekilde ekimler yapılmış ve yüksek çimlenme başarısı elde edilmiştir.

Şekil 9'da ekim yapılmış, Şekil 10'da 1 haftalık ve şekil 11'de 10 haftalık *U. dioica* bitki fideleri gösterilmektedir.



Şekil 9. Viyollere ekimi yapılmış *U. dioica* tohumları.



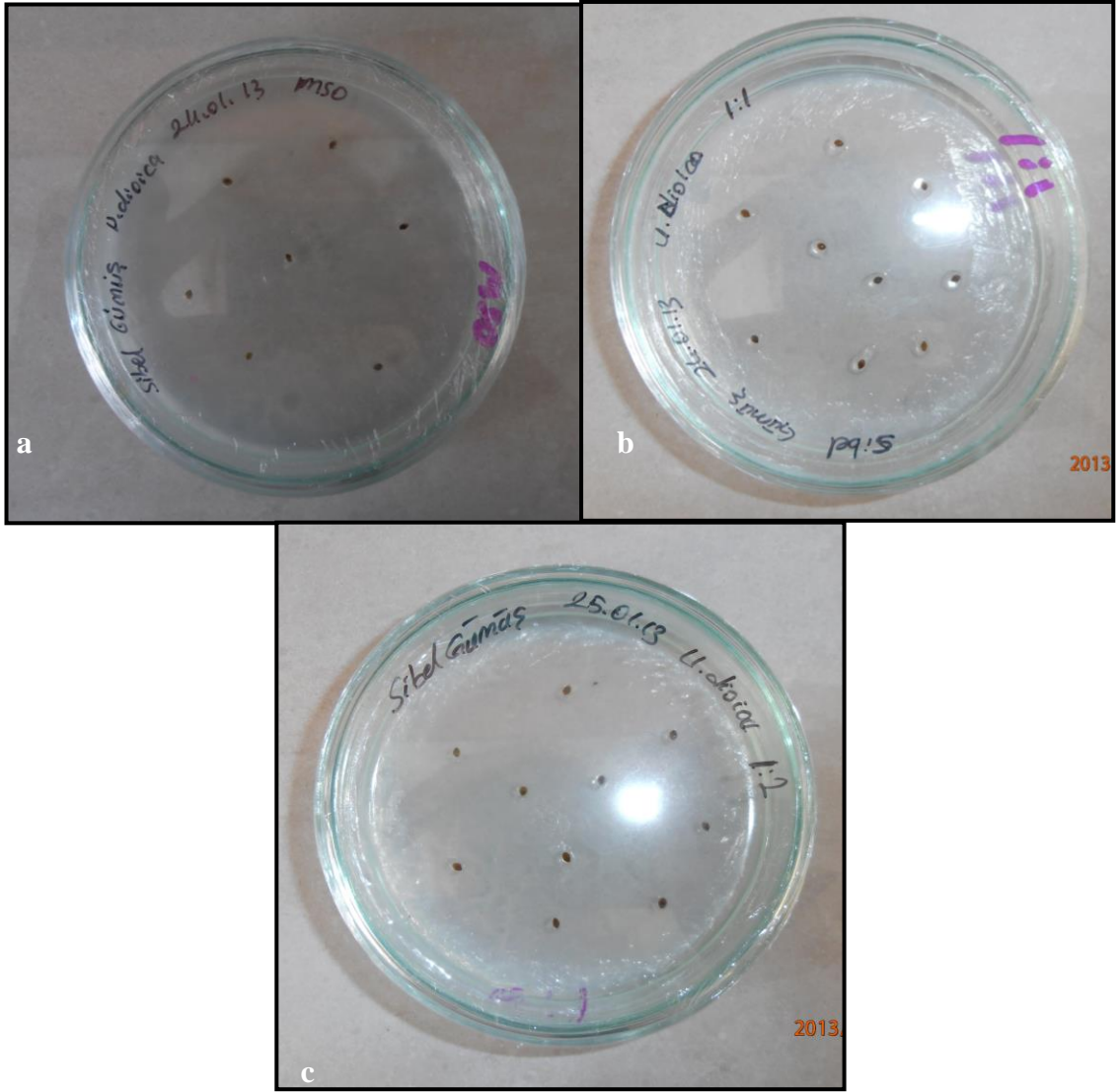
Şekil 10. Bir haftalık *U. dioica* fideleri.



Şekil 11. 10 haftalık *U. dioica* fideleri.

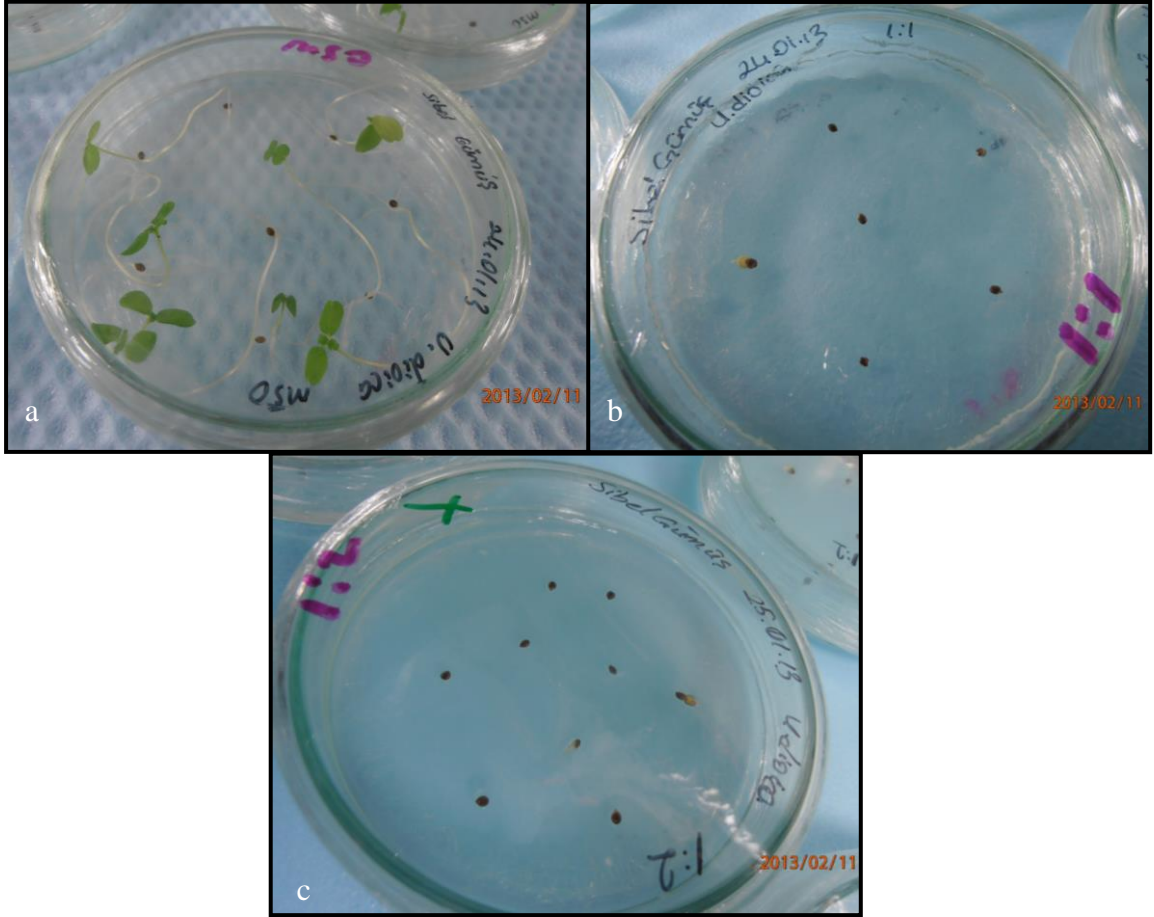
4.1.2 *In vitro* yetiştiricilik sonuçları

Yüzeysel sterilizasyonu yapılan *U. dioica* tohumları her bir petriye ortalama 8 tohum gelecek şekilde 25 petri MS0, 25 petri 1:1 BAP:NAA ve 25 petri 1:2 BAP:NAA içeren ortamlara toplam 75 petriye ekim yapılmıştır (Şekil 12).



Şekil 12. Besi ortamına ekimi gerçekleştirilmiş *U. dioica* tohumları a) MS0 b) 1:1 BAP:NAA c) 1:2 BAP:NAA.

MS0 ortamında çimlenme %74,55 olarak belirlenmiştir. 1:1 BAP:NAA içeren ortamda çimlenme yüzdesi %14,89 ve 1:2 BAP:NAA içeren ortamda ise % 11,44 olarak belirlenmiştir. Çimlenen tohumlar şekil 13’de görülmektedir.



Şekil 13. *In vitro* koşullarda çimlenmiş *U. dioica* tohumları a)MS0 b) 1:1 BAP:NAA c) 1:2 BAP:NAA.

1:1 BAP:NAA ve 1:2 BAP:NAA ortamlarında çimlenen tohumlar ise gelişimlerine devam etmemişler ve kallus oluşumuna geçmişlerdir. Çimlenme ve yetiştirme başarısına ulaşılan MS0 besi ortamındaki *U. dioica* fideleri daha rahat büyümelerini sağlamak amacı ile içerisinde MS0 besi ortamı içeren 750ml'lik kavanozlara alınmıştır (Şekil 14). Bitkiler gelişimlerinin sonuna kadar bu ortamda yetiştirilmiştir (Şekil 15).



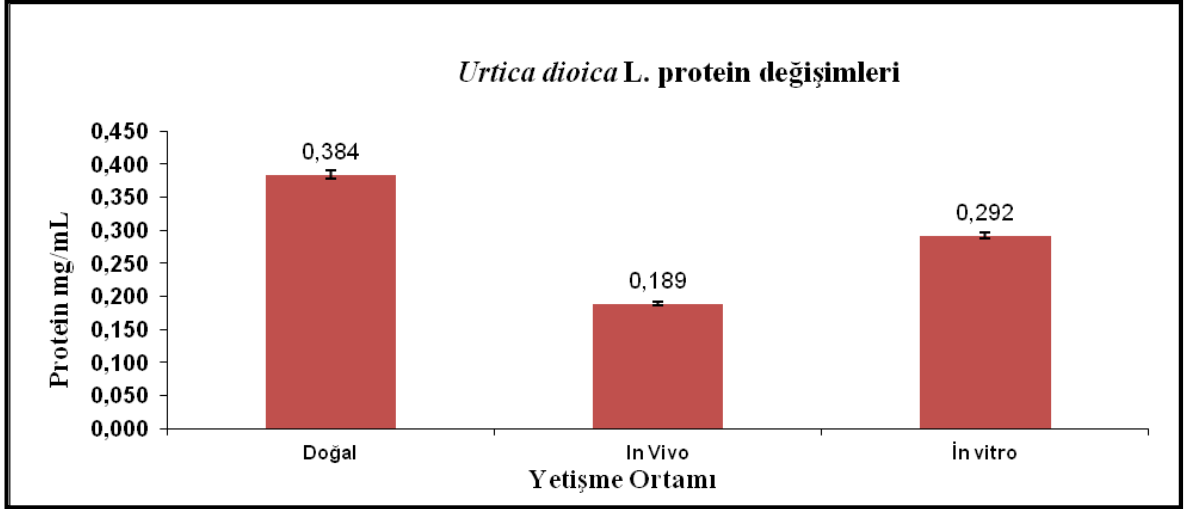
Şekil 14. Kültür kaplarına aktarılan *U. dioica* fideleri.



Şekil 15. 10 haftalık *in vitro* ortamda yetişen *U. dioica* fideleri.

4.2. *Urtica dioica* L. Türünde Total Protein Bulguları

Doğal ortamdan toplanan *in vivo* ve *in vitro* olarak tohumdan yetiştirilen 10 haftalık *U. dioica* fidelerine ait olan sağlıklı yapraklardan yapılan total protein analiz sonuçlarımıza göre, doğal ortamdan toplanan bitkilerin yaprak ekstraktlarında saptanan total protein değişimleri 0,384mg/ml, *in vivo* 0,189 ve *in vitro* 0,292 olarak belirlenmiştir. En yüksek total protein miktarı doğal ortamdan toplanan bitkiden elde edilmiştir (Çizelge 8 ve Şekil 16). Doğal ortamdan toplanan bitkilerin protein değerleri *in vivo* ortamda yetiştirilenlerden % 50.78, *in vitro* ortamdakilerden ise % 23.85 daha yüksek bulunmuştur.



Şekil 16. *Urtica dioica* L. türünde total protein değişimi.

Çizelge 8. Yetiştirme ortamlarına göre *Urtica dioica* L. türünde total protein değişimi

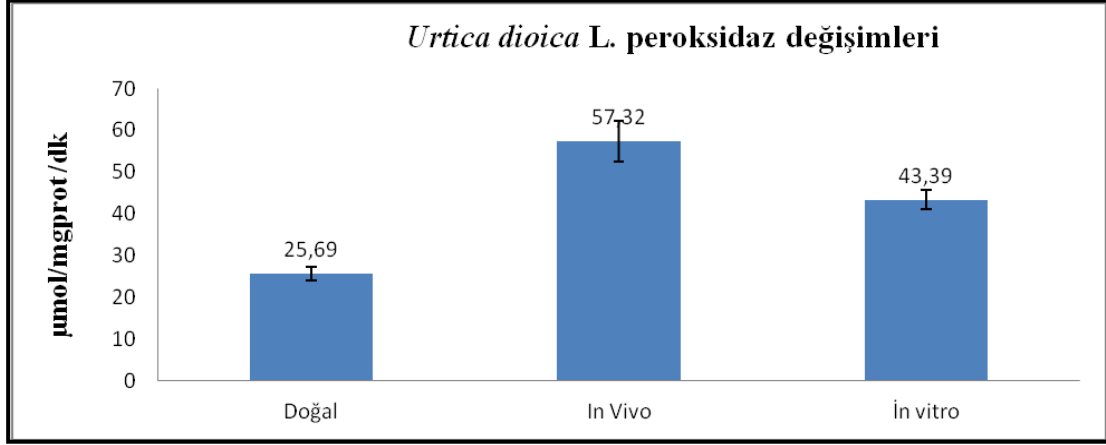
YETİŞME ORTAMI	TOTAL PROTEİN MİKTARI (mg/ml)
DOĞAL	0,384± 0,006
IN VIVO	0,189± 0,003
IN VITRO	0,292± 0,005

4.3. *Urtica dioica* L. Türünde Peroksidaz (POX) Bulguları

Doğal ortamdan toplanan *in vivo* ve *in vitro* olarak tohumdan yetiştirilen 10 haftalık *U. dioica* fidelerine ait olan sağlıklı yapraklardan yapılan peroksidaz analizi sonuçlarımıza göre, doğal ortamdan toplanan bitkilerin yaprak ekstraktlarında saptanan peroksidaz miktarı değişimleri 25,69 mg/ml/dk, *in vivo* 57,32 mg/ml/dk ve *in vitro* 43,39 mg/ml/dk olarak belirlenmiştir. En yüksek peroksidaz faaliyeti *in vivo* koşullarda yetişen *U. dioica* bitkisinde gözlenmiştir. *In vivo* ortamda yetiştirilen bitkideki POX aktivitesi *in vitro* ortamdakinden % 24.30, doğal ortamdan toplanandan ise % 55.18 daha yüksek ölçülmüştür. Değişimlere ilişkin veriler çizelge 9 ve şekil 17 de gösterilmiştir.

Çizelge 9. Yetiştirme ortamlarına göre *Urtica dioica* L. türünde peroksidaz (POX) değişimi

YETİŞME ORTAMI	POX AKTİVİTESİ (µmol/mgprot/dk)
DOĞAL	25,69± 1,67
IN VIVO	57,32± 4,81
IN VITRO	43,39± 2,27



Şekil 17. *Urtica dioica* L. Türünde peroksidaz (POX) Değişimi.

4.4. *Urtica dioica* L. Türünde Klorofil ve Karotenoid Bulguları

Doğal ortamdaki toplanan *in vivo* ve *in vitro* olarak tohumdan yetiştirilen 10 haftalık *U. dioica* fidelerine ait sağlıklı yapraklardan yapılan klorofil ve karotenoid analizi sonuçlarına göre, doğal ortamdaki toplanan bitkilerin yaprak ekstraktlarında saptanan en yüksek klorofil a 0,523 mg/g YA ile doğal ortamdaki toplanan örneklerde saptanmıştır. En yüksek klorofil b 0,779 mg/g YA ile *in vivo* ortamda yetiştirilen örneklerde ve en yüksek karotenoid değeri ise 0,0004 mg/g YA ile doğal ortamdaki toplanan örneklerde rastlanmıştır. Total klorofil miktarı ise en yüksek 1,266 mg/g YA ile *in vivo* ortamda yetiştirilen *U. dioica* bitkisinde ölçülmüştür. Toplam klorofil değerleri dikkate alındığında *in vivo* ortamda yetiştirilen bitkilerin değerleri doğal ortamdaki toplananlara oranla % 28.73, *in vitro* ortamda yetiştirilenler oranla ise % 10.42 daha yüksektir. Bitkide ölçülen klorofil ve karotenoid miktarları çizelge 10'da verilmiştir.

Çizelge 10. *Urtica dioica* L. türünde klorofil ve karotenoid miktarları

YETİŞME ORTAMI	Klorofil a (mg/g YA)	Klorofil b (mg/g YA)	Total klorofil (mg/g YA)	Karotenoid (mg/g YA)
DOĞAL	0,523±0,025	0,516±0,008	1,039±0,030	0,0004±0,0001
IN VIVO	0,487±0,010	0,779±0,016	1,266±0,028	0,0003± 0,0001
IN VITRO	0,493±0,012	0,641±0,014	1,134±0,025	0,0003± 0,0001

4.5. Tartışma

Urtica dioica bitkisinin ekonomik ve tıbbi önemi değerlendirildiğinde, üzerinde geliştirilebilecek çalışmalar ve endüstriyel üretim olasılıkları düşünüldüğünde, bitkinin hangi ortamda yetiştirilmesinin daha yüksek olduğunun belirlemek oldukça önemlidir. Bu amaçla çalışmamızda farklı yetiştirme ortamlarındaki *U. dioica* bitkilerinin total protein, klorofil, karotenoid ve peroksidaz aktivitelerini karşılaştırmıştır.

Yapılan analizler sonucunda total protein değerlerindeki değişimler incelendiğinde, doğal ortamdan toplanan bitki örneklerinde total protein miktarı *in vivo* ortamda yetiştirilenlerden % 50.78, *in vitro* ortamdakilerden ise % 23.85 daha yüksek bulunmuştur.

Doğal ortamda bitki gelişimi için gerekli makro ve mikro elementler, ışık, sıcaklık, nem, mekanik etkiler vb. değerler daha uygun olduğundan, bitkinin metabolik faaliyetlerini daha iyi gerçekleştirdiği için bu sonuçların beklenen doğrultuda olduğu düşünülmektedir. *In vivo* ortamda yetişen bitkilere oranla *in vitro* ortamdaki bitkilerin protein değerleri %35.27 daha yüksek çıkmıştır. Doku kültürü ortamının, hazırlanan toprak-perlit karışımına oranla bitki besin elementleri bakımından daha optimum bir ortam olduğu düşünüldüğünde bitkinin metabolik faaliyetler ve dolayısı ile protein sentez mekanizmasında daha başarılı olması kaçınılmazdır.

Bitkilerde stres koşulları altında reaktif oksijen türevlerinin (ROT) üretiminde artış olduğu bilinen bir gerçektir. ROT'ların detoksifikasyonu için bitkilerde öncül savunma enzimleri devreye girmektedir. Peroksidazlar (POX) da bu öncül savunma enzimlerindedir. Süperoksit radikallerinin süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile H₂O₂'ye dönüşümünden sonra POX H₂O₂'yi H₂O ve O₂'ye parçalayarak detoksifikasyonu sağlar.

Yapılan analizler sonucunda en yüksek POX aktivitesi *in vivo* ortamda yetiştirilen *U. dioica* bitkilerinde gözlenmiştir. *In vivo* ortamda yetiştirilen bitkideki POX aktivitesi *in vitro* ortamdakinden % 24.30, doğal ortamdan toplanandan ise % 55.18 daha yüksek ölçülmüştür. Doğal ortam ve *in vitro* ortam, *in vivo* ortama göre bitki gelişimi için daha uygun olduğu düşünülmektedir. *In vivo* ortamda yetişen bitkiden alınan örneklerde POX aktivitesinin daha yüksek çıkmasındaki muhtemel nedenlerden birinin de mekanik stress olduğu düşünülmektedir. 10 hafta boyunca gelişimlerini viyol içerisinde gerçekleştiren bitkilerin özellikle de köklerinin yoğun mekanik stress altında kalması olasıdır.

Klorofil a değeri en yüksek doğal ortam, klorofil b değeri en yüksek *in vitro* ortam ve toplam klorofil değeri en yüksek *in vitro* ortamda ölçülmüştür. Karotenoid değerleri ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da en yüksek doğal ortamda yetiştirilen bitkilerde

ölçülmüştür. Toplam klorofil değerleri dikkate alındığında *in vivo* ortamda yetiştirilen bitkilerin değerleri doğal ortamdan toplananlara oranla % 28.73, *in vitro* ortamda yetiştirilenler oranla ise % 10.42 daha yüksektir.

Gerçekleştirilen analiz sonuçlarına göre *U. dioica* bitkisi için en uygun gelişme ortamı doğal ortamdır. Ancak üzerinde gerçekleştirilecek biyoteknolojik çalışmalar düşünüldüğünde *in vitro* ortamda da yetiştirme başarısı oldukça yüksektir.

Kukrić ve arkadaşları (2012) *Urtica dioica* türünün farklı gelişim aşamalarındaki taze yapraklarını klorofil a ve b, karotenoit, çözünebilir protein ve peroksidaz aktivitesinin ölçümü, kurutulmuş ısırgan yapraklarının etanol ekstraktlarını ise toplam fenol, flavanol ve flavanoit içeriğinin belirlenmesinde kullanmışlardır. Ayrıca enzimatik olmayan antioksidant aktivitesini belirlemek için FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), DPPH (2,2-diphenyl-picrylhydrazyl), ve ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) gibi farklı yöntemler kullanmışlardır.

Elde edilen sonuçlara göre klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve karotenoit miktarları için genç yapraklarda daha yüksek değerler ölçülmüştür. Bizim çalışmamızda da genç yapraklardan örnekler alınarak değerlendirmeler yapılmış ve yüksek klorofil değerlerine rastlanmıştır.

Aynı zamanda bu çalışmada çözünebilir protein ve antioksidant aktivitenin genç yapraklarda istatistiksel olarak anlamlı olmasada daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Buradan farklı gelişim aşamasındaki yaprakların fizyolojik farklılıkların bir kanıtı olarak değerlendirilebileceği sonucuna varmışlardır. Benzer bir biçimde bizim çalışmamızda da elde edilen protein, POX ve pigment içeriklerindeki değişimler de farklı yetiştirme ortamlarında bitkilerde farklı fizyolojik işleyişlerin gerçekleşebildiğini göstermektedir.

Ayan ve arkadaşlarının (2006) *U. dioica* ile yürüttükleri çalışmada ısırganotu yaprakları bünyesindeki flavonoidler, klorofiller ve karotenoidler ile onların indirgenme ürünleri, vitaminler, proteinler, mineral maddeler, organik asitler, yağ ve diğer komponentler yönünden zengin içeriğinden dolayı besin değerinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Özellikle demir, vitamin ve klorofil içeriği yüksek olmasından dolayı kansızlığa karşı kullanımını tavsiye etmişlerdir.

Çanakçı ve Munzuroğlu'nun (2004) fasulye (*Phaseolus Vulgaris* L.) ile yürüttükleri çalışmalarda klorofil ve karotenoid miktarlarını tuzluluk stresi ve asetilsalisilik asit etkisi altında değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında stres altındaki bitkilerde, uygulanan tuz konsantrasyonu arttıkça pigment miktarlarının azaldığını belirtmişlerdir. Çalışmalarında

strese bağı olarak bu pigment grubunun da parçalandığını ve asetilsalisilik asit uygulamalarının bu sonucu etkilemediğini düşündüklerini belirtmişlerdir. Nitekim Munzuroğlu ve Baltepe (1993) tarafından yapılan bir çalışmada, çevre kirliliğinin yarattığı strese bağı olarak klorofilin yanı sıra karotenoid pigmentinin de yıkıma uğradığı rapor edildiğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da *in vivo* ortam şartları doğal ortama ve *in vitro* ortama göre daha stresli olduğu düşünüldüğünde pigment miktarının daha düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Hojnik ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada HPLC yöntemi ile *U. dioica* klorofil izolasyonu gerçekleştirmişler ve yüksek klorofil değerleri elde etmişlerdir. Bunun sonucunda *U. dioica* türünün doğal, düşük maliyetli yeşil pigment kaynağı olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Topaloğlu'nun 2010 yılında yürüttüğü yüksek lisans çalışmasında tuz stresinin chili biberlerinin pigment ve kapsaisinoid değişimi ile peroksidaz aktivitesi arasındaki ilişki incelenmiştir. Tuzluluk stresine karşı farklı biber varyeteleri farklı cevaplar oluştururken, stres koşulları altında bitkilerde POX seviyelerinin strese bağı olarak artış gösterdiği buna karşılık pigment seviyelerinde düşüş gözlemlendiği saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda da benzer bir biçimde *in vivo* ortamda klorofil seviyesi düşük ancak POX aktivitesi yüksek ölçülmüştür. Buradan *in vitro* ortamın, *in vivo* ve doğal ortama göre daha stresli bir ortam olduğu ve bitkinin buna paralel olarak fizyolojik cevaplar oluşturduğu düşünülebilir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Organik üretilmiş bitkiler ve droglara olan ilgi ve talep her geçen gün artmaktadır. Halen tıbbi ve aromatik bitki pazarlarında, organik gıdalara olan taleple eşleşen organik ürünlere bir yönelme olmaktadır (Adam, 2005; Hartman ve ark., 2006). Bu durum tıbbi ve aromatik bitkisel ürün kullanıcılarının mevcut temelinin organik gıdaları satın alanlarla aynı olduğunu ortaya koymaktadır (Hartman, 2007).

Ülkemizde şu anda kullanılan ve dış satımı yapılan tıbbi ve aromatik bitkiler ile gelecekte kullanma ve ihracat potansiyeli olan bitkilerden koruma-kullanma dengesi içinde yararlanılmalı, doğadan toplamalarda ‘sürdürülebilir kullanım’ ilkesine dikkat edilmelidir.

Toplama yapanlar doğayı tahrip etmeden nasıl toplama yapabilecekleri konusunda eğitilmelidir. Bu konularda araştırma, yayım ve eğitim çalışmaları yaygınlaştırılmalıdır. Bu anlamda Dünya ve Avrupa’da yapılan çalışmalar yakından takip edilmeli, EUROPAM (The European Herb Growers Association)’ın 1998 yılında tıbbi ve aromatik bitkilerin tarımı ile ilgili yayınladığı GAP (Good Agricultural Practices of Medicinal and Aromatic Plants) başlıklı tüzük ve daha sonra aynı şekilde tıbbi ve aromatik bitki toplama ilkelerini kapsayan GWP (Guidelines for Good Wild Crafting Practice of Medicinal and Aromatic Plants) başlıklı tüzük maddeleri incelenip, Türkçe ’ye çevrilerek, tıbbi ve aromatik bitkilerle ilgili tüm kurum, kuruluş ve kişiler bu konuda bilgilendirilmelidir. Aynı şekilde 2003 yılında son olarak WHO (Dünya Sağlık Örgütü)’nün ‘WHO Guidelines on good agricultural and collection practices’ (GACP) adıyla yayınladığı tüzük de incelenmeli ve değerlendirilmelidir (Keseroğlu ve ark., 2001).

Tüm bu bilgiler ışığında tıbbi ve aromatik bitkilerin doğal ortamda korunabilirliğini arttırmaya yardımcı olmak amacı ile bu bitkilerin organik üretimi üzerine de yoğunlaşılması gerekmektedir. Yetiştirme ortamındaki makro ve mikro elementlerin oranı, nem, toprak özellikleri, ışık ve sıcaklık gibi faktörler her bitkiye uygun olarak belirlenmeli ve organik üretimde maksimum verim alımı sağlanmalıdır. Böylece doğal olarak yetişen bitkilerin bilinçsiz ve aşırı toplanması engellenerek doğal türlerin sürdürülebilirliği sağlanabilecektir.

Ayrıca bitkilerin drog olarak kullanımını sağlayan metabolik bileşiklerinin verimini artırmak ve endüstriyel alanda kullanımını sağlayan özellikleri geliştirmek amacı ile doku kültürü çalışmalarına da daha fazla önem verilmesi gereken çalışmalardandır. Örneğin

ısırgan otunda bu yöntemler ile lif verimi artırılabilir, farmakolojik bileşenlerinin daha yüksek miktarlarda sentezi teşvik edilebilir.

Bu doğrultuda *U. dioica* bitkisinin *in vitro* koşullarda yetiştiriciliğinin uygun olduğu yapılan çalışmamızda gösterilmiştir. *In vivo* yetiştiriciliğe oranla birçok metabolitin daha yüksek olduğu, biyoteknolojik çalışmalarla da bu miktarın daha da artırılabilineceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adam K.I., 2005. Herb Production in Organic Systems. *A Publication of ATTRA-National Sustainable Agricultural Information Service.*
- Akbay P., Başaran A., Ündeğer Ü. ve Başaran N., 2003. In vitro Immunomodulatory Activity of Flavonoid Glycosides from *Urtica dioica* L.. *Phytother. Res.* 17, 34–37.
- Akı C., 1997. *Capsicum annuum*'un Çeşitli Varyeteleri Üzerinde Doku Kültürü Çalışmaları (Doktora Tezi), Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye.
- Akı C. 2005. Effect of Plant Growth Regulators on Osmotically Stressed Callus Cultures of Some *Capsicum annuum* var. *grossum* L. Cultivars. *Journal of Biological Science.* 5(3):257-259.
- Akkuş İ., 1995. Serbest Radikaller Ve Fizyolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
- Ankaferd BloodStopper Arastırma Etkinlikleri Raporu, 2008. Bölüm 2.Ankaferd İla Kozmetik Üretim Pazarlama A.Ş., Kağıthane, İstanbul, Türkiye.
- Anonim a., 2013. <http://dosyalar.hurriyet.com.tr/zehir/organik.asp> (14.06.2013).
- Anonim b., 2013. <http://www.food-info.net/tr/colour/chlorophyll.htm> (14.06.2013).
- Anonim c., 2013. http://www.gidamo.org.tr/resimler/ekler/7b16ecf8ca53723_ek.pdf (14.06.2013).
- Anonim d., 2013. http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/09e9d4bcc8157c0_ek.pdf
- Antonopoulous S., Demopoulous CA., Antdrikopoulous NK., 1996. Lipit Separation From *Urtica dioica*: Existence of Platelet-Activating Factor. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 3052-56.
- Arnon D.L., (1949). A Copper Enzyme is Isolated Chloroplast Polyphenol Oxidase in Beta Vulgaris. *Plant Physiol.* 24: 1-15.
- Aruoma O.I., 1998. Free Radicals, Oxidative Stress, And Antioxidants in Human Health and Disease. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75, 199–212
- Ayan K.A., Çalışkan Ö. ve Çıkrak C. 2006. Isırgan otu (*Urtica* spp.)'nun Ekonomik Önemi ve Tarımı. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*,21(3): 357-363.
- Barlow C.Y. ve Neal D., 2011. Fibre From Stinging Nettles, Poster sunumu. <http://www.ifm.eng.cam.ac.uk/service/news/documents/Fibrefromstingingnettles.pdf>,
- Barlow RB.ve Dixon R., 1973. Choline Acetyltransferase in the Nettle *Urtica dioica* Leaves. *Phytochemistry*, 17: 1875-77.

- Bayram E., Kırıcı S., Tansı S., Yılmaz G., Arabacı O., Kızıl S. ve Telci İ., Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretimini Artırılması Olanakları
http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/09e9d4bcc8157c0_ek.pdf (14.06.2013)
- Baytop T., 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul.
- Bodros E., Baley, C., 2008. Study of the Tensile Properties of Stinging Nettle Fibres (*Urtica dioica*), *Materials Letters*, 62, 2143-2145
- Bown D., 1995. Encyclopaedia of Herbs and their Uses, *Dorling Kindersley*, London.
- Bozdoğanlı E.E., 1996. Çukurova Bölgesinde Doğal Olarak Bulunan Faydalı Bitkiler ve Kültür Olanakları Üzerinde Araştırmalar (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Bradford M.M., 1976 A Dye Binding Assay for Protein. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Budzianowski J., 1991. Caffeic Acid Esters From *Urtica dioica* and *Urtica urens*. *Planta Med*, 57:507
- Britton G., 1995. Structure and Properties of Carotenoids in Relation to Function, *The FASEB Journal*, (9), 1551-1558.
- Bucar F., Britzmann B., Streit B. ve Weigend M., 2006. LC-PDA-MS-profiles of Phenolic Compounds in Extracts of Aerial Parts of *Urtica* Species. *Planta Med*, 72:152.
- Budzianowski J., 1991. Caffeic Acid Esters From *Urtica dioica* and *U. urens*. *Plant Med*.57;507.
- Chaurasia N. ve Wichtl M., 1987, Flavonolglykoside aus *Urtica dioica*. *Planta Med.*, 57:432-34.
- Christensen J.H., Bauw G., Welinder K.G., Montagu V.M., ve Boerjan W., 1998. Purification and Characterization of Peroxidases Correlated with Lignification in Poplar Xylem. *Plant Pysiol*, 118: 125-135
- Collier H. ve Chesher G.B., 1956. Identification of 5-Hydroxytryptamine in the Sting of Nettle (*Urtica dioica*). *Brit J Pharmacol*. 11: 186-89.
- Çanakçı S. ve Munzuroğlu Ö., 2004. Fasulye (*Phaseolus Vulgaris* L.) Çeliklerinde Ağırlık Değişimleri, Pigment ve Protein Miktarları Üzerine Asetilsalisilik Asit ve Tuz (NaCl) Uygulamasının Karşılıklı Etkileri. *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, Cilt 24, Sayı1: 23-40
- Çavdar C., Sifil A. ve Çamsarı T., 1997. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3-4 92.

- Çaylak E., 2011. Hayvan ve Bitkilerde Oksidatif Stres ile Antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9 (1): 73-83.
- Çördük N. ve Akı C., 2007. *Nicotiana tabacum* L. Samsun (tütün)'da In Vitro Rejenerasyon Sistemlerinin Geliştirilmesi (Yüksek Lisans Tezi), Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye.
- Çördük N. ve Akı C., 2010. Direct Shoot Organogenesis of *Digitalis trojana* Ivan. an Endemic Medicinal Herb of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 9(11); 1587-1591.
- Çördük N. ve Akı C., 2011. Inhibition of Browning Problem During Micropropagation of *Sideritis trojana* Bornm., an Endemic Medicinal Herb of Turkey. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(6); 6760-6765.
- Dalar A., 2008. Biber (*Capsicum annuum* L.) Bitkisi Çeşitlerinin Farklı Doku Kültürü Yöntemleri ile Mikroüretimi (Yüksek Lisans Tezi), Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, Türkiye.
- Davis PH., 1982. The Flora of Turkey and East Aegean Islands. Cilt 7 Edinburg: *Edinbur Universty Press*; 633-635
- Diver S., 1999. Biodynamic Farming and Compost Preparation. *Alternative Farmig Systems Guide*.
- Ekim T., Koyuncu M., Erik S. ve İlarıslan R., 1989. Türkiye'nin Tehlike Altındaki Nadir ve Endemik Bitkileri, *Türkiye Tabiatını Koruma Derneği Yayınları*.
- Emmelin N. ve Feldberg W., 1947. The mechanism of the Common Nettle (*Urtica urens*). *The Journal of Physiology*. 106: 440-55.
- Emmelin N. ve Feldberg W., 1949. Distrubution of Acetylcholine and Histamine in Nettle Plants. *New Phytologist*, 48: 143-48
- Erik S. ve Tarıkahya B., 2004. Türkiye Florası Üzerine, *Kebikeç İnsan Bilimleri için Kaynak Araştırmaları Dergisi*, Alp Matbaası, Ankara, 17, 139-163.
- Farnsworth N. R., Akerev O. ve Bingel A.S., 1985. The Bullettion of WHO., 63: 9865-9871.
- Farzami B., Ahmadvand D., Vardasbi S., Majin FJ. ve Khaghani SH., 2003. Induction of Insulin Secretion by a Component of *Urtica dioica* Leaves Extract in Perfused Islets of Langerhans and its *in Vivo* Effect in Normal an Streptozotocin Diabetic Rats. *J. Enthnopharmacol*, 89: 47-53

- Fiamegos YC., Nanos CG., Vervoort J. ve Stalikas C.D., 2004, Analytical Procedure For The in-Vial and Derivatization-Extraction of Phenolic Acides and Flavonoids in Methanolic and Aqueous Plant Extracts Filled by Gas Chromatography With Mass-Selective Dedection. *J Chromatog*, 1041: 11-18.
- Francis F. J., 1985. Pigments and Other Colorants, *Food Chemistry* 991p, (Ed. Fennema, O. R.), 2nd ed. Marcel and Decker Inc., New York and Basel, USA.
- Ganzer M., Daniela P., Sturm S., Clemens E. ve Stuppner H., 2005. *Urtica dioica* Agglutinin: Separation, Identification and Quantification of Individual Isolectin by Capillar Electrophoresis and Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry. *Electrophoresis*, 26: 1724-31.
- Gara L., Pinto M.C. ve Tommasi F., 2003. The Antioxidant Systems vis-a-vis Reactive Oxygen Species During Plant-Pathogen Interaction. *Plant Physiol. and Biochemistry*, 41: 863-870.
- Gezgin D., 2006. Bitki Mitosları. Sel Yayıncılık.
- Gordon Cook J., 1984. Handbook of Textile Fibres 1. Natural Fibres, *Merrow Publishing*, England, 5th Edition.
- Graham L. E., Graham J. M. ve Wilcow L. W., 2004. Bitki Biyolojisi, Çeviri Editörü: Kani Işık, Akdeniz Üniversitesi, *Palme Yayıncılık*.
- Guil-Guerrero J.L., Reboloso-Fuentes M.M. ve Torija Isasab M.E., 2003. Fatty acids and Carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.), *Journal of Food Composition and Analysis* 16; 111–119
- Gutteridge J.M.C., 1989. Iron and Oxygen: A biologically Damaging Mixture. *Acta Paediatrica Scandinavica Suppl*, 361, 78–85.
- Güder A., 2008. *Urtica dioica* L. ve *Malva neglecta* Wallr. Bitkilerinin ve Karışımlarının Antioksidant Aktivitesinin Belirlenmesi, (Yüksek Lisans Tezi) Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, Türkiye.
- Güner A., Özhatay N., Ekim T. ve Başer K.H.C., 2000. Flora of Turkey, Volume 11, *Edinburgh University Press*. Edinburgh.
- Hartman Group, Inc. 2006. 7 Trends to Watch in 2007. www.harmangroup.com/products/HB/2006_12_13.html.
- Hartman H., 2007. Consumer Culture and the Future of Organic Usage. The Hartman Group, Inc. www.hartmangroup.com/products/HB/2006_11_01.html.

- Haouari M. E., Jardin I., Mekhfi H., Rosado J. A. ve Salido G. M., 2007. *Urtica dioica* Extract Reduces Platelet Hyperaggregability in Type 2 Diabetes Mellitus by Inhibition of Oxidant Production, Ca²⁺ Mobilization and Protein Tyrosine Phosphorylation. *J. Appl. Biomed.*, 5: 105–113.
- Heim K., Tagliaferro A. ve Bobilya D., 2002. Flavonid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationship. *J. Nut. Biochem.* 13: 572-584.
- Heinrich M., Barnes J., Gibbons S. ve Williamson E.M., 2004. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Hojnik M., Skerget M. ve Knez Z., 2007. Isolation of Chlorophylls from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *Separation and Purification Technology*, 57: 37–46.
- Hollman P., Hertog M. ve Katan M., 1996. Analysis and Health Effects of Flavonoids. *Food Chem.* 57: 43-46.
- Hoşbap S., 2008. *Urtica dioica* L. Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar (Yüksek Lisans Tezi), Gazi Üniversitesi. Ankara, Türkiye.
- Huang G., 2005. Nettle (*Urtica cannabina* L.) Fibre, Properties and Spinning Practice, *Journal of the Textile Institute*, Vol.96, No.1 pp:11-15
- İlisulu K., 1992. İlaç Ve Baharat Bitkileri. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*: 1256, Ders Kitabı: 360, S:63-75.
- İşlek C., Koç E., ve Üstün A.S., 2010. Biber (*Capsicum annuum* L.) Tohumlarında Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin *in Vitro* Çimlenme Üzerine Etkisi. *BAÜ Fen Bil. Enst. Dergisi*, 12(2): 42-49.
- Ji TF., Liu CH., Wang JB., Su YL., Yuan L. ve Feng XZ., 2007, Studies on the Constituents of *Urtica dioica* L. Grown in the Tibet Autonomous Region. *Zhong Yao Cai.* 30:662-64.
- Kanner J. ve Kinsella J.E., 1983. Lipid Deterioration İnited by Phagocytic Cells in Muscle Foods: β-Carotene Destruction by a Myeloperoxidase-Hydrogen Peroxide-Halid System. *J. Agric. Food Chem.* 31: 370-376.
- Karabay N., Türküsay H., ve Cüneyt A., 2003. Domatesin Bakteriyel Hastalıklarının Kontrolünde Bitki Aktivatörleri ve Bakterisidlerin Etkileri. *Anadolu, J. Of Aari*, 13(2): 88-102.
- Karakurt H. ve Aslantaş R., 2008. Bitki Renk Maddelerinin (Pigmentler) Oluşum ve Değişim Fizyolojisi, *Alatarım*, 7 (2): 34-41.

- Kavalalı G.,2003. Therapeutic and Nutritional Aspects of Stinging Nettle (*Urtica*). *Taylor and Francis*, London-NewYork
- Kavalalı G.,2011. Materia Medica'dan Günümüze Uzanan Tıbbi Bitki: Isırgan. *Lokman Hekim Journal*,1 (2): 35-37.
- Kerby K. ve Somerville C., 1992. Purification of an İnfection-Related, Extracellular Peroxidase from Barley. *Plant Physiol.* 100(1): 397-402.
- Kendir G. ve Güvenç, A., 2010. Etnobotanik ve Türkiye'de Yapılmış Etnobotanik Çalışmalara Genel Bir Bakış. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. Cilt 30 / Sayı 1: 49-80
- Keseroğlu T., Sarı A.O., Kaya G. ve Oğuz B., 2001. Tıbbi ve Kokulu Bitkiler Anason, Kimyon, Kekik, Kapari- DPT Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı Bitkisel Üretim Özel İktisat Komisyonu Sanayi Bitkileri Alt Komisyonu Raporu. DPT: 2648-ÖİK: 656, s. 390-424, Ankara.
- Koca N. ve Karadeniz F., Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. *Gıda Mühendisleri Dergisi*, 32-37.
- Koç E. ve Üstün A. S., 2008. Patojenlere Karşı Bitkilerde Savunma ve Antioksidanlar. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 24 (1-2) 82 - 100
- Koçyiğit M., 2005. Yalova İlinde Etnobotanik Bir Arastırma, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Kopsell D.A. ve Kopsell D.E., 2006. Accumulation and Bioavailability of Dietary Carotenoids in Vegetable Crops. *Trends Plant Sci.*, 11; 499-507.
- Kraus R. ve Spiteller G., 1990. Phenolic Compounds From Roots of *Urtica dioica*. *Phytochemistry*, 29: 1653-59.
- Kurban M., Yavaş A. ve Avinç O., 2011, Isırgan Otu Lifi ve Özellikleri, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi* Cilt: 5, No: 1,84-106
- Kukrić Z.Z., Topalić-Trivunović L.N., Kukavica B.M., Matoš S.B., Pavičić S.S., Boroja M.M. ve Savić A.V., 2012. Characterization Of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Nettle Leaves (*Urtica dioica* L.). *Acta Periodica Technologica*, 43, 1-342.
- Lambeth J.D., 2004. Nox Enzymes and the Biology of Reactive Oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4 (3), 181–189.

- Lopatkin N., Sivkov A., Walther C., Schl fke S., Medvedev A., Avdeichuk J., Golubev G., Melnik K., Elenberger N. ve Engelmann U., 2005. Long-Term Efficacy and Safety of a Combination of Sabal and *Urtica* Extract For Lower Urinary Tract Symptoms--a Placebo-Controlled, Double-Blind, Multicenter Trial. *World J Urol.* 23(2):139-46.
- Maleopsa U. ve Urbanek U., 1994. Changes in Peroxidase Activity in Bean Suspension Cultures After Botrytis Cinerea Elicitor Treatment. *J. of Phytopath.* 141; 314-322.
- Manganelli R. E. U., Zaccaro L. ve Tomei P. E., 2005. Antiviral Activity in Vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L.. *Journal of Ethnopharmacology* 98; 323-327.
- Maranon R. M.J., Mercier D., Van Huystee R.B., ve Stillman M.J., 1994. Analysis of the Optical Absorbtion and Magnetic-Circular-Dichroism Spectra of Peanut Peroxidase: Electronic Structure of a Peroxidase with Biochemical Properties Similar to Those of Horseradish Peroxidase. *Biochem. J.*, 301: 335-341.
- Mekhfi H., Haouari M. E., Legssyer A., Bnouhama, M., Aziz, M., Atmani, F., Remmal, A., Ziyat, A.,2004. Platelet Anti-Aggregant Property of Some Moroccan Medicinal Plants. *Journal of Ethnopharmacology* 94 ;317-322.
- Mors nbul T., Solmaz S.,  st n G., ve Yonar T., 2010. Bitki Gelişim Düzenleyici (BGD)'lerin  evresel Etkileri ve üzüm  nerileri. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, Cilt:15 Sayı:1.
- Munzuroğlu  . and Baltepe Ő., 1993. Trafik Araçlarından Kaynaklanan Hava Kirlenmesinin buğday (*Triticum aestivum* L.) Bitkisi  zerindeki Etkilerinin Araştırılması. *F. Ü. Fen ve Müh. Bilim Dergisi.* 5, 2, 93.
- Ospankulova E., 2005. Türkiye Etnobotanik Araştırmalar Veri Tabanı (Yüksek Lisans Tezi), İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
-  den S., Demirci M. ve Zorba T., 2004. Tütün'de Görülen Yabancı Orabaņ Hastalığına Karşı Bazı Organik Uygulamalar. *Ekoloji*, 13: 20-25.
-  zen T. ve Korkmaz H., 2003. Modulatory Effect of *Urtica dioica* L. (*Urticaceae*) Leaf Extract on Biotransformation Enzyme Systems, Antioxidant Enzymes, Lactate Dehydrogenase and Lipid Peroxidation in Mice. *Phytomedicine*, 10: 405-415.
-  zkan A., Yumrutaş  ., Saygıdeğer S. D. ve Kulak M., 2011. Evaluation of Antioxidant Activities and Phenolic Contents of Some Edible and Medicinal Plants from Turkey's Flora. *Advances in Environmental Biology*, 5(2): 231-236.

- Peuman PJ. ve De LEY., Broekaert, WF., 1983. An Unusal Lectin From Stinging Nettle (*Urtica dioica*) Rhizomes. *Febs*, 177: 99-103.
- Polat R. ve Satıl F. 2012. An Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants in Edremit Gulf (Balıkesir – Turkey), *Journal of Ethnopharmacology* 139: 626– 641.
- Pomar F., Bernal M., Diaz J., ve Merino F., 1997. Purification, Characterization and Kinetic Properties of Pepper Fruit Acidic Peroxidase. *Phytochemistry*, 46(8): 1313-1317.
- Protetos C., Boziaris IS., Nychasg JE. ve Komatis M., 2006, Analysis of Flavonoids and Phenolic Acids in Greek Aromatic Plants: Investigation of Their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. *Food Chem.* 95: 664-71.
- Rafajlavska V., Djarmati Z., Najdenova V. ve Cvetkov L.J., 2002. Extraction of Stinging Nettle (*Urtica dioica*) With Supercritical Carbondioxide. *Balıkesir Ünv. Fen Bil. Ens. Dergisi*, 4:13-17.
- Ratkin A.V., Evdokimova L.I. ve Zhanaeva T.A., 2003. Study on Degradation of Flavonols in Mutants of Poppy *Papaver somniferum* L. *Biology Bulletin*, Vol. 30, No. 5, pp. 458-463.
- Raupp J. ve Konig U.J., 1996. Biodynamic Preparations Cause Opposite Yield Effects Depending Upon Yield Levels. *Biological Agriculture and Horticulture*, 13: 175-188.
- Roslon W. ve Weglarz Z., 2003, Polyphenolic Acids of Female and Male Forms of *Urtica dioica* L. *International Conference on Medicinal And Aromatic Plants*.
- Sarı A. O. ve Oğuz B., Bilgiç A., Tort N., Güvensel A., Şenol S. G., 2010. Ege ve Güney Marmara Bölgelerinde Halk İlacı Olarak Kullanılan Bitkiler. *ANADOLU, J. of AARI* 20 (2): 1 – 21
- Schnöttner M., Gansser D. ve Siteller G., 1997. Lignans From The Roots of *Urtica dioica* and Their Metabolites Bind to Human Sex Hormone Binding Globulin (SHBG). *Plant Med.* 63: 529-32.
- Simpson K.L., 1985. Chemical Changes in Natural Food Pigments. In: Chemical Changes in Food During Processing. Richardson, T. and Finley, J.W. (eds), pp. 409-443. New York.
- Smith R., 2000. Plant Tissue Culture. Texas Agricultural Experiment Station, Texas A&M University, College Station, U.S.A., 2: 231.

- Sovova H., Sajfirtova M., Bartlova M. ve Opletal L., 2004. Near-critical Extraction of Pigments and Oleoresin from Stinging Nettle Leaves. *J. of Supercritical Fluids*. 30: 213-24.
- Szentmihalyi K., Kery A., Then M., Lakatos B., Sandor Z. ve Vinkler P., 1998. Potassium-Sodium Ratio for the Characterization of Medicinal Plant Extracts with Diuretic Activity. *Phytother Res*. 12: 163-66.
- Şimşek I., Aytekin F., Yesilada E. ve Yıldırım S., 2002. Anadolu'da Halk Arasında Bitkilerin Kullanılış Amaçları Üzerinde Etnobotanik Bir Çalışma. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29-31 Mayıs, Eskişehir.
- Tee E.S., 1992. Carotenoids and Retinoids in Human Nutrition, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 31 (1/2) 103-163.
- Tekman Ş. ve Öner N., 1981. Genel Biokimya. İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. No:30 İSTANBUL.
- Topaloğlu K., 2010. Tuz Stresinin Chili Biberlerinin Pigment Ve Kapsaisinoid Değişimi İle Peroksidaz Aktivitesi Arasındaki İlişki, (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi, Adana, Türkiye.
- Trigiano R.N. ve Gray D.J., 1996. Plant Tissue Culture Concept and Laboratory Exercises. *CRS Press.*, Boca Raton, Florida.
- Tuzlacı E., İşbilen D. F. A. ve Bulut G., 2010. Turkish Folk Medicinal Plants, VIII: Lalapaşa (Edirne), *Marmara Pharmaceutical Journal* 14: 47-52
- Tuzlacı E. ve Aymaz P.E., 2001. Turkish Folk Medicinal Plants, Part IV: Gönen (Balıkesir), *Fitoterapia* 72: 323-343.
- Tuzlacı E. ve Erol M. K., 1999. Turkish Folk Medicinal Plants, Part 2: Eğirdir (Isparta), *Fitoterapia* 70: 593-610.
- Tuzlacı E. ve Tolon E., 2000. Turkish Folk Medicinal Plants, Part III: Sile (İstanbul), *Fitoterapia* 71: 673-685
- Tübitak Türkiye Taksonomik Tür Veritabanı 2004-2005
<http://www.belgeler.com/blg/115p/turkiye-de-tibbi-amacli-kullanilan-bazi-bitkilerin-antioksidan-etkilerinin-taranmasi-screening-of-some-turkish-medicinal-plants-for-antioxidant-activity> (14.06.2013).
- Türküsay H., ve Tosun N., 2005. Hidrojen Peroksit Uygulamalarının Domates Bakteriyel Solgunluk ve Kanser Hastalığı (*Clavibacter michiganensis ssp. Michiganensis* (Smith) Davis et al) 'na Etkileri. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 42(2): 45-56.

- Tütenocaklı T., 2002. Ayvacık (B1, Çanakkale) ve Çevresinin Etnobotaniği (Yüksek Lisans Tezi), Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye.
- Van Damme JM., Broekeart WF. ve Peumans WJ., 1998. The *Urtica dioica* Agglutinin is a Complex Mixture of Isolectins. *Plant Physiol*, 86: 598-601.
- Vardar M. ve Ünal F., 2009. Tralkoksidim ve Proklorazın Arpa (*Hordeum vulgare* L. cv Efes) Köklerinde Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkileri. *Marmara üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21: 29-35.
- Vogl C.R. ve Hartl A., 2003. Production and Processing of Originally Grown Fiber Nettle (*Urtica dioica* L.) and its Potential Use in the Natural Textile Industry: A review, *American Journal of Alternative Agriculture*, Volume 18, Number 3
- Waetherbee E.E. ve Bruce J.G., 1979. Edible Wild Plants of the Great Lakes Region. Published by the authors, *Ann Arbor*. 69 p.
- Yücel E. ve Tülüklüoğlu A., 2000. Gediz (Kütahya) Çevresinde Halk İlacı Olarak Kullanılan Bitkiler. *Ekoloji Çevre Dergisi*, 9(36); 12-14.

Çizelgeler	Sayfa No
Çizelge 1. Türkiye’de Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Organik Üretimi (Ton)	2
Çizelge 2. Dünya genelinde yayılış gösteren bazı <i>Urtica</i> türleri ve yayılış alanları.....	10
Çizelge 3. <i>U. dioica</i> bitkisinin tıbbi kullanım alanları.....	24
Çizelge 4. Besi ortamına ilave edilen makro elementler	34
Çizelge 5. Besi ortamına ilave edilen mikro elementler	35
Çizelge 6. Bitki büyüme düzenleyicileri ve genel etkileri.....	36
Çizelge 7. Protein standart verileri	42
Çizelge 8. Yetiştirme ortamlarına göre <i>Urtica dioica L.</i> türünde total protein değişimi	49
Çizelge 9. Yetiştirme ortamlarına göre <i>Urtica dioica L.</i> türünde peroksidaz (POX) değişimi	49
Çizelge 10. <i>Urtica dioica L.</i> türünde klorofil ve karotenoid miktarları	50

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1. Klorofil a ve klorofil b.....	3
Şekil 2. Serbest oksijen radikallerinin proteinlere etkisi	6
Şekil 3. Süperoksit dismutaz (SOD) ve peroksidaz (POX) faailyeti	7
Şekil 4. Isırgan otundan lif eldesinin aşamaları	15
Şekil 5. <i>In vivo</i> ortamda yetiştirilen 10 Haftalık <i>U. dioica</i> fideleri.	38
Şekil 6. <i>In vivo</i> ortamda yetiştirilen 10 haftalık <i>U. dioica</i> bitkisi	39
Şekil 7. Doğal ortamdan toplanan <i>U. dioica</i> bitkileri a) doğal ortamında b) laboratuvarında.	40
Şekil 8. Protein standart grafiği.	41
Şekil 9. Viyollere ekimi yapılmış <i>U. dioica</i> tohumları.....	44
Şekil 10. Bir haftalık <i>U. dioica</i> fideleri.	45
Şekil 11. 10 haftalık <i>U. dioica</i> fideleri.....	45
Şekil 12. Besi ortamına ekimi gerçekleştirilmiş <i>U. dioica</i> tohumları a) MS0 b) 1:1 BAP:NAA c) 1:2 BAP:NAA	46
Şekil 13. <i>In vitro</i> koşullarda çimlenmiş <i>U. dioica</i> tohumları a)MS0 b) 1:1 BAP:NAA c) 1:2 BAP:NAA.....	47
Şekil 14. Kültür kaplarına aktarılan <i>U. dioica</i> fideleri.	48
Şekil 15. 10 haftalık <i>iv vitro</i> ortamda yetişen <i>U. dioica</i> fideleri.....	48
Şekil 16. <i>Urtica dioica</i> L. türünde total protein değişimi.	49
Şekil 17. <i>Urtica dioica</i> L. Türünde peroksidaz (POX) Değişimi.....	50

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER:

Adı Soyadı: Sibel GÜMÜŞ

Uyruğu: T.C.

Doğum yeri: ÇANAKKALE

Doğum tarihi: 02.09.1985

EĞİTİM DURUMU:

Yüksek Lisans: 2011-2013 Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı

Yükseköğretim: 2003-2009 Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi

Biyoloji Eğitimi Ana Bilim Dalı (Alm)

Ortaöğretim: 1996-2003 Çanakkale Milli Piyango Anadolu Lisesi (Alm.)

İlköğretim: 1991-1996 Geyikli İlköğretim Okulu (Çanakkale)

BİLİMSEL FAALİYETLERİ:

Bozyel, M. E., Çakmak, D., Güzey, D., Deniz, İ., Gümüş, S., Gönüz, A., Demir, N. 2013.

Çanakkale il Merkezinde Taşıt Egzoz Kirliliğinin Kızılçam (*Pinus brutia*, *Pinaceae*)
Yaprağı Anatomik Yapısı Üzerine Bazı Etkileri, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 3-7
Eylül 2012, Ege Üniversitesi, İzmir, s. 440-441.

Güzey, D., Çakmak, D., Deniz, İ., Gümüş, S., Bozyel, M. E., Demir, N., Gönüz, A., 2013.

Çanakkale İli Yol Kenarı Topraklarının Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi, *21.
Ulusal Biyoloji Kongresi*, 3-7 Eylül 2012, Ege Üniversitesi, İzmir, s. 1343-1344.

İŞ DENEYİMİ:

2011- Biga Uğur Dershane (Çanakkale) - Biyoloji Öğretmenliği

2009-2011 Açı Dershane Merkez Şube (Ankara) - Biyoloji Öğretmenliği

2007-2009 Açı Dershane Merkez Şube (Ankara) – Stajyer Biyoloji Öğretmenliği

2008-2009 Çankaya Anadolu Lisesi (Ankara) – Stajyer Öğretmenlik

İLETİŞİM:

Adres: Cevatpaşa mah. Yüzbaşı Kemal sok.

Deniz apt. No:10/2 ÇANAKKALE

Gsm: 0 505 784 37 97

e-mail: sibelgmsgms@gmail.com