

Gamze Akdeniz

***Urtica dioica* (Isırgan Otu) BİTKİSİNİN TÜRKİYE'DEKİ
ETNOBOTANİK ÖNEMİNE DAİR, BÖLGESEL ANTIOKSİDAN
KAPASİTESİ, TOPLAM FENOLİK İÇERİĞİ VE MOLEKÜLER
DÜZEYDEKİ FARKLILIKLARININ TESPİTİ**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

Gamze AKDENİZ

Aralık - 2010

Aralık 2010

***Urtica dioica* (Isırgan Otu) BİTKİSİNİN TÜRKİYE'DEKİ
ETNOBOTANİK ÖNEMİNE DAİR, BÖLGESEL ANTIOKSİDAN
KAPASİTESİ, TOPLAM FENOLİK İÇERİĞİ VE MOLEKÜLER
DÜZEYDEKİ FARKLILIKLARININ TESPİTİ**

Gamze AKDENİZ

Biyoloji Anabilim Dalı

Aralık 2010
İstanbul, Türkiye

ONAYLAMA SAYFASI

Bu tezin şekil ve içerik açısından Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tez Yazım Kılavuzunda belirtilen kurallara uygun formatta yazıldığını onaylıyorum.

Yrd. Doç. Dr. Sevim IŞIK
Anabilim Dalı Başkanı

Biyoloji Anabilim Dalı 50230818 numaralı öğrencisi Gamze AKDENİZ tarafından hazırlanan bu tezin Yüksek Lisans Tezinde bulunması gereken yeterliliğe, kapsama ve niteliğe sahip olduğunu onaylıyorum.

Yrd. Doç. Dr. İ. İrem UZONUR
Tez Danışmanı

Tez Sınavı Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Mustafa PETEK

Yrd. Doç. Dr. İ. İrem UZONUR

Yrd. Doç. Dr. Sevim IŞIK

Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tez Yazım Kılavuzunda belirtilen kurallara uygun formatta yazıldığını onaylıyorum.

Doç. Dr. Nurullah ARSLAN
Müdür

Aralık 2010

***Urtica dioica* (Isırgan otu) BİTKİSİNİN TÜRKİYE'DEKİ
ETNOBOTANİK ÖNEMİNE DAİR, BÖLGESEL ANTIOKSİDAN
KAPASİTESİ, TOPLAM FENOLİK İÇERİĞİ VE MOLEKÜLER
DÜZEYDEKİ FARKLILIKLARININ TESPİTİ**

Gamze AKDENİZ

Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Aralık 2010

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. İ.İrem UZONUR

ÖZET

Urtica dioica (ısırgan otu), Urticaceae familyasında bulunan bir bitkidir. Urticaceae familyası tropik ve subtropik bölgelerde yetişen bitki grubudur. Dünya üzerinde çok geniş yayılış alanına sahip olan bu familyanın ülkemizde 5 türü bulunmaktadır. Bunlardan biri olan *U. dioica* içeriğindeki çok yönlü kimyasal zenginliklerden dolayı tüm bitki kısımları geçmişten günümüze halk hekimliği, gıda, boya, lif, gübre üretimi ve kozmetik sanayisinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. En belirgin morfolojik özelliği yakıcı tüyleridir ve bu sayede halk arasında kolayca tanınmaktadır.

Etnobotanik açıdan çok büyük bir öneme sahip olan *U. dioica*'nın, toplam fenolik içerik ve toplam antioksidan kapasite tayini metanol ve su çözücülerıyla incelenip en faydalı biçimde kullanımının sağlanması amaçlanmıştır.

Türkiye'nin farklı şehirlerinden ve farklı dönemlerde toplanan ısırgan otu örneklerinin online veritabanları kullanılarak *U. dioica*'ya özgü primer seti dizayn

edilmiş ve moleküler tür tayini yapılmıştır. Bölgesel ve şehrsel farklılıkları incelemek amacıyla RAPD-PCR yöntemi kullanılmış ve uygun primerler belirlenerek örneklerin DNA seviyesinde benzerlik ve farklılıkları, hem tür içi hem birey içi düzeyde incelenmiştir.

Sonuç olarak, toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde miktarlarının şehirlere göre değişim gösterdiği, sanayi bölgesi ve kirlilik oranı yüksek şehirlerde bu tür yararlı bileşiklerin miktarlarında azalma olduğu görülmüştür. Bunun yanında morfolojik olarak aynı olan *U. dioica* bitkisi ile yapılan RAPD-PCR sonuçlarına göre farklı sonuçların olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Isırgan otu, toplam antioksidan kapasite, toplam fenolik madde miktarı, RAPD-PCR.

DETERMINATION OF *Urtica dioica* (NETTLE)'S REGIONAL ANTIOXIDANT CAPACITY, TOTAL PHENOLIC COMPOUND AND ITS DIFFERENCES AT MOLECULAR LEVEL TO UNDERSTAND ETHNOBOTANIC IMPORTANCE IN TURKEY.

Gamze AKDENİZ

M. S. Thesis - Biology
December 2010

Supervisor: Assist. Prof. I. Irem UZONUR

ABSTRACT

Urtica dioica is a kind of plant which is a member of Urticaceae family. Urticaceae family groups in tropic and subtropic regions. There are 5 species in our country, whereas it spreads of a wide area around the world. *U. dioica* is a one of these species, which includes high diversity of chemicals. Because of that diversity, all parts of the plants are used in medical treatment, nutrient, dye, fiber, dropping production and cosmetic industry from past to today. Searing feather are the most common morphological characteristic that's why, it's easily recognized by the people.

The objective of this thesis is to determine total phenolic compounds and total antioxidant capacity to observe with the methanol and water solvents and to use it with the maximum efficiency.

It's *U.dioica* collected from different cities in different times. Online databases were used for designing spesific set of primers determinate molecular species. To

observe the differences between regions and between cities RAPD-PCR methods was used. Differences and similarities of DNA were observed among the species and among the same plant by using specific primers.

As a result, it's proved that there are changes of total phenolic compounds and total antioxidant capacity among the cities. And also, the amount of beneficial compounds decreases in industrial region and highly polluted cities. At the same time it's proved that morphological similar *U. dioica* plant has different RAPD-PCR results.

Keywords: Nettle, total antioxidant capacity, total phenolic compounds, RAPD-PCR.

İTHAF

Değerli aileme ve değer verdiklerime...

TEŞEKKÜR

Çalışmamda tecrübesi ile bilgi birikimini benden esirgemeyen kıymetli hocam ve danışmanım Yrd. Doç. Dr. İ.İrem Uzonur'a ve kimya deneylerinin yapımında ve sonrasında yanımda olan Şeyda KARAMAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında ve eğitimim sırasındaki tüm katkılarından dolayı Anabilim Dalı Başkanımız Yrd. Doç. Dr. Sevim IŞIK'a, bölümümüzün değerli hocaları Prof. Dr. Fahrettin GÜCİN, Prof. Dr. Fatih ÖZKARAGÖZ, Doç. Dr. Barik SALİH, Yrd. Doç. Dr. Lokman ALPSOY, Yrd. Doç. Dr. Mehmet Serdal SAKÇALI, araştırma görevlileri Cemile Ümran CEYLAN, Bora BÖLEK, Hüseyin TOMBULOĞLU, Güzin KEKEÇ, Esmâ Banu ÖZSOY'a ve tüm biyoloji personeline teşekkürü bir borç bilirim.

Lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren başta Prof. Dr. Güven GÖRK, Yrd. Doç. Dr. Aysel UĞUR ve Yrd. Doç. Dr. Gülten ÖKMEN olmak üzere tüm Muğla Üniversitesi Biyoloji bölümü öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Ayrıca yüksek lisans süresince sabır ve anlayışlarını her zaman hissettiğim aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu çalışma, Fatih Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından P50031006_2 proje numarası ile desteklenmiştir. Katkılarından dolayı Fatih Üniversitesi yönetimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
İTHAF.....	viii
TEŞEKKÜR SAYFASI	ix
İÇİNDEKİLER TABLOSU	x
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
KISALTMALAR.....	xvii
BÖLÜM 1 GİRİŞ	1
1.1 Amaç ve Kapsam	1
1.2 Etnobotanik ve Isırgan Otu	2
1.3 Biyoçeşitlilik.....	4
1.3.1 Genetik Kaynakların Temel Korunma Yöntemleri.....	6
1.4 Türkiye'nin Bitki Çeşitliliği ve Nedenleri.....	7
1.5 Urticaceae.....	10
1.5.1 <i>Urtica</i> L. (Isırgan otu)	11
1.5.1.1 <i>Urtica dioica</i>	12
1.5.1.2 Isırgan Otunun Etkileri ve Kullanım Alanları.....	17
1.5.1.3 Isırgan Otu Tarımı.....	18
a. Toprak İstekleri.....	18
b. Üretim Şekli	19
1.6 Antioksidanlar ve Isırgan Otu Antioksidanları	20
1.7 Fenolik Bileşikler ve Isırgan Otu Fenolik Bileşikleri.....	21
1.7.1 Flavonoidler	21
1.7.2 Fenolik Asitler.....	22
1.7.3 Fenolik Polimerler (Tanenler).....	22
1.8 Elektron Aktarımına Dayalı Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri.....	22

1.8.1	Cuprac (Cupric Reducing Antioxidant Capacity; Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi.....	22
1.8.2	TEAC (Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) / ABTS Yöntemi.....	24
1.9	Toplam Fenolik Madde Tayini Yöntemi.....	25
1.9.1	Folin-Ciocalteu Yöntemi	25
1.10	Bitkilerde Kullanılan Genetik Belirteçler.....	25
1.10.1	Morfolojik Belirteçler.....	25
1.10.2	Moleküler Belirteçler.....	26
1.10.2.1.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Uygulamaları.....	27
1.10.2.2	RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA- Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) ve Uygulama Alanları.....	28

BÖLÜM 2 MATERYAL ve METOD 31

2.1.	MATERYAL.....	31
2.1.1.	Bitki Örnekleri.....	31
2.1.2.	Cihazlar.....	32
2.1.3	Kullanılan Kimyasallar	32
2.1.3.1	Bitki Su İnfüzyonları ve Metanol Ekstraktların Hazırlanması.....	32
2.1.3.2	Kimyasal Analiz Çözeltilerinin Hazırlanması	32
2.1.3.3	DNA İzolasyon Kimyasalları.....	33
2.1.3.4	Florometre Kimyasalları	33
2.1.3.5	Polimeraz Zincir Reaksiyonlarında Kullanılan Kimyasallar.....	33
2.1.3.6	Agaroz Jel Elektforezi Kimyasalları	35
2.2	METOD.....	36
2.2.1.	Bitki Örneklerinin Toplanması	36
2.2.2.	Isırgan Otu Örneklerinin Su İnfüzyonu ve Metanol Ekstraksiyonu.....	37
2.2.3.	CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity; Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi	37
2.2.4.	TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) / ABTS Yöntemi	38
2.2.5.	Folin-Ciocalteu Yöntemi	39

2.2.6. <i>Urtica dioica</i> 'ya Özgü Primer Dizaynı ve Moleküler Tayinin Yapılması.....	39
2.2.7. DNA İzolasyonu	44
2.2.8. DNA Konsantrasyonu Ölçümü.....	45
2.2.9. Agaroz Jel Hazırlanması ve Jel Elektroforezi.....	47
2.2.10. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD- PCR)	48
BÖLÜM 3 BULGULAR VE TARTIŞMA.....	49
3.1. Türe Özgü Primer Dizaynı ve İlgili PCR Sonuçları.....	49
3.2. Toplam Antioksidan Kapasite ve Toplam Fenolik Madde İçerik Sonuçları.....	52
3.2.1. Isırgan Otu Yaprak Örneklerinin Sonuçları.....	52
3.2.2. Isırgan Otu Gövde Örneklerinin Sonuçları	56
3.2.3. Isırgan Otu Kök Örneklerinin Sonuçlar.....	57
3.3. Örneklerin DNA İzolasyon Konsantrasyonları.....	59
3.4. RAPD-PCR Sonuçları.....	61
TARTIŞMA	71
SONUÇ ve ÖNERİLER.....	78
REFERANSLAR.....	80

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1 : Dünya’da ısırgan otunun etnobotanik kullanımı.....	3
Tablo 1.2 : <i>Urtica dioica</i> taksonomik sınıflandırılması.....	13
Tablo 1.3 : Isırgan otunun yapısında bulunan maddeler.....	16
Tablo 1.4 : Isırgan otunun kullanım alanları.....	19
Tablo 2.1 : Dizayn edilen <i>Urtica dioica</i> primeri.....	34
Tablo 2.2 : Oligonükleotid primerler.....	34
Tablo 2.3 : Çalışmada kullanılan ısırgan otu örneklerinin kısaltma, toplandıkları iller, toplanan bitki kısımları ve hangi mevsimde toplandıklarının bilgileri.....	36
Tablo 2.4 : FINNZYMES Phire®Doğrudan-PCR bileşenlerine ait bilgiler.....	43
Tablo 2.5 : FINNZYMES Phire® Doğrudan-PCR şartlarına ait bilgiler.....	44
Tablo 2.6 : Bir RAPD-PCR tüpündeki bileşenler.....	48
Tablo 2.7 : RAPD-PCR koşulları.....	49
Tablo 3.1 : <i>Urtica dioica</i> yapraklarının metanol ekstraktı ve infüzyonuna ait toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde sonuçları.....	53
Tablo 3.2 : <i>Urtica dioica</i> gövdelerinin infüzyonuna ait toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde sonuçları.....	56
Tablo 3.3 : Isırgan otu köklerinin infüzyonuna ait toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde sonuçları.....	58
Tablo 3.4 : <i>Urtica dioica</i> bitkisinin yaprak, gövde ve kök kısımlarının florometrik DNA konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	60

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 : Türkiye iklim haritası.....	8
Şekil 1.2 : Türkiye toprak haritası.	8
Şekil 1.3 : Türkiye'nin bitki coğrafya bölgeleri.....	8
Şekil 1.4 : Türkiye'de sıcaklığın dağılışı.	10
Şekil 1.5 : Dünya'nın tropikal ve subtropikal iklim bölgeleri.	10
Şekil 1.6 : Isırgan otu türlerinin Türkiye'deki yayılışı.....	11
Şekil 1.7 : <i>Urtica pilulifera</i>	12
Şekil 1.8 : <i>Urtica membranacea</i>	12
Şekil 1.9 : <i>Urtica urens</i>	12
Şekil 1.10 : <i>Urtica dioica</i>	12
Şekil 1.11 : <i>Urtica dioica</i> 'nın Türkiye'deki dağılımı (www.tubitak.gov.tr/tubives).....	13
Şekil 1.12 : <i>Urtica dioica</i> 'nın hayat döngüsü.	14
Şekil 1.13 : Carl Linnaeus tarafından sınıflandırılmış olan <i>Urtica dioica</i> 'nın morfolojik yapısı.	15
Şekil 1.14 : Mayıs-2010 döneminde İstanbul-Avrupa yakasından toplanan ısırgan otu (<i>U. dioica</i>) örneği.	15
Şekil 1.15 : (A) Cu (II)-Nc, (B) Cu (I)-Nc komplekslerinin spektrumları.....	23
Şekil 1.16 : ABTS ⁺ radikal katyonunun absorpsiyon spektrumu.....	24
Şekil 1.17 : RAPD-PCR reaksiyonunun şematik gösterimi.....	30
Şekil 2.1 : Türkiye'nin farklı şehirlerinden ve farklı dönemlerde alınan <i>U. dioica</i> örnekleri.	31
Şekil 2.2 : <i>Urtica dioica</i> 'ya ait agglutinin isolectin VII precursor (chia5.7.2) gene, exon 3 gen bölgesinin FASTA formatı.	40
Şekil 2.3 : Primer 3 programıyla istenilen özelliklere uygun olarak belirlenen ilk dört primer setine ait ekran görüntüsü.	41
Şekil 2.4 : Oligo Analyzer programında primerlerin uygunluk derecelerinin belirlenmesi.	42
Şekil 2.5 : Belirlenen primer setinin Blast sonuç tablosu.	43
Şekil 3.1 : FİNZYMES Phire® Bitki Doğrudan PCR kiti ile yapılan tür tayinine yönelik PCR sonuçları. 193 bç'lik amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.	50
Şekil 3.2 : Primer setinin Blast sonuçları.....	51

- Şekil 3.3** : Fasulye ve nane bitkileri ile bazı *Urtica dioica* türleri ile yapılan PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren % 2'lik agaroz jel fotoğrafı.....51
- Şekil 3.4** : % 70 metanol esktratu yapılmış *Urtica dioica* yaprak örneklerinin Folin–CUPRAC korelasyonu.54
- Şekil 3.5** : % 70 metanol esktratu yapılmış *Urtica dioica* yaprak örneklerinin Folin–ABTS korelasyonu.54
- Şekil 3.6** : İnfüzyonu yapılmış *Urtica dioica* yaprak örneklerinin Folin–CUPRAC korelasyonu.55
- Şekil 3.7** : İnfüzyonu yapılmış *Urtica dioica* yaprak örneklerinin Folin–ABTS korelasyonu.55
- Şekil 3.8** : İnfüzyon yapılmış *Urtica dioica* gövde örneklerinin Folin–CUPRAC korelasyonu.57
- Şekil 3.9** : İnfüzyon yapılmış *Urtica dioica* gövde örneklerinin Folin–ABTS korelasyonu.57
- Şekil 3.10** : İnfüzyon yapılmış *Urtica dioica* kök örneklerinin Folin–CUPRAC korelasyonu.59
- Şekil 3.11** : İnfüzyon yapılmış *Urtica dioica* kök örneklerinin Folin–ABTS korelasyonu.59
- Şekil 3.12 a,b** : Muğla örneği ile belirtilen primerler kullanılarak yapılan RAPD-PCR sonuçları.62
- Şekil 3.13** : OPA-14 primeri kullanılarak İstanbul (Anadolu yakası), Ordu ve Tekirdağ gövde örnekleriyle yapılan aplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.63
- Şekil 3.14** : OPB-7 primeri ile sırasıyla Antalya, Van, Muğla, İstanbul (Anadolu yakası), Tekirdağ ve Erzurum gövde örnekleri ile yapılan RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.....64
- Şekil 3.15** : Erzurum, Mersin ve Tokat örneklerinin yaprak (a) ve gövde (b) kısımlarıyla yapılan RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.65
- Şekil 3.16** : Erzurum, Mersin ve Tokat örneklerinin kök kısımları ile yapılan amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.....65
- Şekil 3.17** : İstanbul (Avrupa yakası) gövde, İzmir örneğinin gövde ve kök kısımları ile yapılan RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.66

- Şekil 3.18 a, b, c** : Muğla örneğinin yaprak (a), gövde (b) ve kök (c) kısımlarının OPB-18 primeri ile yapılan RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.66
- Şekil 3.19** : Van (UD-2G) örneğine ait gövdesin x3'lü RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.67
- Şekil 3.20** : Tekirdağ (UD-6Y) örneğine ait yaprağın OPB-5, OPB-12 ve OPB-18 primerleri kullanılarak x3'lü RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.67
- Şekil 3.21** : Erzurum ve Mersin örneklerine ait köklerin x3'lü RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.68
- Şekil 3.22** : Tüm *Urtica dioica* örneklerinin gövdeleri ve OPB-18 primeriyle yapılan x1 RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.....68
- Şekil 3.23** : Sırasıyla Muğla, Erzurum, Mersin, İzmir, Antalya, Van, İstanbul (Anadolu yakası) ve İstanbul (Avrupa yakası) örnek yaprakları ve OPB-12 primeri ile x1 hazırlanmış RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.....69
- Şekil 3.24** : Sırasıyla Muğla, Erzurum, Mersin, İzmir, Antalya, Van, İstanbul (Anadolu yakası) ve İstanbul (Avrupa yakası) örnek gövdeleri ve OPB-7 primeri ile x1 hazırlanmış RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.....69
- Şekil 3.25** : Sırasıyla Muğla, Erzurum, Mersin ve İzmir örnekleri ve OPA-14 primeri ile x1 hazırlanmış RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.....69
- Şekil 4.1**: % 70 metanol ekstraktı yapılmış *U. dioica* yaprak örneklerinin toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik sonuçları.....73
- Şekil 4.2**: İnfüzyon yapılmış *U. dioica* yaprak örneklerinin toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik sonuçları.....73
- Şekil 4.3**: İnfüzyon yapılmış *U. dioica* gövde örneklerinin toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik sonuçları.....74
- Şekil 4.4**: İnfüzyon yapılmış *U. dioica* kök örneklerinin toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik sonuçları.....74

KISALTMALAR

ABTS	: 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat]
AFLP	: Amplifiye Olmuş Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
CUPRAC	: Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
HRP	: Horseradish peroksidaz
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
RAMD	: Rastgele Çoğaltılmış Monomorfik DNA
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Real-Time PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi
TEAC	: Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1.Amaç ve Kapsam

Geçmişten günümüze insanlar çeşitli amaçlarla bitkileri kullanmışlardır. Çok eski dönemlerden beri kullanılmakta olan bitkilerden biri olan *Urtica dioica* (ısırgan otu) ile yapılan çeşitli araştırmalar bu bitkinin pek çok özelliğini ortaya çıkarmıştır.

Klasik sınıflandırma metodu olan morfolojik sınıflandırma çalışmalarına destek amaçlı kullanılan moleküler yöntemler ile bitkilerin sınıflandırılması yapılmaktadır. Tezimizde online veri tabanları kullanılarak dizayn edilen primer seti ile *U. dioica*'nın moleküler tür tespiti yapılmıştır.

Antioksidan ve fenolik madde gibi birçok yararlı bileşik sınıfı içerdiği bilinen ısırgan otunun, ülkemizde bölgelere göre farklılık gösterme durumlarının incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ilkbahar ve sonbahar dönemlerinde 12 farklı şehirden alınan ısırgan otu örneklerinin % 70 metanol ekstraktı ve infüzyonu ile toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde miktarları belirlenmiştir.

Moleküler tür tespiti yapılan *U. dioica* örneklerinin moleküler düzeyde değişimlerinin incelenmesi için 15 farklı primer ile RAPD-PCR yapılmış ve korunmuş bölgeleri gösteren 2 (OPA-14 ve OPB-7) ve değişken bölgeleri gösteren 3 (OPB-5, OPB-12 ve OPB-18) primer belirlenerek deneylere bu 5 oligonükleotid primer ile devam edilmiştir.

Tüm sonuçlar incelendiğinde tür tespiti yapılmış *U. dioica* bitkilerinin, şehirlere göre toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde miktarları metanol ekstraktı ve infüzyonu yapılmış örnekleriyle belirlenmiştir. Etnobotanik olarak kullanılan ısırgan otunun kullanımı ile ilgili olarak bu tür yararlı bileşiklerin miktarlarının yoğun olduğu şehirlerin tercih edilmesi ve yararlı kısımlarının kullanılması amaçlanmıştır.

İçerdiği yapısal kimyasalların farklılığı genetik düzeyde de farklılığın olabileceği düşüncesini getirmiştir. Bu amaçla yapılan RAPD-PCR sonuçlarına göre *U. dioica*'nın şehirlere göre genetik altyapı farklılıkları olduğu görülmüştür.

1.2.Etnobotanik ve Isırgan Otu

Etnobotanik, Grekçe halk anlamına gelen “ethnos” ile bitki anlamına gelen “botane” sözcüklerinden oluşan “etnobotanik” terimi ilk kez 1895 yılında ABD’li bilim adamı John W.Harsberger tarafından kullanılmıştır. Ayrıca etnobotanik teriminin ilk geçtiği *The Purposes of Ethnobotany* adlı eser bu konuda bilinen ilk yayındır (Chen, 1996). Harsberger etnobotaniği ‘yerli halkın bitki kullanımı’ olarak tanımlamıştır. Etnobotanik, insan-bitki ilişkilerini inceleyen bilim dalıdır ve “bir yörede yaşayan halkın çevresinde bulunan bitkilerden çeşitli gereksinimlerini karşılamak üzere yararlanma bilgisi ve o bitkiler üzerine etkileri” olarak tanımlanabilir. Tıbbî bitki terimi ise, hastalık tedavisinde veya hastalıklardan korunmak amacıyla kullanılan bitkileri ya da bitkisel ürünleri kapsar. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 1980 yılında tıbbî bitkileri “bir veya daha fazla organıyla tedavi edici veya hastalıkları önleyici olabilen veya herhangi bir kimyasal farmasötik sentezin öncüsü olabilen bitki çeşidi” olarak tanımlamıştır (Yıldırım, 2004).

Etnobotanik çalışmalar, deneme yanılma yoluyla edinilmiş ve uzun bir zaman sürecinde nesilden nesile aktararak günümüze ulaşmış, çok değerli bilgileri yansıtan, içerikleri ile bitkilerin bilimsel olarak değerlendirilmelerine önemli katkıda bulunmuş çalışmalardır (Yıldırım, 2004). Bu çalışmalar; yalnızca insanlarla bitkilerin yüzyıllardan beri devam eden karşılıklı etkileşimlerini kaydetmekle kalmaz aynı zamanda bu etkileşimden doğan sonuçların, biyolojik çeşitliliğin korunması ve kırsal kesimde yaşayan halkın gelişiminde kullanılmasına da olanak verir (Mart, 2006; Ertuğ, 2000).

Bitkilerin tedavide kullanılışı insanlığın varoluşuyla başlamıştır. Geçmişten gelen, günümüzde hala kullanılan ve günümüzün sentetik ilaçlarının birçoğunun temelini oluşturan bitkileri tanıyıp doğru kullanmak büyük önem taşımaktadır. 20. yy.’ın son çeyreğinde sentetik ilaçların faydalarının yanında zararlarının ve yan

etkilerinin de oldukça fazla olduğunun saptanması sonucu birçok hastalığın tedavisinde bitkisel ilaçlara bir geri dönüş yaşanmıştır. ‘Yeşil akım, doğaya dönüş’ olarak adlandırılan bu akımda, bitkisel ilaçlar basit günlük hastalıkların tedavisinde ilk tercih olmuşlardır (Kızıllarslan, 2008).

Diğer taraftan, Dünya’nın büyük bir kısmında, yüzlerce yıldır, bitkiler en önemli şifa kaynağını meydana getirmişlerdir (Tablo 1.1). Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) geliştirmekte olan ülkelerdeki halkın büyük oranda bitkisel ilaçlarla tedavi olduğunu bildirmektedir (Kızıllarslan, 2008).

Tablo 1.1 : Dünya’da ısırgan otunun etnobotanik kullanımı.

(<http://www.rain-tree.com/nettles.htm>. Erişim tarihi; 23.11.2010).

ÜLKE	ISIRGAN OTUNUN ETNOBOTANİK KULLANIMLARI
Brezilya	İdrar söktürücü, gut, prostat, ishal, diyabet, idrar bozuklukları, alerji.
Kanada	Ağrı, alopecia, göğüs hastalıkları, tahriş giderici olarak, doğumlarda, romatizmal hastalıklarda.
Almanya	Prostat, idrar söktürücü, romatizma.
Hindistan	Tahriş giderici, gut, romatizma, burkulma.
Türkiye	Astım, kan hastalıkları, bronşit, idrar söktürücü, müşil, romatizma, uyarıcı olarak, egzama, baş ağrıları, böbrek hastalıkları, kan yapımı, idrar yolu hastalıkları, kan şekeri düşürücü, karaciğer, safrakesesi ve dalak hastalıklarında.
ABD	Sırt ağrısı, kanser, sara, akıl hastalıkları, romatizma, sinir krizi, idrar söktürücü, prostat, yüksek tansiyon.
Peru	Kas ve eklem ağrısı, egzama, ülser, astım, diyabet, bağırsak iltihabı, romatizma.

Dünya üzerinde 750.000- 1.000.000 arasında bitki türünün bulunduğu tahmin edilmektedir. Gıda elde etmek için yetiştirilen türler 3.000 civarındadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bitkisel drogların sayısını 1900 olarak vermiştir. Tedavi amacıyla

kullanılan yaklaşık 20.000 bitkinin 600 kadarı Türkiye’de yetişmektedir. Bu sayının diğer ülkeler içinde geçerli olabileceği düşünülürse gerçekte kullanılan tıbbi bitki miktarının da 100.000 civarında olduğu tahmin edilebilir (Baytop, 1999).

Yüzyıllardır süregelen etnobotanik çalışmalar incelendiğinde ısırgan otunun tedavide büyük öneme sahip olduğu görülmüştür. Geleneksel kullanımda hala birçok hastalığın tedavisinde aktif olarak rol almaktadır (Konrad ve ark., 2000; Leporatti ve Corradi, 2001; Miraldi ve ark., 2001).

Tamamlayıcı ve alternatif tıp (TAT- CAM: Complementary and Alternative Medicine), bilimsel tıba destek amacıyla yapılan, bilimsel tıbbi uygulamalar yerine yapılan ve etkisi bilimsel olarak kanıtlanmamış tedavilerdir (Kav ve ark., 2008). Dünyada giderek yaygınlaşan uygulamalar ve literatürdeki eksiklikler nedeniyle 1991 yılında Birleşik Devletlerde Ulusal Sağlık Enstitüsüne (NIH) bağlı Ulusal Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Merkezi (NCCAM) kurulmuştur. Bu merkezin amacı tamamlayıcı ve alternatif tıp uygulamalarının güvenilirlik ve etkinliğini incelemek, etkinliği bilimsel olarak kanıtlanmış uygulamaların konvansiyonel tedavilere katılımını sağlamaktır. Alternatif/tamamlayıcı tıp uygulamaları kanser, artrit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve kronik karaciğer hastalıkları gibi kronik hastalıklarda da giderek artmaktadır (Altun ve Özden, 2004).

2001-2007 yılları arasında kanser ve TAT ile ilgili yapılan çalışmaların sonucuna göre Türkiye’de en yaygın olarak kullanılan bitkinin ısırgan otu olduğu belirtilmiştir (Kav ve ark., 2008).

1.3.Biyçeşitlilik

Biyçeşitlilik, bir bölgedeki genlerin, türlerin, ekosistemlerin ve ekolojik olayların oluşturduğu bir bütündür. Canlı yaşam için gerekli olan yaşam destek sürecini sürdürebilme yeteneğinin ve sağlıklı çevrenin bir göstergesidir (Işık, 1997).

Biyolojik çeşitlilik bir türü meydana getiren bireyler arasındaki kalıtsal farklılıkları içeren genetik çeşitlilik ve türler arası farklılıkların meydana getirdiği ekolojik çeşitlilik olarak iki ana kategoride ele alınabilir.

Ekolojik çeşitlilik, belirli bir bölgedeki farklı ekosistemler, tür toplulukları ve bu toplulukların içindeki tür sayıları olarak tanımlanmaktadır. Bir tür topluluğundaki tür sayısı arttıkça, topluluğun enformasyon içeriği, tür çeşitliliği de artmaktadır (Kence, 2005). Genetik çeşitlilik ise, bir türün gen havuzundaki kalıtsal bilginin çeşitliliği, zenginliği olarak tanımlanabilir. Her canlı türünün değişen çevre koşullarına uyum sağlayabilmesi için genetik çeşitliliğe sahip olması şarttır. Yeterli genetik çeşitliliğe sahip olmayan canlı türleri, değişen çevre koşullarına ayak uyduramayarak yok olmaya mahkûmdur.

Biyolojik çeşitliliğin korunması için gerekçe olarak ekosistem dengesindeki önemi dışında, insanlığın yararı açısından pek çok sebep sayılabilir. Biyolojik zenginlikler tıp, tarım ve endüstride önemli yararlar sağlamaktadır. Biyolojik zenginlikler ilerde tarımsal amaçlı biyoteknoloji uygulamalarında gerekli kaynakları oluşturacaktır. Biyolojik zenginliklerin yeterince tanınmaması ve bilinmemesi, bu kaynaklardan yararlanmada biyoteknoloji uygulamalarının sınırlı kalmasına ve bu alandaki yatırımların istenilen verimi sağlayamamasına sebep olabilecektir (Kence, 2005).

Biyolojik çeşitliliğin korunmasında ekosistemlerin bir bütün olarak korunması temel yaklaşım olmalıdır. Ancak, bu kaynakların yalnızca korunması değil aynı zamanda değerlendirilmesi, sürdürülebilir kullanımı ve kayıt altına alınması ve toplumun da bu kaynakları bilinçli olarak koruması önemlidir (Varol, 2007).

Biyçeşitlilik üzerindeki tahribatların nedenleri arasında:

- Tarımsal etkinlikler (örneğin, meraların tarlaya dönüştürülmesi, aşırı otlatma, anız yakma, aşırı gübre ve ilaç kullanımı, modern çeşitlerin marjinal alanlarda kullanımı),
- Endüstrileşme, şehirleşme ve imar yapılarının artması,
- Doğadan bitki toplama ve doğal kaynakların ihtiyaçların karşılanması amacıyla diğer kullanımları,
- Kontrol dışı ormancılık faaliyetleri ve orman yangınları,
- Turizmdeki gelişmeler,
- Canlı ya da canlı parçalarının patentlenebilir olarak görülmeye başlanması,

- Biyolojik ve genetik çeşitliliğin kontrolsüz ve izinsiz kullanımı gelmektedir.

Biyolojik çeşitliliğin bileşenlerinden biri olan genetik çeşitliliğin belirlenmesi, ekosistemlerin sağlıklı ve verimli olması, sürdürülebilir işletimi için en önemli şartlardan biridir. Tür içi genetik çeşitliliğin yüksekliği, değişen çevre şartlarına uyum açısından önemlidir. Popülasyonlar içi ve arasındaki genetik farklılıklar bitki ve hayvanların kendi çevrelerinde ortak evrimleşmesinin bir sonucudur. Bu çeşitliliğin yapılanmasının ve boyutunun tespiti türlerin işletilmesi açısından zorunludur. Genetik çeşitliliğin yüksek olması iki açıdan önemlidir:

1. Genetik çeşitliliği fazla olan türler zamana ve yere göre değişen çevre koşullarına daha başarılı uyum sağlama yeteneğine sahiptir.
2. Genetik çeşitliliği fazla olan türler bilimsel ve teknolojik gelişmelere bağlı olarak değişen insan isteklerini karşılamada daha etkili ve daha yararlı olurlar (Varol, 2007).

1.3.1. Genetik Kaynakların Temel Korunma Yöntemleri

Bitki genetik kaynaklarının korunması, gen havuzunda bulunan çeşitliliğin gerçek ya da potansiyel kullanımı, etkin biçimde saklanması ve genetik çeşitliliğin insanlığın kullanımına sunulmasıdır. Temelde her biri değişik tekniklerin bir araya gelmesiyle oluşan ve *in situ* ile *ex situ* olarak adlandırılan iki temel koruma sistemi vardır.

In situ; ekosistemlerin ve doğal habitatların korunması ve tür popülasyonlarının kendi çevresi içinde canlı olarak saklanıp, devam ettirilmesi ya da kültür çeşitlerinin kendi özelliklerini geliştirdikleri çevre koşullarında yetiştirilmesidir.

Ex situ; doğal habitatının dışında ve genel olarak yok olma tehlikesi altında olan genotiplerin korunması olarak tanımlanır (Rao, 2004), bazı vejetatif olarak üretilen bitki türlerinin *ex situ* muhafazası için *in vitro* imkânları da bulunmaktadır (Varol, 2007). Meyve türlerinin doğal genetik kaynaklarının ulaşılabilirliği, ürün geliştirme ve ıslah çalışmalarına yardımcı olabilir (Tahir, 2003).

Bitkisel gen kaynaklarının korunmasının temel prensipleri, uzun süre depolanabilme, canlılık kayıplarının en az olması, çok sayıda örneğin depolanması, bakım çalışmalarının ve maliyetin düşük olması oluşturmaktadır.

Bitki genetik kaynaklarının korunmasında en yaygın uygulama alanı bulan strateji *ex situ* koruma (tohum depolama, *in vitro* depolama, DNA depolama, çiçek tozu depolama, tarla gen bankası ve botanik bahçeleri) olmuştur. Özellikle modern biyoteknolojide sağlanan gelişmeler, organizmaları tüm olarak değil gen düzeyinde değerlendirmeyi zorunlu hale getirmiştir. Dolayısıyla doğal kaynaklarımızda var olan her türlü canlı organizmanın çalışılması gerekmektedir (Varol, 2007). Ülkemizde *ex situ* koruma çalışmaları Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü bünyesinde 1964 yılında başlamıştır. Bu çalışmada ülkemizde yetişen bitkilerin tohumları korunmaya başlanmıştır. Daha sonra Tarla Ürünleri Merkezi Araştırma Enstitüsü ve Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi de koruma çalışmalarına katılmıştır (Aka, 2005).

1.4.Türkiye'nin Bitki Çeşitliliği ve Nedenleri

Ilıman kuşak içerisinde bulunan Türkiye, sahip olduğu bitki çeşitliliği açısından çevresinde yer alan birçok ülkeden farklı olan özellikleri ile dikkati çeker. Son yıllarda yapılan çalışmaların da eklenmesiyle, Türkiye'nin 12.000 civarında bitki taksonuna (tür, alttür ve varyete düzeyinde) sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Türkiye'nin bu özelliği coğrafi faktörlerin ya da diğer bir ifade ile bitkilerin yetişme ortamlarının çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır. İklim özelliklerinde kısa mesafelerde ortaya çıkan değişiklikler (Şekil 1.1), morfolojik özelliklerinden kaynaklanan çeşitlilikler, toprak tiplerinin farklılıkları (Şekil 1.2) gibi çok sayıda coğrafi faktör, bitki formasyonlarının da farklılaşmasına ve türce çeşitlenmesine yol açmaktadır (Avcı, 2005).

Ülkenin 7 coğrafi bölgesinin her biri ayrı iklim, flora ve fauna özellikleri gösterir ve dünyanın en önemli üç fitocoğrafik bölgesine sahiptir (Avrupa-Sibiryaya, İran-Turan, Akdeniz bölgesi) (Seçmen ve ark., 2004). Şekil 1.3'te Türkiye'deki fitocoğrafik bölgeler gösterilmiştir.

Yüksek endemizme sahip Türkiye florası, tıbbi ve aromatik bitkiler açısından da oldukça zengindir. Bu yüksek endemizm düzeyi, Türkiye'ye bu türlerin, özellikle de dünyanın büyük bölümünün bağımlı olduğu tahılların türetildiği yabancı türlerin yeterince korunması, tehlike altına girmemesi veya yok olmaması konusunda daha da büyük bir sorumluluk yüklemektedir (Eminağaoğlu, 2004).

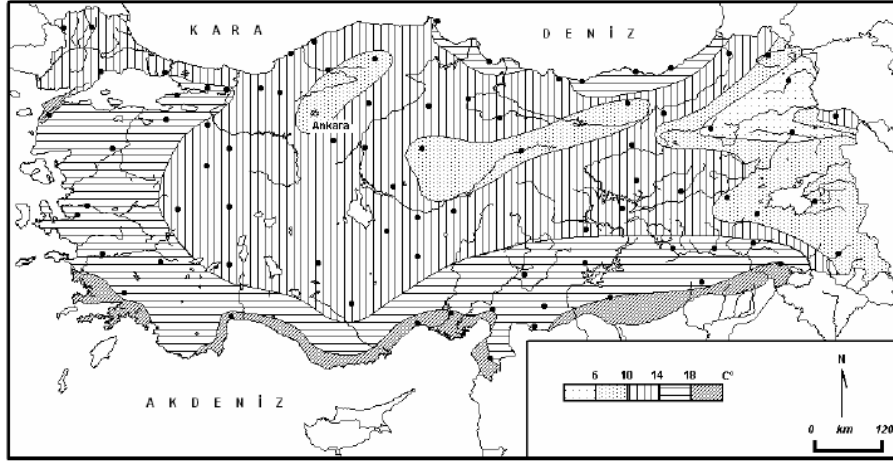
Bitki formasyonlarını oluşturan bitki türleri her yerde aynı özellikleri göstermez. İklim, toprak ve jeomorfolojik özelliklerden kaynaklanan yerel farklılıkların da ortaya çıkması ile bitki topluluklarını oluşturan bitki türleri çeşitlenir (Avcı, 2005).

Türkiye'nin flora bölgeleri açısından sahip olduğu bu özellikler bitki çeşitliliği açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bölgelere ait çok sayıda özel bitki, Türkiye'deki bitki toplulukları içinde yayılış göstermektedir. Bunlardan bazıları endemik, bazıları da yayılış alanı ülke sınırları dışına da taşan bitkilerdir.

İklim özellikleri açısından da Türkiye'de çeşitlilik söz konusudur. Çok kısa mesafelerde yerel özellikler nedeniyle ortaya çıkan farklılıkların, bitki çeşitliliğine katkıları önemlidir (Avcı, 2005).

Bitki topluluklarının dağılışının belirlenmesinde iklim çok önemlidir. Bu dağılışın nasıl şekilleneceğinin yanında bitki topluluklarına hangi türlerin dahil olacağı, yani bu toplulukların floristik kompozisyonlarının hangi taksonlardan meydana geleceği de iklimle yakın ilişkilidir (Svenning ve Skov, 2005).

Türkiye'de yıllık ortalama sıcaklık dağılışında önemli farklar göze çarpar (Şekil 1.4). En yüksek ortalama sıcaklık değeri 20 °C civarında iken bazı yerlerde 6 °C'nin altına iner. Yıllık ortalama sıcaklıklar kıyı bölgelerinde yüksek dağ sıralarının çevrelediği iç kısımlardan yüksektir. En yüksek yıllık ortalama sıcaklık değerlerine Akdeniz kıyılarında erişilir. Akdeniz kıyılarını Ege, Marmara ve Karadeniz kıyıları izler. İç Anadolu'ya geçilince yıllık sıcaklık değerleri belirgin şekilde azalır. Doğu Anadolu'da ise yıllık ortalama sıcaklıklar en düşük değerlere inerler (Avcı, 2005).

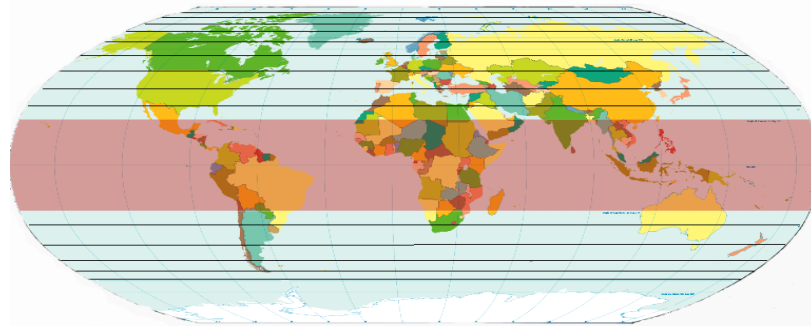


Şekil 1.4 : Türkiye’de sıcaklığın dağılışı.

1.5. Urticaceae

Urticaceae (ısırganotuğiller) familyası Urticales takımı içerisinde, her iki yarım kürenin tropikal ve subtropikal (Şekil 1.5) alanlarında geniş yayılış alana sahip bir gruptur. Genel olarak yakıcı tüylü, tekli tohumları olan, çoğunda sütsü öz bulunmayan, basit yapraklı özellikleriyle tanımlanmıştır. Spesifik yakıcı tüyleri tüm bitki geneline yayılmış olup, küresel, çubuksu, yıldızsı şekiller gösterirler ve bazı türlerde teşhis edici özellik olarak kullanılmaktadır (Ayan ve ark., 2006).

Urticaceae familyasındaki bitkilerin büyük bir kısmı çok yıllık olup, diğerleri tek yıllık gelişim göstermektedirler. Genelde otsu forma sahip olmakla birlikte çalı formunda olanları da vardır (Ayan ve ark., 2006).



- Tropik Bölge
- Subtropik Bölge.

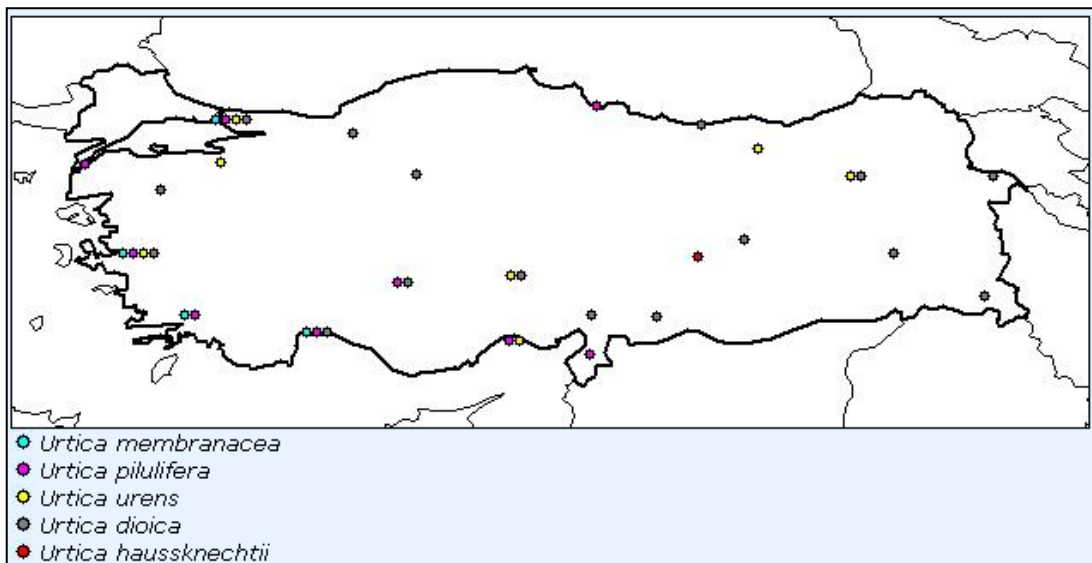
Şekil 1.5 : Dünya’nın tropikal ve subtropikal iklim bölgeleri.

(<http://www.joabbess.com>. Erişim tarihi; 06.04.2010).

1.5.1. *Urtica L. (Isırgan otu)*

Isırgan Otunun Yapısal Özellikleri

- 30-150 cm kadar büyüyebilir.
- Otsu, gövdesi dik, dört kösemli, basit veya tabandan itibaren dallanmıştır.
- Gövdeyi ve yaprakları kaplayan tüyler salgı maddesi ile doludur ve dokunulduğunda patlar. Bir iğne gibi deriye girerek sıvıyı akıtır ve deri yüzeyinde kızarıklık oluşturur.
- Yaprakları saplı, oval şekilli, dişli kenarlı, üst tarafı koyu yeşil renkli, 5–10 mm uzunluklu, parlak yakıcı tüylerle kaplıdır.
- Meyveler esmer renkte, fındıksı, küçük, katı sekinde bir tohumdur. Bitki tohumla büyüyebilir.
- Bitkinin kökleri sarı ve çok dallıdır.
- Çiçekler tek ve iki eşeylidir.
- Türkiye’de basta Karadeniz Bölgesi olmak üzere her bölgede yetişir.
- Yapraklar mayıs- temmuz aylarında gövdeden sıyrılarak toplanır.
- Tohum temmuz - ağustos aylarında toplanır.
- Kökler ilkbaharda ve sonbaharda sökülür, tüm organları gölgede kurutulur (Eröztürk, 2000).
- Ülkemizde 5 türü bulunmaktadır (Şekil 1.6).



Şekil 1.6 : Isırgan otu türlerinin Türkiye’deki yayılışı (www.tubitak.gov.tr/tubives).

Ülkemizde bulunan türler; *Urtica pilulifera* (Şekil 1.7), *Urtica membranacea* (Şekil 1.8), *Urtica urens* (Şekil 1.9), *Urtica haussknechtii* ve *Urtica dioica* (Şekil 1.10). *U. Haussknechtii* ülkemizde yalnızca Malatya’da yetişmektedir (Seçmen ve ark., 2004, www.tubitak.gov.tr/tubives/-17.09.2010).



Şekil 1.7 : *Urtica pilulifera*



Şekil 1.8 : *Urtica membranacea*



Şekil 1.9 : *Urtica urens*



Şekil 1.10 : *Urtica dioica*

1.5.1.1. *Urtica dioica*

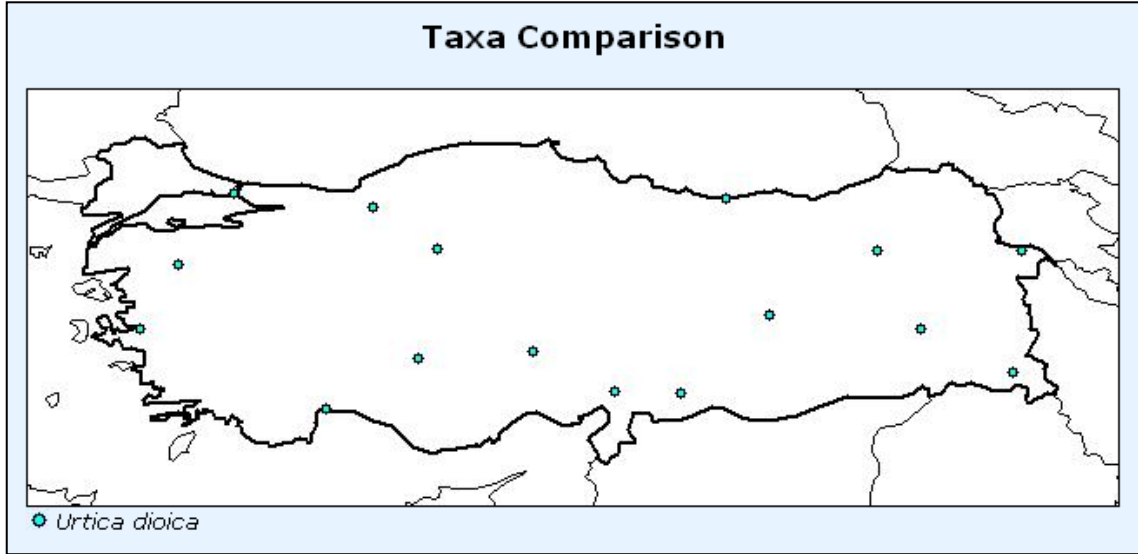
Urtica dioica L. çok yıllık, dioik ve otsu bir bitkidir (Tablo 1.2). Boyu bazen bir metreyi geçer (Baytop, 1996). Türkiye’deki yetişme alanları çok yaygın olup her yere dağılmıştır (Towsend ve Davis, 1982., Baytop, 1983) (Şekil 1.11).

U. dioica’nın yaprakları karşılıklı, basit ve kenarları dişlidir. Çiçekler çok küçüktür, erkek veya dişi çiçekler karışık bir şekilde toplanarak gövde üzerinde salkımlar halindedir (Çelebi, 2001), (Şekil 1.12). Meyve tipi akendir (içinde tek tohum

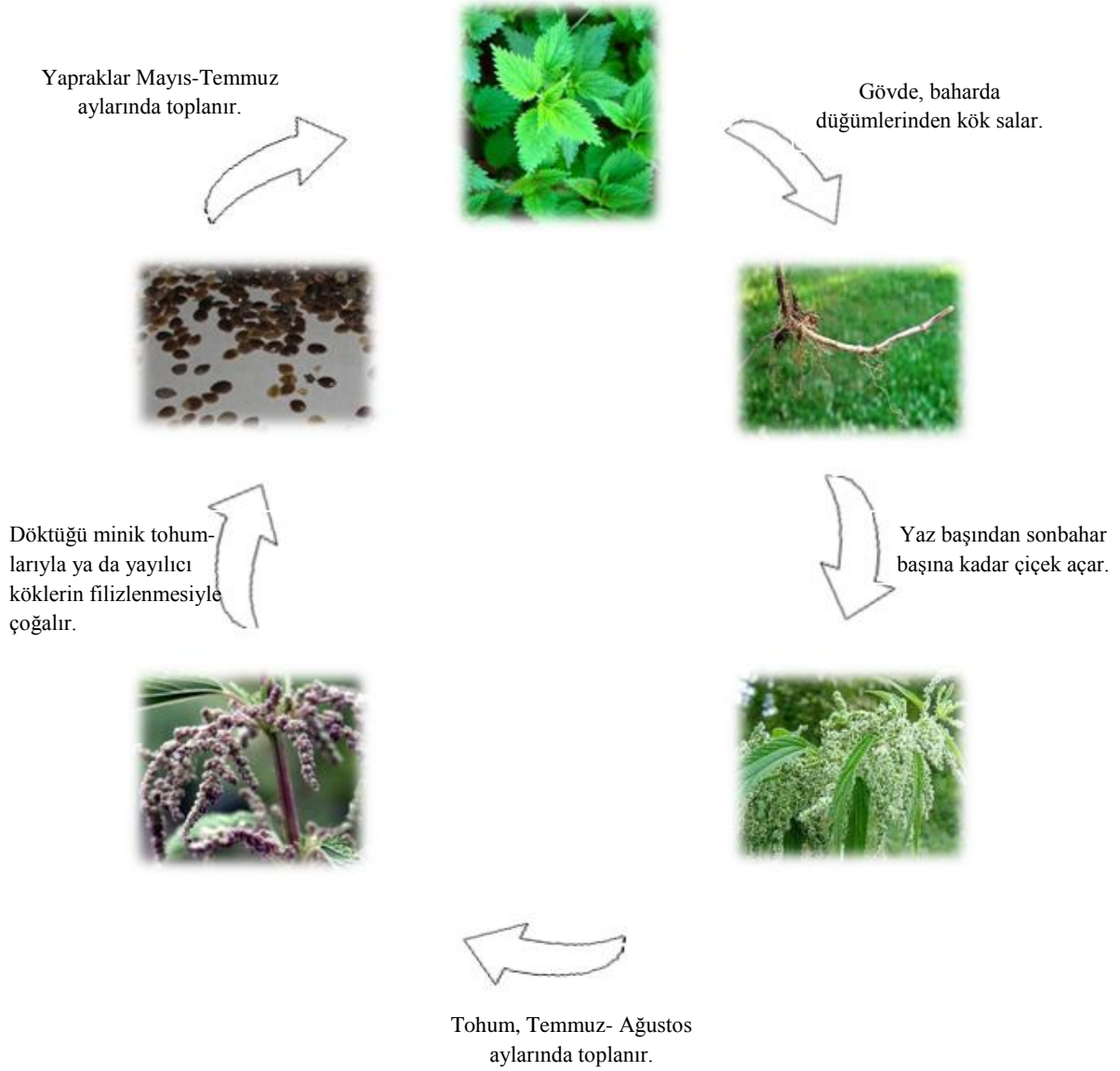
bulunan ve olgunlaştığında açılarak tohumun çıkmasına olanak verecek özel bağlantı yerleri olmayan kuru meyve) (Şekil 1.13, 14).

Tablo 1.2 : *Urtica dioica* taksonomik sınıflandırılması.

Alem:	Plantae (Bitkiler)
Bölüm:	Magnoliophyta (Kapalı Tohumlular)
Sınıf:	Magnoliopsida (İki Çenekliler)
Takım:	Urticales
Familiya:	Urticaceae (Isırgangiller)
Cins:	<i>Urtica</i> (Isırgan Otu)
Tür:	<i>Urtica dioica</i> (Büyük Isırgan Otu)

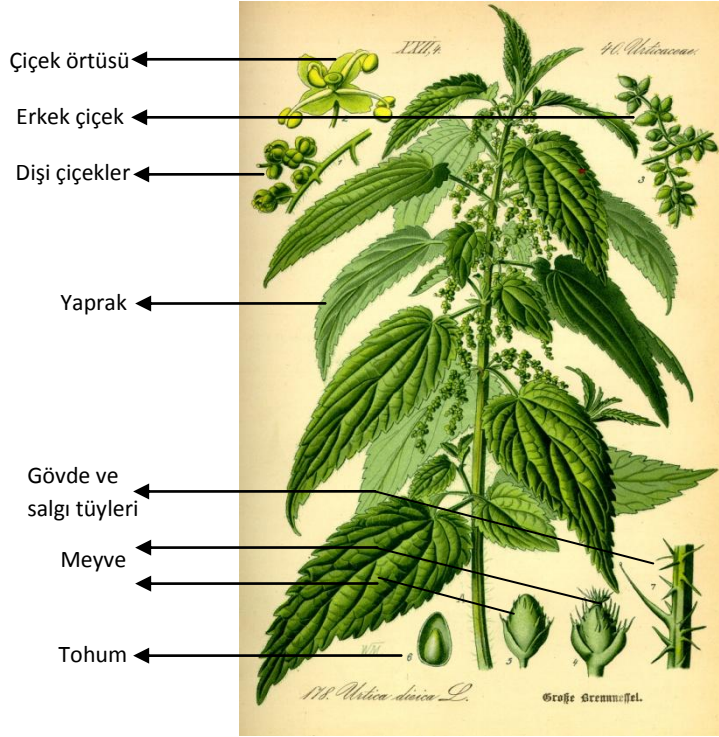


Şekil 1.11 : *Urtica dioica* 'nın Türkiye'deki dağılımı (www.tubitak.gov.tr/tubives).



Şekil 1.12 : *Urtica dioica* 'nın hayat döngüsü.

U. dioica L. bitkisinin kökleri, gövdesi, yaprakları ve tohumları tedavi amaçlı olarak kullanılır (Baytop, 1996). Mineralce zengin yapraklarında demir, kalsiyum, magnezyum, fosfor, potasyum, A, C ve K vitaminleri bol miktarda bulunur. Tedavi amaçlı kullanım alanı, çok eski tarihlere kadar dayanmakta olup oldukça geniştir. Kan temizleyici, idrar arttırıcı, iştah açıcı, kemik erimesini önleyici, deri hasarlarını giderici, sindirimi düzenleyici, süt salgılanmasını başlatıcı ve ishal kesici etkileri olduğu bilinmektedir (<http://www.rain-tree.com/nettles.html>).



Şekil 1.13 : Carl Linnaeus tarafından sınıflandırılmış olan *Urtica dioica*'nın morfolojik yapısı.



Şekil 1.14 : Mayıs-2010 döneminde İstanbul-Avrupa yakasından toplanan ısırgan otu (*U. dioica*) örneği.

U. dioica'nın tümünde, asetik asit, asetofenon, ferulik asit, P-kumarik asit, asetil kolin, folasin, histamin, koproporfirin, likopen, bütirik asit, protoporfirin, serotonin ve

ksantofil bulunmaktadır. Yaprak kısımlarında çinko, sodyum, rubidyum, potasyum, brom, fosfor, klor, azot, molibden, krom, mangan, kurşun, demir, bakır, kobalt, magnezyum, kalsiyum, bor, alüminyum gibi kimyasal elementlerin yanında tiamin, riboflavin, niasin, gibi vitamin grupları ve bunlarla beraber çeşitli karbonhidrat, selüloz ve betain grupları bulunmaktadır. Tohumları ise gliserol, linoleik asit, oleik asit, palmitik asit ve çeşitli proteinler içermektedir (<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/farmacy2.pl>).

U. dioica 'nın kuru maddesi % 18 protein, % 14,5- 17 albüminli maddeler, % 2,5 yağlı maddeler ihtiva eder. Tohumlarda % 8-10 civarında sabit yağ bulunur. 1 kg taze bitki 130 mg C vitamini, 730 mg karotin ve oksalat içerir. Yakıcı tüyleri içersinde asetilkolin, histamin ve formik asit bulunur. Yapraklar; K, vitamin B1, provitamin A, ürtisin glikozidi, sistosterin, sepi maddeleri, ksantofil, külü ise % 6,3 demirtrioksit, silisyum, potasyum, kalsiyum içerir (Koç, 2002) (Tablo 1.3).

Tablo 1.3: Isırgan otunun yapısında bulunan maddeler. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/farmacy2.pl>. Erişim tarihi: 06.12.2010; (Yıldız, 2008).

	Yaprak	Bütün bitki	Tohum	Tüyler
Kimyasal element	Çinko Sodyum Rubidyum Potasyum Brom Fosfor Klor Azot Molibden Krom Mangan Kurşun Demir Bakır Kobalt Magnezyum Kalsiyum Bor Alüminyum			

Aminoasit-Vitamin	Tiamin Riboflavin Niasin Beta-karoten K vitamini Provitamin A	Folasin 130mg C vitamini (1 kg içinde) 730mg karotin (1kg içinde) Oksalat		
Kuru madde		% 18 protein % 14,5-17 albüminli madde %2,5 yağlı madde	%8-10 sabit yağ	
Diğer	Karbonhidrat Selüloz betain grupları	Asetik asit Asetofenon Ferulik asit P-kumarik asit Asetilkolin Histidin Koproporfirin Likopen Bütirik asit Protoporfirin Serotonin Ksantofil	Gliserol Linoleik asit Oleik asit Palmitik asit	Asetilkolin Histamin Formik asit

1.5.1.2. Isırgan Otunun Etkileri ve Kullanım Alanları

Anti-inflamatuar etki: Isırgan otunun hem yaprakları hem de köklerinin, TNF α , IL-1 β gibi proenflamatuar sitokinlerin aşırı stimülasyonunu önlediği gösterilmiştir. Sitokinler immun sistemin mesajcıları olarak düşünülebilir (Telo, 2006).

Anti-viral ve immun denge: Isırgan otu kökünden UDA (*Urtica dioica* agglutinin) süper lektin denen küçük molekül ağırlıklı lektin elde edilmiştir. UDA N-asetil glukozamin spesifik lektin olarak kabul edilmektedir. Bu süper lektinin HIV, soğuk algınlığı ve influenzadan sorumlu virusleri inhibe ettiğine dair kanıtlar mevcuttur. Ayrıca UDA T hücre sitümülanıdır. CD4⁺ ve CD8⁺ T-hücrelerinin her birini ayırt edebildiği gibi T hücre aktivasyonu ve sitokin üretimine neden olabilme kapasitesinden dolayı diğer klasik T hücre stimulanlarından farklıdır. Isırgan otundaki süper lektin dengeyi korumak için immun sistemi stimüle etmektedir (Telo, 2006).

Antioksidan etkileri: Isırgan otu yaprak ekstraktlarının lipid peroksidasyonu üzerine belirgin inhibitör etkileri gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada ısırgan otunun, serbest radikal oluşumunun bir belirleyicisi olan MDA (malondialdehit)'nin, yükselmiş

düzeylerini azaltması bir antioksidan adayı olabileceğini göstermiştir. Yine bir çalışmada ısırgan otu ekstraktının serbest radikal oluşumu üzerine etkili azaltıcı gücü aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Linoleik asit peroksidasyonunda ısırgan otu ekstraktlarının ilaç olarak verilmesi α -tokoferolden daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Isırgan otunun ekstraktından çok sayıda flavanol glikozidler izole edilmiştir (Telo, 2006).

İyi huylu prostat hipertrofisi ve Prostat kanseri: Isırgan otu köklerinin kaynatılması ile elde edilen çayın, iyi huylu prostat hipertrofili hastaların yaşam kalitesini artırması poliüri ve nokturiyi azaltmasına bağlı olduğu gösterilmiştir. UDA gibi kökteki bileşimler prostat hücrelerinde membran Na^+ - K^+ -ATPazını inhibe ederek prostat hücre metabolizma ve büyümesini süprese etmektedirler. Bu lektin immünstimulator aktivite göstermekte ve epidermal büyüme faktör reseptörü ile etkileştiği varsayılmaktadır (Telo, 2006).

Diğer etkiler; Isırgan otu yaprak ve kökleri kan temizleyicisi ve diüretik olarak, bitkinin infüzyonu ise nasal ve menstrual kanama, diyabet, romatizma, egzema, anemi, saç kaybı, ekspektoran ve antidiyareal olarak kullanılmaktadır (Fijalek ve ark., 2003). Kardiyovasküler etkileri, insan lenfosit proliferasyonunu stimüle ettiği, nötrofiller üzerine güçlü immün stimulator etkileri gösterilmiştir (Cetinus ve ark., 2005). Isırgan otu ekstraktının antibakteriyel aktivite gösterdiği ve ülser oluşumu azalttığı ispatlanmıştır (Gülçin ve ark., 2004) (Tablo 1.4).

1.5.1.3. Isırgan Otu Tarımı

Isırgan otu bitkisinin baskın bir tür olması ve nemli alanlarda hızla gelişmesi sebebiyle yetiştiriciliği kolaydır. Çok yıllık ısırgan otu türü olan ve lif üretimi amacıyla yetiştiriciliği yapılabilen *U. dioica*, aynı araziden uzun yıllar verim alınabilen bir bitkidir.

a. Toprak İstekleri

Isırgan otu bitkisi, besin maddelerince zengin, ağır, humuslu, nemli ve yabancı otu bulunmayan topraklarda daha iyi gelişmektedir. İklim adaptasyonu bakımından özel istekleri yoktur ve bu nedenle kuzey ve güney yarımkürenin ılıman bölgelerinde yaygın

olarak bulunmaktadır. Toprak seçiciliği yoktur. Isırgan otu bitkisi farklı karakterlerdeki topraklarda yetiştirilebildiği gibi fazla gübrelenmiş arazilerde yapılan tarımda karşılaşılan problemlere karşı da çözüm olabilmektedir. Bu nedenle hem marjinal alanların tarıma kazandırılmasında hem de fazla gübrelenmiş yerlerde rahatlıkla yetiştirilebilmektedir (Ayan ve ark., 2006).

Tablo 1.4: Isırgan otunun kullanım alanları.

İlaç olarak kullanımı	Gıda olarak kullanımı	Diğer kullanım alanları
Astım Akciğer iltihabı Hemoroid Karaciğer iltihabı Anemi Kanser Böbrek rahatsızlığı Solunum yolları rahatsızlığı Öksürük tedavisi Saç dökülmesi Nefes darlığı Felç Tansiyon Mide ağrısı Mantar enfeksiyonları Kemik erimesi Kadın hastalıkları Hipertansiyon Böbrek taşı düşürme Hazmı kolaylaştırma	Çay olarak kullanımı (kök, tohum ve yaprak çayları) Isırgan otu tentürü hazırlanarak Direk yaprakların yemeklerde kullanılmasıyla.	Gübre Lif Boya Kozmetik

b. Üretim Şekli

Isırgan otu tarla tesisi tohumla veya fide yetiştirerek yapılmaktadır. *U. dioica* ayrıca stolonlar ve tepe sürgünlerinin köklendirilmesi ile vejetatif olarak da çoğaltılabilmektedir. Fide ile üretimde ise öncelikle hazırlanmış olan fide yastıklarında fidelerin yetiştirilmesi gereklidir. Isırgan otu bitkisi için nisan-haziran ve eylül-ekim dönemleri olmak üzere 2 farklı zamanda tarla tesisi yapılabilir. Ancak, eylül dönemi

tarla tesisi sıcak bölgeler için önerilebilir, aksi takdirde genç bitkiler kıştan zarar görür. Tohumların çıkışı 10-15 gün civarında bir süre aldığı için yapılacak fideliğin 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 ile lif üretimi amaçlanıyor ise 75 cm aralıklarla tarlaya yerleştirilmelidir. *U. dioica* 1,5 m ve bazı araştırmacılara göre 2-4 m boylanabilir (Ayan ve ark., 2006).

1.6. Antioksidanlar ve Isırgan Otu Antioksidanları

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlardan dolayı oldukça reaktiftirler. Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu normal metabolik olaylar esnasında meydana gelebildiği gibi organizmanın çeşitli dış etkenlere maruz kalmasıyla da meydana gelebilir. Serbest radikal hasarları, hücreyi oluşturan organellerle ve bu organellerin supromoleküler yapılarının içerdiği moleküler bileşiklerle ilişkilidir. Bu yapı ve organeller mitokondriler, lizozomlar, peroksizomlar, nukleus, endoplazmik retikulum ve plazmam membranıdır. Bunların tamamı membranlı yapılardır ve hücrenin metabolik fonksiyonları için gerekli elemanlarıdır (Çöllü, 2007).

Normal metabolik reaksiyonlar sırasında, serbest radikallerin endojen olarak ortaya çıkmaları nedeniyle, tüm aerobik organizmalar doku hasarından korunmak için antioksidant savunma mekanizmalarını geliştirmişlerdir. Antioksidantlar, okside edilebilir substrata oranla daha düşük konsantrasyonlarda bile, substratın oksidasyonunu geciktiren, engelleyen maddelerdir (Cao ve Prior, 1999). Fizyolojik koşullarda, organizmada oksidant etkenler ve antioksidant mekanizmalar bir denge halinde bulunmaktadır (Yavuz, 2002).

Isırgan otunda tespit edilen bazı antioksidanların, geleneksel tedavide önemli etki mekanizmalarına sahip olmasının nedeni olarak düşünülmektedir (Gülçin, 2004). Yapılan çalışmalarda ısırgan otunda tespit edilen bazı antioksidan maddeler; vitamin E (Tütem, 1997), vitamin C (Apak, 2004; Güçlü, 2005), kateşin, ferulik asit, riboflavin, niasin (<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/farmacy2.pl>; Yıldız, 2008) ve proteinler (Sözgen, 2006) dir.

1.7. Fenolik Bileşikler ve Isırgan Otu Fenolik Bileşikleri

Fenolik bileşikler meyve ve sebzelerin kendilerine has renk, tat, aroma ve dokuya sahip olmalarını sağlayan bileşiklerdir. Bitki bünyesinde meydana gelen birçok metabolik olayda önemli roller üstlenmektedirler (Gao ve Mazza, 1995). Bitkiler üzerinde sahip oldukları özelliklerinin yanında, insan sağlığı üzerinde son derece önemli olan serbest radikalleri bağlama yeteneğine de sahiptir (Visioli ve Galli, 1998; Cetinus, 2005).

Fenolik bileşiklerin, kardiovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkilerinin bulunduğu (Keevil ve ark., 2000; Serafini ve ark., 2000; Cul ve ark., 2002) antimitojen, antikanserijen (Bell ve ark., 2000; Agarwal ve ark., 2003; Sanchez, 2006) ve antimikrobiyal (Nychas ve ark., 2003) özelliklere sahip olduğu da yapılan pek çok araştırma ile tespit edilmiştir. Yıldız ve arkadaşlarının 2008'de yaptığı çalışmaya göre; gallik asit, klorojenik asit, rosmarinik asit, kaempferol, mirisetin, kuersetin, hesperidin gibi fenolik bileşiklerin varlığı tespit edilmiştir.

1.7.1. Flavonoidler

Flavonoidler; doğal olarak bulunan fenollerin en büyük gruplarından birini oluşturmaktadır. Önemli antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip, düşük molekül ağırlıklı ve en geniş bitki fenolikleri sınıfıdır. Ayrıca sahip oldukları biyolojik etkinliklerinden dolayı bitkilerin sekonder metabolitleri arasında en önemli bileşik sınıflarından birisini oluşturmaktadır (Işık, 2005).

Doğada, birçoğu yaprak, çiçek ve kökte bulunan 4000'den fazla flavonoid çeşidi vardır. Çeşitli meyve ve sebzede bol miktarda bulunurlar (Karaman, 2008). İnsan ve hayvanlarda mide-bağırsak sisteminden emilirler veya değişmeden ya da metabolitleri halinde idrar ve dışkı ile atılırlar (Cook ve Samman, 1996). Flavonoidlerin en yaygın sınıfı flavonollerdir ve en önemli bileşikler kuersetin, kuersetin glikoziti rutin, kamferol, mirisetin, izoramnetindir. Kuersetin bitkilerin en temel flavonollerindendir (Karaman, 2008).

1.7.2. Fenolik Asitler

Bitkilerde yüksek miktarda bulunan fenolik asitler, hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitleri içeren iki gruptan oluşur (Cadenas ve Packer, 2002).

Hidroksisinnamik asitler, fenil-propanoid türevleridir ve genellikle bitkisel gıdalarda bulunur (Abu-Amsha, 1996). Hidroksi sinamik asitler, bitkilerin fenolik metabolizmalarında merkezi rol oynayan ve fenil alaninin biyosentetik türevi olan fenolik bileşenlerdir. Bu bileşikler aynı zamanda flavonoidlerin öncüsüdür ve bitkilerde hücre duvarının yapısına katılırlar (Heler ve Forkman, 1993). Genellikle bu tür fenolik asitler bitkilerde esterleri halinde veya şekerlerle, organik asitlerle veya yağlarla birleşmiş halde bulunurlar.

Hidroksi benzoik asitler, yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Monohidroksibenzoatlar etkili hidroksil radikal süpürücülerdir Dihidroksi benzoik asit türevlerinin antioksidan aktiviteleri hidroksil gruplarının pozisyonlarına bağlıdır (Karaman, 2008).

1.7.3. Fenolik Polimerler (Tanenler)

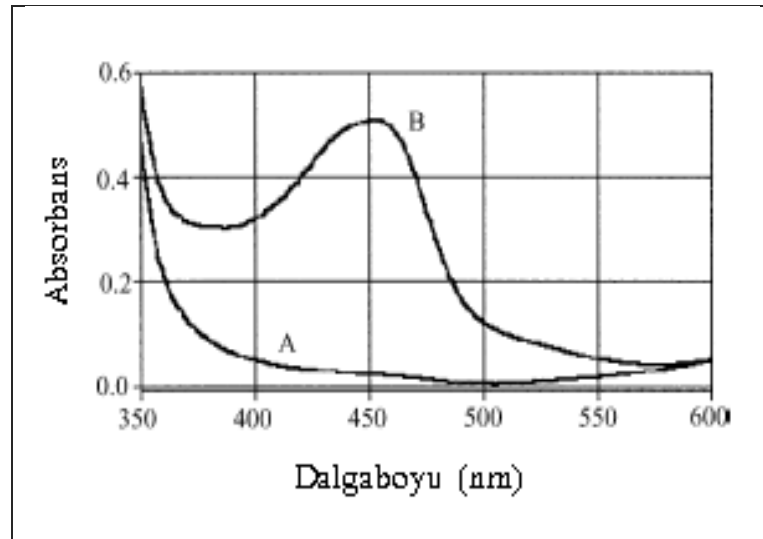
Fenolik polimerler, yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Koyu renkli ve tadı buruk bileşiklerdir (Cadenas, 2002). Polimerik yapıdaki yüksek molekül tartısına sahip tanenler kondanse ve hidrolizlenebilir olmak üzere iki alt sınıfa ayrılır. Kondanse tanenler polimerik flavonoidlerdir. Hidrolizlenebilir tanenler, gallik asit ve benzer bileşiklerin karbonhidratlara esterlenmiş yapılarıdır (Yıldız, 2008).

1.8. Elektron Aktarımına Dayalı Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

1.8.1. CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity; Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi

Hem hidrofilik hem de lipofilik maddeler için elverişli, basit, ucuz, pratik, seçici ve duyarlı bir antioksidan kapasite tayin yöntemidir.

CUPRAC yönteminde reaktif, amonyum asetat tampon ortamında iyi bir yükseltgen olan bakır (II)-neokuproin çözeltisidir. Reaktifin indirgenmesiyle oluşan Cu (I)-neokuproin kelatının 450 nm dalgaboyundaki absorbansı okunmaktadır. Bu yöntemde, toplam antioksidan kapasite, bakır (II) iyonu indirgeme kapasitesi cinsinden ölçüldüğünden dünya literatürüne CUPRAC adıyla kazandırılmıştır. Toplam antioksidan kapasite/aktivite tayininde kullanılan bu spektrofotometrik yöntem; bakır (II) klorür çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek herhangi bir antioksidan çözeltisi ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda referansa karşı 450 nm’de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir (Apak, 2004) (Şekil 1.15).



Şekil 1.15 : (A) Cu (II)-Nc, (B) Cu (I)-Nc komplekslerinin spektrumları.

Bitki örneklerinin CUPRAC yöntemiyle toplam antioksidan kapasiteleri Troloks eşdeğeri olarak hesaplanır. Troloks için doğru denklemi (kalibrasyon denklemi) aşağıdaki gibidir.

$$y = \epsilon_{\text{CUPRAC}} x + 0,0048 \quad (R^2=0,9994)$$

Tüm hesaplamalarda Troloks için ϵ_{CUPRAC} (molar absorblama katsayısı) değeri $1,62 \times 10^4$ kullanılmıştır.

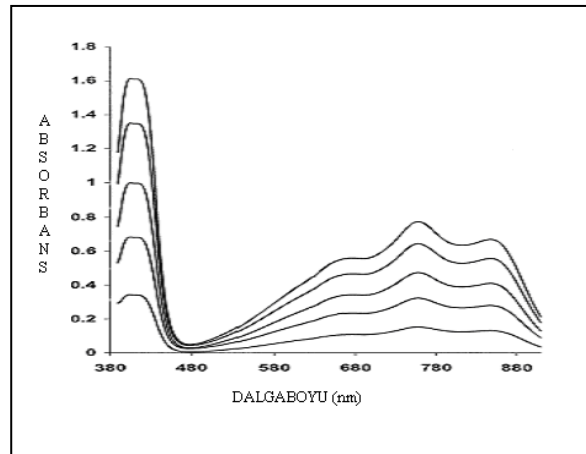
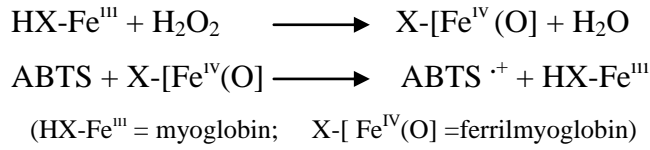
1.8.2. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi)/ABTS Yöntemi

Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi olarak ifade edilen TEAC/ABTS yöntemi, ilk olarak Miller ve ark. (Miller, 1993) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem; 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) kromojen radikal kationunun absorpsiyonunun hidrojen verici antioksidanlar tarafından inhibe edilmesine dayanan bir metoddur. 730 nm'de ölçülen absorpsiyondan (Şekil 1.16) yararlanılarak toplam antioksidan kapasitesi troloks cinsinden bulunur. Bu nedenle bu yönteme "troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi" (ABTS/TEAC) adı da verilir. Troloks için doğru denklemi (kalibrasyon denklemi) aşağıdaki gibidir.

$$y = \epsilon_{ABTS} x - 0,0322 \quad (R^2=0,9998)$$

Tüm hesaplamalarda Troloks için ϵ_{ABTS} (molar absorblama katsayısı) değeri $2,75 \times 10^4$ kullanılmıştır.

ABTS \cdot^+ kation radikalini oluşturmak için, ABTS; myoglobin ve H_2O_2 ile inkübe edilir (Girotti, 2002).



Şekil 1.16 : ABTS \cdot^+ radikal kationunun absorpsiyon spektrumu

1.9. Toplam Fenolik Madde Tayini Yöntemi

1.9.1. Folin-Ciocalteu Yöntemi

Bu yöntem antioksidanların toplam fenolik içeriğini ölçmek için geliştirilmiştir (Singleton ve Rossi, 1965; Singleton ve ark., 1999). Yöntemde kullanılan CuSO_4 (bakır (II) sülfat) alkali ortamda protein veya antioksidan ile kompleks yapar. Folin fenol reaktifi (fosfo molibdik fosfotungstik asit) eklendiğinde, folin reaktifi proteine bağlanır. Protein veya antioksidanla Cu (II)'nin reaksiyonundan açığa çıkan Cu (I) olasılıkla molibdatotungstat ayıracını heteropoli mavisine indirger ve rengi sarıdan maviye dönüşür. Reaksiyon tamamlandıca 750 nm'de örnek absorbansları ölçülür. Bitki örneklerinin toplam fenolik içerikleri gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanır. Gallik asit için doğru denklemi (kalibrasyon denklemi) aşağıdaki gibidir.

$$y = \epsilon_{\text{Folin-Ciocalteu}} - 0,0545 (R^2 = 0,9979)$$

Tüm hesaplamalarda Gallik asit için $\epsilon_{\text{Folin-Ciocalteu}}$ (molar absorblama katsayısı) değeri $3,25 \times 10^3$ kullanılmıştır.

1.10. Bitkilerde Kullanılan Belirteçler

Belirteçler, kalıtımsal modelleri morfolojik, biyokimyasal veya DNA seviyesinde izleyebildiğimiz "karakter"lerdir. Bu karakterler doğrudan olmamasına rağmen, bir organizmadaki ilgilenilen diğer özelliklerin genetikleri hakkında bilgi sağlamalarından dolayı belirteç diye adlandırılırlar. Genel olarak belirteçleri; morfolojik ve moleküler belirteçler olmak üzere iki ana grupta toplamak mümkündür (Doğaç, 2008).

1.10.1. Morfolojik Belirteçler

Klasik morfolojik belirteçler, genotipik tanımlama amacıyla kullanılabilir. Morfolojik belirteçler, kolay elde edilebilmeleri ve bazı durumlarda kullanımları mutlak gerekli olmasına rağmen, çevresel faktörlerden etkilenebilmekte ve yanlış kararlara yol açabilmektedirler. Fenotipik özelliklerin genetik kontrol mekanizmasının tam bilinmemesi, yetersiz varyasyon ve aranan fenotipik özelliklerin, uygun büyüme aşamasında ortaya çıkışının uzun zaman alması,

bitki ıslahçılarını daha hızlı ve doğru karar vermekte yardımcı olan, belirteç sistemlerine yönelten diğer sınırlayıcı etkenlerdir (Doğaç, 2008).

1.10.2. Moleküler Belirteçler

Protein ya da DNA'da bulunan polimorfizme dayanan moleküler belirteçler'in geliştirilmesi; taksonomi, filogeni, ekoloji, genetik ve bitki ıslahı araştırmalarını büyük oranda kolaylaştırmıştır (Weissing, 1995).

Populasyonların karakterizasyonu ve taksonomisinde kullanılan birçok moleküler yöntem vardır. Protein elektroforezi, DNA Parmak İzi Metodu, Rastgele Amplifiye Olmuş Polimorfik DNA (RAPD), Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Amplifiye Olmuş Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), DNA dizi analizi, Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR) bunlardan bazılarıdır (Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008; Ergüden, 2007).

DNA belirteçleri stabildirler, tüm dokularda ortaya çıkabilirler, ekolojik koşullardan etkilenmezler. Bütün bir genomun analiz edilebileceği DNA'yı elde etmek için az miktarda bitki dokusu yeterli olmaktadır. Bitkiden alınan herhangi bir kısım DNA izolasyonu için kullanılabilir (Botstein ve ark., 1980).

Tüm yüksek yapılı organizmaların (ökaryotlar) genomlarındaki bir veya daha fazla özelliğin karakterizasyonu DNA bantlarının ortaya koyulması ile olur. Farklı büyüklükte ve farklı sayıdaki DNA bantlarının analizi her birey için özeldir. Bu bantların ortaya koyulması ile her birey için DNA parmak izi elde edilmiş olur. DNA profillerinin çıkarılması ve spesifik DNA parmak izlerinin elde edilmesindeki basamaklar şu şekilde sıralanabilir;

- Bitkisel materyalin temini,
- Bitkisel materyalden DNA izolasyonu,
- Kullanılacak yönteme göre, genetik materyalin çoğaltılması (PCR),
- Bireyler arasındaki polimorfizimin farklı DNA belirteç teknikleri (RAPD),
- DNA bant profillerinin spesifik bir programda analiz edilmesi. (Doğaç 2008).

Doğadaki yabani tür ve varyetelerin toplanması ve moleküler düzeyde tanımlanması ekonomik değeri olan çeşitlere yeni ve üstün özellikler kazandırılması açısından önemlidir (Bothmer ve ark., 1991).

1.10.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Uygulamaları

PCR, genomik DNA dizisi bilinen veya dizisi henüz tespit edilmemiş olarak klonlanan yabancı DNA'nın çoğaltılmasını (amplifikasyonu) ve bunun dizi analizini tespit etmeye yarayan önemli bir tekniktir. Günümüzde oldukça önem arz eden insan genom projesi bu teknik sayesinde yapılmıştır (Dilsiz, 2004). PCR'ın önemli yönü özel bir DNA dizisini seçip çoğaltarak istenmeyen dizilerin ortaya çıkmasını önlemesidir. Bu özellik sadece dizinin tanınmasını kolaylaştırmakla kalmaz, ek olarak DNA'nın analiz edilmesini de sağlar (Saiki ve ark. 1985; Dilsiz, 2004).

PCR'ın temeli; DNA denatürasyonu, primerlerin birleşmesi ve DNA polimerizasyonu ilkelerine dayanır. Çoğaltılması istenen DNA bölgesinin her iki ucunda belli sayıda diziyi tanıyan ve DNA'nın her iki zincirini de tamamlayıcı olan bir başlatıcı oligonükleotid (primer) çifti zıt ve birbirleriyle çakışan yönlerde ilerleyen DNA sentezinin çok sayıda döngüde gerçekleştirilmesinde kullanılır. Her döngüde çift sarmallı DNA, iki yeni çift sarmallı molekülün yapılmasını sağlar. Bu da teorik olarak her döngüde DNA dizilerinin sayısal olarak ikiye katlanmasına yol açar (Kumar, 1989).

Uygun primer seçimi PCR'ın başarısını etkileyen en önemli faktördür. Genellikle 15-30 baz uzunluğunda sentetik oligonükleotidler kullanılır. İdeal bir primerde G-C oranı %50 olmalı, amplifiye edilecek kalıba özellikle 3' ucuna uymalıdır. İki primer hemen hemen aynı erime özelliklerine sahip olmalıdır (Çulcu, 2007).

PCR üç aşamada gerçekleşmektedir.

1. DNA ipliklerinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon),
2. Primerlerin bağlanması (annealing),
3. Primerlerin uzaması (extension).

DNA ipliklerinin birbirinden ayrılması (denatürasyon) aşamasında, sıcaklık ile çoğaltılmak istenen DNA çift iplikten tek ipliğe dönüşür. Yüksek ısıda sarmalları bir arada tutan hidrojen bağlarının ayrılması için DNA denatüre edilir. Primerlerin birleşmesi (annealing) aşamasında DNA için spesifik olan ve primer adı verilen oligonükleotid, ilk evrede elde edilen DNA tek sarmalı üzerinde kendisine tamamlayıcı olan nükleotid dizisi ile birleşir. Primerler hedef DNA'nın amplifikasyonunu başlatmak için kullanılır. Bu sebeple primer (öncü) olarak adlandırılır. Primerin bağlanması

sırasında ısı 40-60 °C ye düşürülür. Primerlerin bağlanması için gereken ısı ve süre amplifikasyon primerlerinin yoğunlaşma ve uzunluklarına bağlıdır.

Primerlerin uzaması (extension) aşamasında tamamlayıcı diziyle birleşen primer hibritleştiği sarmalın karşılığını sentezler. Bu sentez için termostabil özelliği olan *Thermus aquaticus* adlı bakteriden elde edilen *Taq* polimeraz enzimi kullanılır (Erlich ve ark., 1991; Çulcu, 2007). *Taq* DNA polimeraz enziminin aktivitesi için ortamda serbest magnezyum iyonlarına ihtiyaç vardır (Dilsiz, 2004).

PCR tekniğinde bu üç temel aşama bir döngüyü oluşturur ve bu döngü 30-45 defa tekrarlanır. Bu döngülerin sonunda elde edilen PCR ürünlerinin tanımlanmasında agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılır (Şekil 1.17). Bu yöntemde elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak ultraviyole ışık kaynağında görünür hale getirilir (Çulcu, 2007).

PCR ile saç teli, sperm ve değişik dokulardan elde edilen az sayıdaki hücreden DNA amplifikasyonu yapılabilmektedir. Zarar görmüş, kırılmış DNA kalıbından DNA elde edilmesinde, genetik haritaların oluşturulmasında, kalıtsal hastalıkların birçoğunun teşhisi ve patojen organizmaların DNA'larının teşhisinde PCR tekniği başarıyla uygulanmaktadır (Çulcu, 2007).

1.10.2.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA- Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) ve Uygulama Alanları

RAPD, 1990 yılında geliştirilmiş olup, rastgele seçilmiş kısa oligonükleotid primerler kullanılarak çoğaltımının yapılması ve çoğaltım ürünlerinin jel elektroforezi ile ayrılması esasına dayanır (Welsh ve Mc Clelland, 1990; Williams ve ark., 1990). RAPD yönteminin temel tekniği, yüksek saflıkta DNA elde ettikten sonra kısa uzunluktaki (6-10 baz) primerleri ekleyerek PCR yapmayı ve son olarak ürünleri jel elektroforeziyle elektriksel alanda yürüterek UV altında ortaya çıkan farklılığı gözlemlemektir (Arif ve ark., 2010) (Şekil 1.17).

RAPD yöntemi PCR yöntemi baz alınarak geliştirilmiştir (Atienzar, 2006; Vural ve Dağeri, 2009). RAPD sonrası elde edilen sonuçlar her deneyde değişen bağlanma noktaları (Budak ve ark., 2004), ekipman ve kişi farklılıkları nedeniyle her defasında aynı sonucu vermemektedir (Arif ve ark., 2010). RAPD çalışmaların da kullanılan

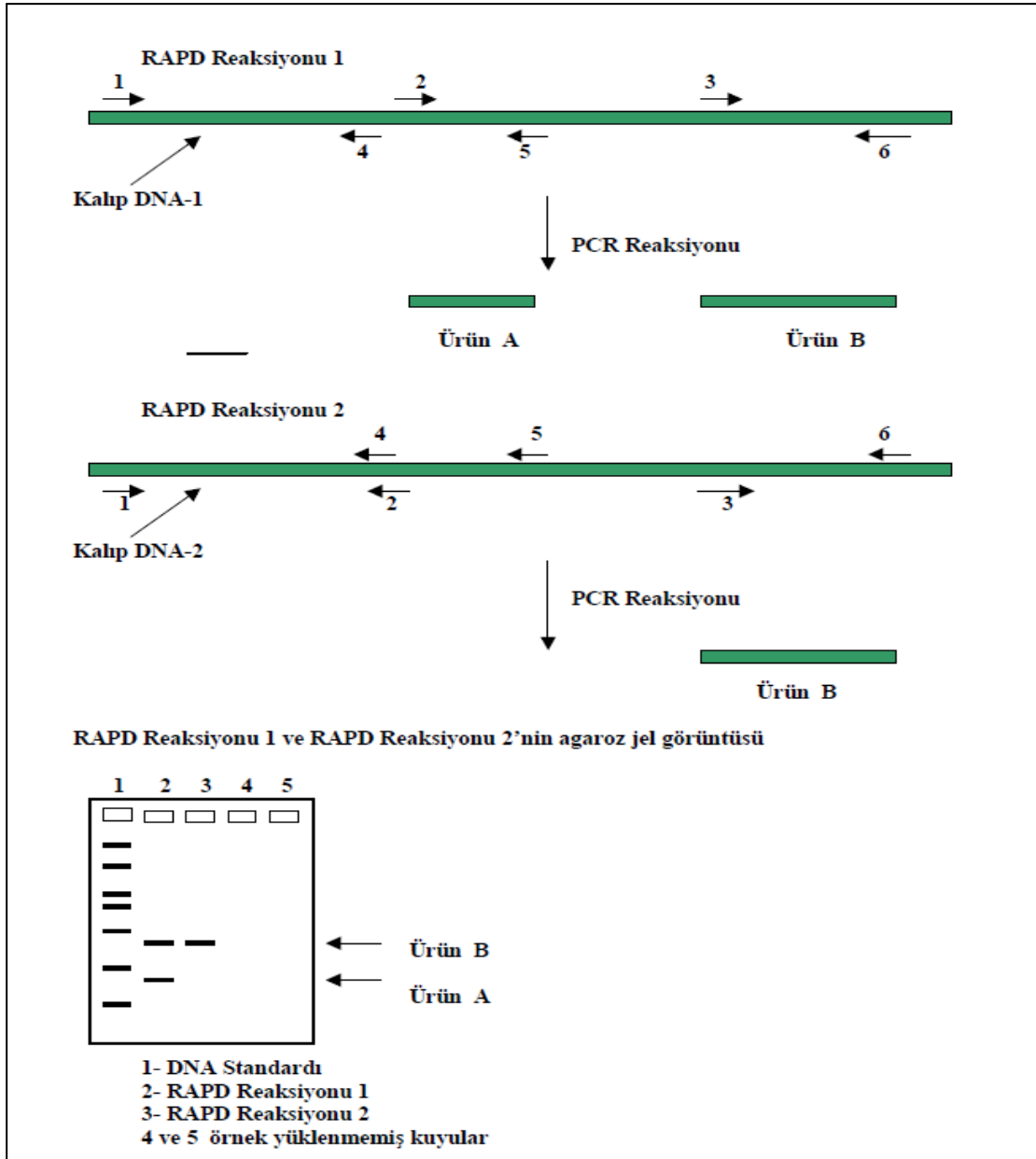
primerler genellikle on baz uzunluğunda olmakla beraber, daha uzun ya da daha kısa olan primerler de çalışmalarda kullanılabilir. Böylece daha kısa primerlerin kullanımıyla daha yüksek oranda polimorfizm belirlenebilirken, daha uzun primerlerden de çeşitli haritalama ve parmak izi analizlerinde yararlanılabilir (Kavaklı, 2006; Yesbek, 2007). Ayrıca primerlerin çok değişik DNA bölgelerine bağlanma olasılığını arttırmak için daha düşük sıcaklık dereceleri (34-36 °C) kullanılmaktadır (Williams ve ark., 1990).

RAPD-PCR sonrası elde edilen monomorfik bantlar türe özgü bantlar olarak düşünülmektedir. Her tür içinde, bu türe özgü bantlar homozigot bölgeler ya da alanları temsil eder (Zhou ve ark., 2005). Taksonomik karışıklığa sahip olan bazı türlerin (safran gibi) kültür ve koruma stratejileri, polimorfik ya da monomorfik olduğunun belirlenmesi RAPD ile mümkün olabilmektedir (Rubio-Moraga ve ark., 2009). Bazı genlerin tanımı için, gen grupları yada genomları bulunmalı ve bireyler arası değişmeyen bölgeler ile olan benzerlikleri ortaya çıkarılmalıdır (Altukhov ve ark., 2000).

RAPD yöntemi yaygın olarak genetik çeşitlilik araştırmalarında polimorfizmin belirlenmesinde, soy ağacı çıkarılmasında (akrabalık ilişkilerinde), genetik haritalamada, genotipik farklılaşma, moleküler taksonomi, zararlı genlerin belirlenmesinde ve cinsiyet markeri gibi çeşitli uygulamalarda özellikle farklı topluluklar arasında ve hatta aynı organizmanın farklı doku, organ ve kısımları arasında farklılaşma ve farklılaşma kapasitesi için kullanılmaktadır (Atienzar, 2006; Bharmauria ve ark., 2009; Uzonur ve ark., 2004; Alpsoy ve ark., 2010; Kekeç ve ark., 2010).

RAPD ile yapılan çalışmalarda genomik kararsızlığa sahip kanser hücrelerini bulma ile ilgili çalışmalarda yararlı olduğu ortaya çıkmıştır (Atienzar, 2006). Bunların yanında, genetik haritaların oluşturulması, tohumların test edilmesi, varyasyon/tür tanımlanması, marker yardımcı seçilim ve bitki ıslahı çalışmaları kullanım alanlarından bazılarıdır (Yesbek, 2007).

Ekotoksikolojik çalışmalarda RAPD değişkenleriyle yapılan farklı PCR sonuçlarında ortaya çıkan bantların fazla/az oluşu ile toksikolojik değerlendirmeler yapılabilmektedir (Atienzar, 2006).



Şekil 1. 17 : RAPD-PCR reaksiyonunun şematik gösterimi

RAPD-1, RAPD-2 reaksiyonları bir tane primer ve iki tane farklı kalıp DNA kullanılmıştır.

- Oklar reaksiyona katılmış olan aynı diziye sahip primerin kopyalarıdır
- Okların yönü DNA sentez yönünü belirlemektedir
- Sayılar kalıp DNA'da primerlerin bağlanma bölgelerini göstermektedir

1.RAPD reaksiyonunda 2 ve 5 pozisyonlarına bağlanan primerler arasındaki DNA dizisinin çoğaltılmasıyla ürün A, 3 ve 6 pozisyonlarına bağlanan primerler arasındaki DNA dizisinin çoğaltılmasıyla ürün B oluşmaktadır.

2.RAPD reaksiyonunda sadece 3 ve 6 pozisyonları arasındaki bölgedeki DNA dizisinin çoğaltılmasıyla ürün B oluşmaktadır.

Reaksiyon 1 ve reaksiyon 2'ye eklenen primerlerin tümünden PCR sonucu bant elde edilemez. Elde edilebilen bantlar agaroz jelde görüntülenmektedir.

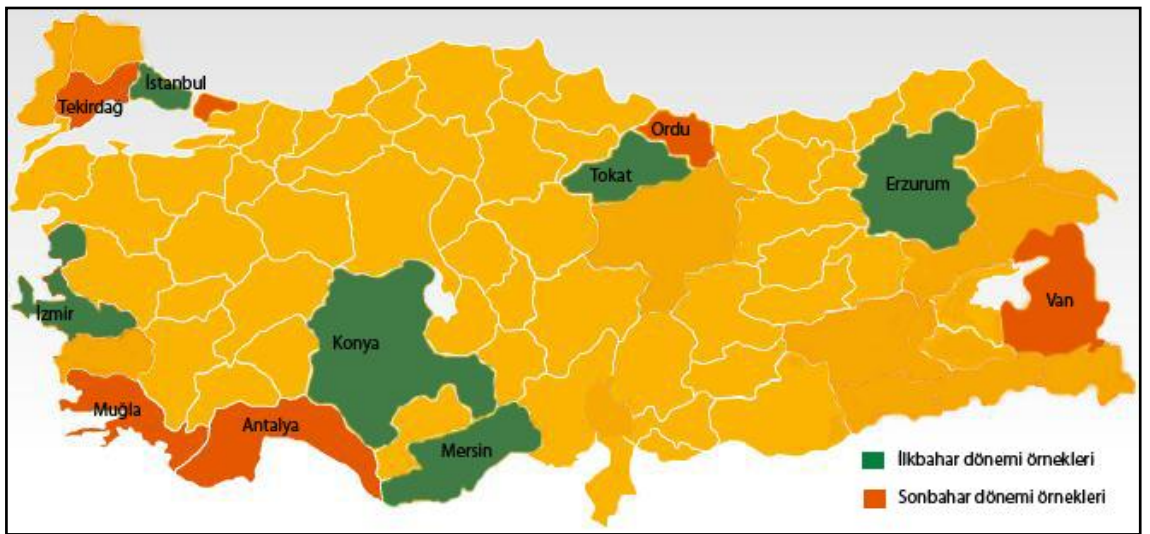
BÖLÜM 2

MATERYAL ve METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Bitki Örnekleri

Urtica dioica bitkisi ile çalışılmıştır. Yılda iki defa (ilkbahar- sonbahar) çiçek açması tedavi amaçlı kullanımda her dönemde elde edilmesini kolaylaştırmaktadır. Şekil 2.1’de bu dönemlerde toplanan ısırgan otunun alındığı şehirler ve toplama zamanı gösterilmiştir. Örneklerin toplanması ve ulaşımı sırasında zarar görme oranı en aza indirilecek şekilde muhafaza edilmiştir. Laboratuara ulaştıktan sonra deneylerin yapılacağı süreye kadar içeriğinin bozulmaması için gerekli ısı derecesi olan -30 °C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.1 : Türkiye'nin farklı şehirlerinden ve farklı dönemlerde alınan *U. dioica* örnekleri.

2.1.2. Cihazlar

Termal Döngü Cihazı :	TECHNE TC-512(UK)
Santrifüj :	Hettich, Mikro 22
Derin Dondurucu :	BEKO
Buzdolabı :	Philips, (+4°C, -20°C), Sanyo MDF-U332 (-30 °C)
Elektroforez :	Mupid-One
Transluminatör:	Bio-Rad GelDoc 2000
Vorteks :	IKA LABORTECHNIK
Hassas Terazı:	Sartorius, Scaltec SPB 54
Pipetler :	Thermo, Electron Corporation CH57666-4500
Pipet Uçları :	Neptune BT brand barrier tips
Spektrofotometreler:	UNICAM Helios α
Florometre :	Qubit™ Florometer
Su banyosu:	GFL
Isıtıcı :	WiseStir Wisd Laboratory Instruments MSH- 20A
Ultrasonik banyo :	Sonamak Ultrasonic Cleaner
Homojenizatör :	IKA LABORTCHNIK Ultra Turrax T 25 basic

2.1.3. Kullanılan Kimyasallar

2.1.3.1. Bitki Su İnfüzyonları ve Metanol Ekstraktlarının Hazırlanması

Metanol ve su ile hazırlanan ısırgan otu ekstraktları için % 70'lik metanol ve distile su kullanılmıştır.

2.1.3.2. Kimyasal Analiz Çözeltilerinin Hazırlanması

Toplam antioksidan kapasite ölçülmesini sağlayan CUPRAC yönteminde, ; $1,0 \times 10^{-2}$ M bakır (II) klorür ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi ve 1 M amonyum asetat tampon (pH 7.0) çözeltisi (NH_4Ac) distile suda, $7,5 \times 10^{-3}$ M Neokuproin çözeltisi % 96'lık etanol (EtOH) ile hazırlanmıştır.

Toplam antioksidan kapasite ölçülmesini sağlayan diğer bir yöntem olan ABTS'de; $4,0 \times 10^{-3}$ M ABTS (2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat]) çözeltisi

distile suda, $1,2 \times 10^{-4}$ M hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisi % 96'lık etanolde (EtOH), $2,4 \times 10^{-5}$ M HRP (Horseradish peroksidaz) çözeltisi etanol ve distile su karışımında (1:1) hazırlanmıştır.

Toplam fenolik içerik belirlenmesinde kullanılan yöntem olan Folin Ciocalteu yönteminde % 2'lik Na_2CO_3 , 0,1 M NaOH, % 0,5 $CuSO_4$, % 1 $NaKC_4H_4O_6$ (Sodyum potasyum tartarat), distile su ile hazırlanmıştır. % 2'lik Na_2CO_3 ile 0,1 M NaOH karıştırılarak Lowry A çözeltisi, % 0,5 $CuSO_4$ ile % 1'lik $NaKC_4H_4O_6$ karıştırılarak Lowry B çözeltisi hazırlanır. 50 ml Lowry A ile 1 ml Lowry B çözeltilerinin karıştırılmasıyla da Lowry C çözeltisi hazırlanmış olur. Folin Ciocalteu çözeltisi ise distile su ile 1:3 oranında seyreltilmiş olarak kullanılır.

2.1.3.3. DNA İzolasyon Kimyasalları

DNA izolasyonu için Macherey-Nagel marka NucleoSpin® Plant II Kit kullanılmış, hücre yıkımı aşamasında PL1 buffer kullanılan protokole göre izolasyon yapılmıştır.

2.1.3.4. Florometre Kimyasalları

Qubit Florometre cihazında DNA konsantrasyon ölçümleri için 2-1000 ng arası DNA miktarını ölçmek için kullanılan Quant-IT dsDNA BR Assay Kit içerisindeki kimyasallar Quant-iT™ tampon çözelti, Quant-IT™ ayıraç (reagent) ve çalışma solüsyonudur.

2.1.3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonlarında Kullanılan Kimyasallar

i. Fermentas DreamTaq™ PCR Mastermix (2X)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu için gerekli DNA Polimeraz enzimi (hot start), tampon çözelti, $MgCl_2$ ve dNTP'leri içeren formülasyona sahip solüsyondur.

ii. FINNZYMES Phire® Bitki Doğrudan PCR Kiti Kimyasalları

Bitki dokularından doğrudan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yapılabilmesi hedeflenerek dizayn edilmiştir. Tek prosedür ve uygulama ile DNA purifikasyonu yapmadan PCR ile DNA amplifikasyonu yapılmasını sağlar. Kit içeriğindeki kimyasallar Phire® DNA polimeraz (Hot start), 2X Phire® Bitki PCR Tampon Çözeltisi (dNTP ve $MgCl_2$) ve Dilüsyon Tampon Çözeltisidir.

iii. Moleküler Tayinde Kullanılan Primerler

Çalışmamızda moleküler tür tayinine yönelik tür tespiti yapabilecek primerler online veritaban ve programları kullanılarak kullanılarak dizayn edilmiştir. NCBI, Primer 3 ve Oligo Analyzer programları kullanılarak dizayn edilen *Urtica dioica* primer seti Tablo 2.1'deki gibidir. Dizileri Tablo 2.1 ve Tablo 2.2'deki gibi verilen tüm primerler Alpha DNA (Kanada) firması tarafından sentezlenmiştir.

Tablo 2.1 : Dizayn edilen *Urtica dioica* primeri.

Gen Bölgesi	Uzunluk	Primer	Sekans	Tm (°C)
<i>Urtica dioica</i> isolectin VII precursor (chia5.7.2) gene, exon 3	463 bç	Right Primer	5' GCATGTCGCAGTACCTCTTG 3'	57
		Left Primer	5' GCCTTGTGGTTCTGGATGTC 3'	57

iv. Oligonükleotid Primerleri

RAPD- PCR yöntemi için kullanılan 10 bç uzunluğundaki primerler aşağıdaki gibidir.

Tablo 2.2 : Oligonükleotid primerler.

Primer Adı	Dizisi	Primer Adı	Dizisi
OPA-08	5'-GTGACGTAGG-3'	OPB-08	5'-GTCCACACGG-3'
OPA-09	5'-GGGTAACGCC-3'	OPB-10	5'-CTGCTGGGAC-3'
OPA-14	5'-TCTGTGCTGG-3'	OPB-11	5'-GTAGACCCGT-3'
OPA-18	5'-AGGTGACCGT-3'	OPB-12	5'-CCTTGACGCA-3'
OPB-01	5'-GTTTCGCTCC-3'	OPB-14	5'-TCCGCTCTGG-3'
OPB-05	5'-TGCGCCCTTC-3'	OPB-17	5'-AGGGAACGAG-3'
OPB-06	5'-TGCTCTGCCC-3'	OPB-18	5'-CCACAGCAGT-3'
OPB-07	5'-GGTGACGCAG-3'		

2.1.3.6. Agaroz Jel Elektrofrez Kimyasalları

i. Agaroz

Sigma marka agaroz kullanılmıştır. 80 ml için 1,6 g agaroz kullanılmıştır.

ii. 10X TBE Tampon Çözeltisi

Her litre için 108 g Tris base, 55 g Borik Asit, 40 ml 0.5M EDTA (pH 8.0)

iii. 6X Yükleme Boyası

0.5 mM Tris-HCl (pH 7.6), % 0.03 bromofenol mavi, % 0.03 xylene cyanol FF,
% 60 gliserol, 1 mM EDTA.

iv. GeneRuler™ 100 bp DNA Ölçü Standardı

100- 1000 bç ölçü aralığında (100 µl, 0.5 µg/µl), 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA.

v. SafeView™ DNA Boyası

SafeView™, agaroz jel görüntüleme ssDNA (tek zincirli DNA), dsDNA (çift zincirli DNA) ve RNA tespit etmeye yarayan yeni ve güvenli nükleik asit boyasıdır. Etidyumbromür (EtBr) yerine kullanılacak, karsinojenik olmayan, daha hassas yeni bir görüntüleme boyasıdır. SafeView™ agaroz jel görüntüleme bağlandığı nükleik asitten (ssDNA, dsDNA, RNA) yeşil floresan ışık yayılmasını sağlar.

2.2. METOD

2.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması

Isırgan otu Dünya’da geniş yayılım gösteren ve ülkemizde de her bölgede yetişebilen bir bitkidir. Çalışmamızda ısırgan otunun ilkbahar ve sonbahar olmak üzere çiçek açtığı her iki dönemde toplanan örnekleriyle çalışılmıştır. Toplanan örnekler Tablo 2.3’de belirtildiği şekliyle yeniden isimlendirilmiş ve numaralandırılmıştır.

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan ısırgan otu örneklerinin kısaltma, toplandıkları iller, toplanan bitki kısımları ve hangi mevsimde toplandıklarının bilgileri.

Kodlamalar	Şehir	Bitki Kısım	Toplanan Mevsim
UD-1	Antalya	Yaprak, Gövde	Sonbahar
UD-2	Van	Yaprak, Gövde	Sonbahar
UD-3	Muğla	Yaprak, Gövde, Kök	Sonbahar
UD-4	İstanbul (Anadolu)	Yaprak, Gövde	Sonbahar
UD-5	Ordu	Yaprak, Gövde, Kök	Sonbahar
UD-6	Tekirdağ	Yaprak, Gövde	Sonbahar
UD-7	Erzurum	Yaprak, Gövde, Kök	İlkbahar
UD-8	Mersin	Yaprak, Gövde, Kök	İlkbahar
UD-9	Tokat	Yaprak, Gövde, Kök	İlkbahar
UD-10	İstanbul (Avrupa)	Yaprak, Gövde	İlkbahar
UD-11	İzmir	Yaprak, Gövde, Kök	İlkbahar
UD-12	Konya	Yaprak, Gövde, Kök	İlkbahar

2.2.2. Isırgan Otu Örneklerinin Su İnfüzyonu ve Metanol Ekstraksiyonu

Isırgan otu yaprakları için yapılan metanol ekstraktında %70'lik 10 ml metanol içerisine 1 g parçalara ayrılmış ısırgan otu yaprakları eklenir. Ultrasonik banyoda ağızları kapalı cam erlenler içinde 1 saat süren ilk aşamanın ardından ekstraksiyon sıvısı alınarak erlende kalan ısırgan otu üzerine 10 ml metanol eklenir ve 45 dakika daha ultrasonik banyoda ekstraksiyon yapılır. Ekstraksiyon sıvısı tekrar alınarak ısırgan otu üzerine son olarak 5 ml daha %70'lik metanol eklenip 15 dakika inkübasyonu yapıldıktan sonra süzülür ve tüm ekstraksiyon sıvıları bir araya getirilir.

İnfüzyon için, 1 g tartılıp küçük parçalara ayrılan ısırgan otunun yaprak örnekleri ile 95 °C'ye getirilmiş 25 ml distile su içerisine koyularak 8 dakika süre ile 95 °C'de ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Isırgan otu örneklerinin yaprak, gövde ve kök kısımları için ayrı ayrı infüzyonlar yapılmıştır.

Deneylerde kullanılan ısırgan otu kısımlarının hepsi yaş materyal olarak kullanılmıştır.

2.2.3. CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity; Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi

Deney tüplerinin içerisine sırasıyla 1 ml $1,0 \times 10^{-2}$ M Cu(II) klorür çözeltisi, 1 ml 1 M amonyum asetat tampon (pH 7.0) çözeltisi, 1 ml $7,5 \times 10^{-3}$ M neokuproin çözeltisi ilave edilir. Daha sonra x ml ısırgan otu metanol-su ekstrakt çözeltilerinden ve son olarak (1- x) ml distile su ilave edilerek çözeltiler karıştırılır.

Çözeltiye örnek yerine 1 ml distile su eklenen tüp ise referans olarak hazırlanır. Tüpler oda sıcaklığında ağızı kapalı olarak 30 dakika bekletilir ve süre sonunda çözeltilerin referans çözeltiye karşı 450 nm'deki absorbansları ölçülür.

Bu yöntem metanol ekstraksiyonu yapılmış yaprak ve infüzyon yapılmış yaprak, gövde ve kök örneklerine uygulanmıştır. Abzorbansları ölçülen örneklerin toplam antioksidan kapasitesi CUPRAC yöntemin ile aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam Antioksidan Kapasite}_{\text{CUPRAC}} (\text{mmol Troloks/g}) = \frac{\text{Abzorbans}}{\epsilon} \times \frac{\text{Toplam Reaksiyon Hacmi}}{\text{Alman Hacim}} \times \frac{\text{Toplam Ekstrat Hacmi}}{\text{g Bitki}}$$

$$\epsilon_{\text{CUPRAC}} : 16200 \text{ Lmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

2.2.4. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi)/ABTS Yöntemi

Deney tüplerinin içerisine sırasıyla 1 ml 4×10^{-3} M ABTS, 1 ml $1,2 \times 10^{-4}$ M H_2O_2 ve 1 ml $2,4 \times 10^{-5}$ M HRP ilavesinden sonra çözelti karıştırılır ve oluşan ABTS radikalinin absorbansının kararlı hale gelebilmesi için 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Bu süre sonunda x ml ısırgan otu metanol ekstrakt-infüzyon çözeltilerinden ve $(1 - x)$ ml distile su ilave edilir ve 5 dakika daha oda sıcaklığında bekletilir.

10. dakika sonunda 730 nm'de ısırgan otu ekstraktı ilave edilmemiş referansa karşı absorbans değerleri okunur. Radikal çözeltisinin (örnek yerine örnek çözücüsü içeren) absorbansından, örnek içeren çözeltinin absorbansı çıkarılarak ΔA absorbans değerleri hesaplanır.

$$\Delta A = \Delta A_{\text{Radikal çözeltisi}} - \Delta A_{\text{Örnek Çözeltisi}}$$

Bu yöntem metanol ekstraksiyonu yapılmış yaprak ve infüzyon yapılmış yaprak, gövde ve kök örneklerine uygulanmıştır. Abzorbansları ölçülen örneklerin toplam antioksidan kapasitesi ABTS/HRP yöntemi ile aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam Antioksidan Kapasite}_{\text{ABTS/HRP}} (\text{mmol Troloks/g}) = \frac{\text{Abzorbans}}{\epsilon} \times \frac{\text{Toplam Reaksiyon Hacmi}}{\text{Alman Hacim}} \times \frac{\text{Toplam Ekstrat Hacmi}}{\text{g Bitki}}$$

$$\epsilon_{\text{ABTS/HRP}} : 27500 \text{ Lmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

2.2.5. Folin-Ciocalteu Yöntemi

Deney tüplerine koyulan 2,5 ml Lowry C üzerine x ml ısırgan otu metanol ekstraktı- infüzyonu örnekleri ve (2-x ml) distile su eklenir. 10 dakika inkübasyon sonrasında bu tüplere 0,25 ml seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisi ilave edilir ve 30 dakika daha oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. İçerisinde örnek bulunmayan 2 ml distile su, 2,5 ml Lowry C ve 0,25 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi bulunan referansa karşı 750 nm’de abzorbanası ölçülür.

Bu yöntem metanol ekstraksiyonu yapılmış yaprak ve infüzyon yapılmış yaprak, gövde ve kök örneklerine uygulanmıştır. Abzorbanaları ölçülen örneklerin toplam antioksidan kapasitesi Folin-Ciocalteu yöntemi ile aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam Fenolik Madde İçeriği Folin-Ciocalteu (mmol Gallik asit/g)} = \frac{\text{Abzorbanas}}{\epsilon} \times \frac{\text{Toplam Reaksiyon Hacmi}}{\text{Alman Hacim}} \times \frac{\text{Toplam Ekstrat Hacmi}}{\text{g Bitki}}$$

$$\epsilon_{\text{Folin-Ciocalteu}} : 3254 \text{ Lmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

2.2.6. *Urtica dioica*'ya Özgü Primer Dizayn Örneklerin Moleküler Tayininin Yapılması

Primer dizayn etmek için, güvenilir ve sürekli güncellenen veritabanları kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullanılmak üzere *Urtica dioica* bitkisine özgü primer dizayn etmek için sırasıyla NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) ve Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/Default.aspx>) veritabanları kullanılmıştır.

Primer seçiminde önemli optimum özellikler aşağıdaki gibidir;

- Primer 18-25 baz uzunluğunda olmalıdır,
- Kendi içerisinde homoloji göstermemeli; özellikle 3' ucunun primer-dimer formasyonundan kaçınılmalıdır,

- 3' ucunun DNA kalıbı üzerinde spesifik olmayan bölgelere bağlanmadığı kontrol edilmelidir,
- Guanin-Cytosin (GC) tekrarı dört bp den fazla olmamalıdır,
- GC içeriği % 40 ile % 70 arasında olmalıdır,
- Erime ısıları (Melting temperatures :Tm) birbirine olabildiğince yakın olmalıdır,
- Loop (halka) oluşturmamalıdır.

Primer dizaynı için ilk basamak NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sitesinde arama sınırını “nucleotide” olarak değiştirip arama kutusuna *Urtica dioica* yazılarak tarama sonuçlarını incelemektir. Uygun olduğu düşünülen bir gen bölgesi belirlenip “FASTA” formatına ulaşılır (FASTA: DNA dizilerinin biyoinformatik programları tarafından okunması için oluşturulmuş standart formattır. (http://tr.wikipedia.org/wiki/DNA_dizisi Erişim tarihi: 20.10.2010) (Şekil 2.2).

The screenshot shows the NCBI Nucleotide search interface. The search term "Nucleotide" is entered in the search box. The "Display Settings" section shows "FASTA" selected. The search results display the following information:

Urtica dioica agglutinin isolectin VII precursor (chia5.7.2) gene, exon 3 and partial cds
 GenBank: AF059563.1
[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>gi|4321723|gb|AF059563.1|UDCHIA28V2 Urtica dioica agglutinin isolectin VII precursor (chia5.7.2) gene, exon 3 and partial cds
GGACCCAATCATATCATTCAAGACGGCCCTTGTGGTTCTGGATGTCCCAGCAGACAAACAAACCTTCATGC
CATGACATTGTCCTCAATGCCAACTCCGCCGCTAACACAGCCCCAAACAAAGGTGTGATCAGCAACATT
TTAGCCGCGCTTTGGGCACGACGACTTTGCCGTTAGGTCTTCAAGCATCGGATTTTACAAGAGGTACTG
CGACATGCTGGGAGTGAGCTATGGACATGACTTGAAGTACTGGTTTCGATAAACTCCATCATCGGAGTTC
CAACGCATCCAAATGCGTGTTCGGCGTAAAAACAAGCTAGTCTCCCAAGTGGCTGTCTGTTGTAAG
AGTAGCTCTCATAGCGAGAGAGCGGCATGTTGAATCCATGTTATGCTATGTAATATTATGTTACGCAT
GTATGTTAGAAACATATATGTGTGATTTTCTAGCTCTTACGAG
```

Şekil 2.2: *Urtica dioica*'ya ait agglutinin isolectin VII precursor (chia5.7.2) gene, exon 3 gen bölgesinin FASTA formatı.

FASTA formatı kopyalandıktan sonra Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) sitesindeki metin penceresine yapıştırılır. Bu site, verilen FASTA formatına ait uygun primerler belirler. Bu sırada dizayn edilmek istenilen primere ait tüm bilgiler (Tm değeri: bağlanma sıcaklığı, primer uzunluğu vs.) girilerek “Pick primers” tıklanır ve uygun olan primerin seçilmesi sağlanır (Şekil 2.3).

ADDITIONAL OLIGOS													
	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3' seq</u>							
1 LEFT PRIMER	26	20	60.52	55.00	2.00	2.00	GCCTTGTGGTTCTGGATGTC						
RIGHT PRIMER	218	20	59.47	55.00	4.00	1.00	GCATGTCGCAGTACCTCTTG						
PRODUCT SIZE: 193, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 2.00													
2 LEFT PRIMER	199	20	59.47	55.00	4.00	2.00	CAAGAGGTACTGCGACATGC						
RIGHT PRIMER	388	20	60.37	50.00	4.00	0.00	GATTCAACATGCCGCTCTCT						
PRODUCT SIZE: 190, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 2.00													
3 LEFT PRIMER	199	20	59.47	55.00	4.00	2.00	CAAGAGGTACTGCGACATGC						
RIGHT PRIMER	387	20	60.37	50.00	4.00	0.00	ATTCAACATGCCGCTCTCTC						
PRODUCT SIZE: 189, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 3.00													
4 LEFT PRIMER	47	20	59.34	50.00	2.00	0.00	CAGCACGACAACAAACCTTC						
RIGHT PRIMER	234	20	60.24	55.00	4.00	2.00	CCATAGCTCACTCCCAGCAT						
PRODUCT SIZE: 188, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00													
Statistics													
	con	too	in	in	bad	no	tm	tm	high	high	high		
	sid	many	tar	excl	GC%	clamp	too	too	any	3'	poly	end	
	ered	Ns	get	reg	GC%	clamp	low	high	compl	compl	X	stab	ok
Left	3183	0	0	0	0	0	724	1638	11	16	0	61	733
Right	3262	0	0	0	17	0	1217	1317	3	16	0	50	642
Pair Stats:													
considered 573, unacceptable product size 393, high end compl 17, ok 163													
primer3 release 1.1.4													

Şekil 2.3 : Primer 3 programıyla istenilen özelliklere uygun olarak belirlenen ilk dört primer setine ait ekran görüntüsü.

Uygun olan 4 primer belirlendikten sonra bu primerlerin uygunluğunu denetlemek için Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/Default.aspx>) sitesinde her primer seti için hairpin, selfdimer, heterodimer yapma durumları (optimum G-S oranı, düşük Delta G ve hairpin değeri gibi) incelenir ve istenmeyen konformasyonları en az oluşturan primer seti belirlenir (Şekil 2.4).

Şekil 2.4 : Oligo Analyzer programında primerlerin uygunluk derecelerinin belirlenmesi.

Oligo Analyzer veritabanında en uygun primer seçimi yapıldıktan sonra seçilen primerin gerçekten *Urtica dioica* bitkisine özgü olup olmadığının tayini ise BLAST yapılarak sağlanır. Bunun için BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sitesine girilerek arama seçenekleri “nucleotide blast” olarak ayarlanır ve dizayn edilen primerin sağ ve sol dizileri sırayla metin penceresine yazılır ve “Choose Search Set- Database “ ayarı “Others” seçildikten sonra Blast yapılır. E-Value değeri, sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösteren değerdir. Sorgunun, düşük E-Value değere sahip sonuçlarla homolog olma ihtimali fazladır. (Şekil 2.5).

Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [B](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF059565.1	Urtica dioica agglutinin isolectin VII precursor (chia5.7.3) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059563.1	Urtica dioica agglutinin isolectin VII precursor (chia5.7.2) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059561.1	Urtica dioica agglutinin isolectin VII precursor (chia5.7.1) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059559.1	Urtica dioica agglutinin isolectin VI precursor (chia5.6.1) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059557.1	Urtica dioica agglutinin isolectin V precursor (chia5.5.2) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059555.1	Urtica dioica agglutinin isolectin V precursor (chia5.5.1) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059539.1	Urtica dioica agglutinin isolectin I precursor (chia5.1.3) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059537.1	Urtica dioica agglutinin isolectin I precursor (chia5.1.2) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059551.1	Urtica dioica putative agglutinin isolectin III precursor (chia5.3.1) gene, c	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059535.1	Urtica dioica agglutinin isolectin I precursor (chia5.1.1) gene, complete c	40.1	40.1	100%	0.055	100%

Şekil 2.5 : Belirlenen primer setinin Blast sonuç tablosu.

Online veritabanları ve programları kullanılarak dizayn edilen primer seti Alpha DNA (Kanada) firması tarafından temin edildikten sonra 100 pmol/ml stok çözelti seyreltmesi yapıldıktan sonra FINNZYMES Phire® Doğrudan PCR kiti kullanılarak PCR yapılmıştır. Bu kite ait bileşenler Tablo 2.4’te verilmiştir.

Tablo 2.4 : FINNZYMES Phire®Doğrudan-PCR bileşenlerine ait bilgiler.

Doğrudan-PCR Bileşenleri	Son Hacim
Phire® Plant PCR Tampon Çözelti (2X)	10 µl
Phire® Plant Hot Start DNA Polimeraz	0.4 µl
Primer (F)	0.5µM/20 µl
Primer (R)	0.5µM/20 µl
Örnek (sıvı)	0.5 µl
Örnek (katı)	0.5 mm
ddH ₂ O	8 µl
Toplam hacim	20 µl

Türkiye’nin 12 farklı ilinden toplanan ısırgan otu örnekleri ile moleküler tür tayini için dizayn edilen primerler kullanılarak PCR yapılmıştır. Yapılan PCR’a ait şartlar Tablo 2.5’teki gibidir.

Tablo 2. 5 : FINNZYMES Phire® Doğrudan-PCR şartlarına ait bilgiler.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	98	5 dakika	1
Denatürasyon	95	5 saniye	
Bağlanma	57	5 saniye	40
Uzama	72	20 saniye	
Sonlanma	72	1 dakika	1

Yabancı maddelerin uzaklaştırılması için örnekler distile su ile birkaç defa yıkandıktan sonra kit içerisindeki zımba (uni-core) ile bitkilerin yaprak dokularından 0,5 mm çapında doku kesiti alınmıştır. Bu bitkisel dokulara hiçbir işlem uygulanmadan FINNZYMES Phire® Bitki Doğrudan PCR kiti ile hazırlanmış tüp içindeki PCR bileşenlerine doğrudan eklenmiştir.

Örneklerden doku kesiti alınması sırasında örnekler arası kontaminasyonun engellenmesi için her bir farklı dokudan kesit alındıktan zımbanın ucu % 2'lik NaClO çözeltisine batırılmış ve sterilizasyonu sağlanmıştır.

2.2.7. DNA İzolasyonu

12 farklı şehirden toplanan ısırgan otu örnekleri deneylerin yapılacağı süreye kadar -30°C de muhafaza edilmiştir. Örnekler önce distile su ile yıkanmış daha sonra her örneğin kök, gövde ve yaprak kısımlarından yaklaşık olarak 100 mg alınarak dakikada 11,000 PRM devir ile mekanik parçalama yapan IKA LABORTCHNIK Ultra Turrax T 25 basic marka homojenizatör ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrası Macherey-Nagel firmasının NucleoSpin® Bitki DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır.

MN-NucleoSpin® Bitki DNA izolasyon kiti ile DNA izolasyon prosedürü aşağıdaki gibidir:

- 100 mg örnek üzerine 400 µl PL1 tampon çözeltisi ve 10 µl RNase enzimi eklenerek vortekslenir.

- 65 °C’de 10 dakika inkübasyona bırakılır.
- 8000 rpm’de 1 dakika maddelerin dibe çökmesi için santrifüj yapılır.
- Örnek, violet halkalı NucleoSpin filtre kolonu içeren tüpe aktarılarak 2 dakika 10000 rpm’de santrifüj ile filtrasyon yapılır. Violet halkalı NucleoSpin filtre, izolasyonun ilk aşamalarında mevcut atıkları uzaklaştırmak için kullanılır.
- Örnek üzerine 450 µl PC tampon çözeltisi eklenerek vortekslenir.
- 700 µl örnek yeşil halkalı NucleoSpin filtre kolonu içeren yeni bir tüpe aktarılır. 10000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenir. Filtre edilmiş alttaki sıvı uzaklaştırılır.
- Örneğin bulunduğu süzüntü (üst faz) üzerine 400 µl PW1 tampon çözeltisi eklenir. 10000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenir. Filtre edilmiş alttaki sıvı uzaklaştırılır.
- Örnek üzerine 700 µl PW2 tampon çözeltisi eklenir. 10000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenir. Filtre edilmiş alttaki sıvı uzaklaştırılır.
- Örnek üzerine 200 µl PW2 tampon çözeltisi eklenir. 10000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenir. Filtre edilmiş alttaki sıvı uzaklaştırılır.
- 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj ile boş kurulama yapılır.
- Filtrasyon kolonu DNA örneğini saklayacağımız tüpe takılır.
- PE tampon çözeltisi 70 °C’de 5 dakika inkübasyona bırakılır.
- Örneğin bulunduğu süzüntü (üst faz) üzerine 50 µl PE tampon çözeltisi (70 °C’ye ısıtılmış) eklenir. 10000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenir.
- Örnek üzerine tekrar 50 µl PE tampon çözeltisi (70 °C’ye ısıtılmış) eklenir. 10000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenir.
- Filtre kolonu uzaklaştırılır ve saf DNA -20 °C’de saklanır.

2.2.8. DNA Konsantrasyonu Ölçümü

DNA izolasyonu sonrasında her bir örnek için DNA konsantrasyonu Qubit™ Fluorometer ve Quant-IT dsDNA BR Assay Kit ile yapılmıştır.

Qubit™ Fluorometer ile DNA miktar tayini protokolü aşağıdaki işlemlerle gerçekleştirilir:

a. Çalışma solüsyonu hazırlanması:

- 1,5 ml yada 2 ml'lik mikrosantrifüj veya 15 ml'lik santrifüj tüpüne Standart (2 yada 3 adet) ve çalışılacak örnek miktarı (n) başına 199 µl Quant-iT™ tampon çözelti eklenir. [(n+3) x 199 µl]
- Quant-iT™ tampon çözelti üzerine, Standart (2 yada 3 adet) ve çalışılacak örnek miktarı (n) başına 1 ul Quant-iT™ ayıraç (reagent) eklenir. [(n+3) x 1 µl]
- Sonuçta, her örnek ve standart başına “199 µl Quant-iT™ tampon çözelti ve 1 ul Quant-iT™ ayıraç (reagent) ” olmak üzere 200 µl çalışma solüsyonu elde etmiş oluruz.

b. Standartların Hazırlanması:

0,5 µl şeffaf ve ince cidarlı mikrosantrifüj tüpüne;

- Standart 1 için; 190 µl Working solusyon ve 10 µl standart 1 eklenir.
- Standart 2 için; 190 µl Working solusyon ve 10 µl standart 2 eklenir.

c. Örneklerin Hazırlanması:

- Kullanılacak örnek miktarına göre 180-199 µl Working solusyon ve 1-20 µl örnek eklenir.

d. İnkübasyon:

- Quant-iT™ dsDNA, ssDNA ve RNA kitleri için en az 2 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir.

e. Protokolün seçilmesi ve Cihaz kalibrasyonu:

- İnkübasyon sonrası Qubit™ Fluorometer cihazında Quant-iT™ kit seçeneğine gelip bir önceki kalibrasyonu kullanılır ya da yeni bir kalibrasyon yapılır.
- Yeni kalibrasyon yapılacaksa aşağıdaki yönergeler takip edilir;
- ✓ Standart 1'in yer aldığı mikrosantrifüj tüpünü cihazın ilgili haznesine yerleştirip cihaz kapağı kapatılır ve “GO” tuşuna basarak Standart 1 okutulur.
- ✓ Standart 2'in yer aldığı mikrosantrifüj tüpünü cihazın ilgili haznesine yerleştirip cihaz kapağını kapatılır ve “GO” tuşuna basarak Standart 2 okutulur.

f. Örneklerin Ölçülmesi:

- Ölçülecek örneği içeren mikrosantrifüj tüpü cihazın ilgili haznesine yerleştirilir ve cihaz kapağı kapatılır ve “GO” tuşuna basarak örnekler okutulur.

g. Standardın Kalibrasyonu

- Hazırlanan standart 2, örnek ölçümlerinden sonra güneş ışığı alacak şekilde 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası cihazın ilgili haznesine yerleştirilerek “GO” tuşuna basılır ve konsantrasyonu ölçülür. Çıkan sonucun 100 µg/ml’ye yakın olması ölçülen değerlerin güvenilirliği açısından önemlidir.

2.2.9. Agaroz Jel Hazırlanması ve Jel Elektroforezi

PCR ürünlerin incelenebilmesi için % 2’lik agaroz jel hazırlanır. Bunun için 2 g Agaroz 100 ml 0.5xTBE tampon çözeltisi içerisine eklenir ve manyetik karıştırıcı ile beraber ısıtıcı yardımıyla çözünmesi sağlanır. Hazırlanan solüsyon kaynama derecesine geldiğinde ısıtıcıdan alınır ve 65 °C-70 °C’ye soğuması beklenir. Birkaç dakika sonra içine 5 µl/100 ml konsantrasyonunda SafeView floresan boyası karıştırılır. SafeView floresan boyası DNA bazları arasına girebilen ve bu sayede DNA’yı UV ışığı altında görebilmemizi sağlayan, bilinen kanserojenik ve mutajenik boyalara göre güvenli olduğu iddia edilen bir boyadır.

Isısı 65 °C-70 °C’ye düşürülen jel hazırlanan kalıba dökülür ve soğuması beklenir. Soğuma sırasında dökülen kalıbın şeklini alan jele, yerleştirilen tarak sayesinde 20-22 kuyu açılması sağlanmıştır. Örnekler bu kuyulara yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenir. Bu tampon örneklerin yüklenebilmesini, örneklerin yürümesinin takibini yapabilmemizi sağlarken, hem de yerine göre bir çeşit standart boy markörü gibi kullanılmaktadır.

Elektroforezde 10 volt/cm’de yürütülen DNA’ları görüntülemek için bir UV ışık kaynağı kullanılmaktadır. Fotoğraflar Geldoc 2000 sistemi ile çekilmiştir.

2.2.10. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD- PCR) Şartları

RAPD-PCR yönteminin temel prensibi, ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında çoğaltma yapmasıdır. Toplam hacmi 25 µl olacak şekilde hazırlanan örneklerin içeriği Tablo 2.6'daki gibidir.

Tablo 2.6 : Bir RAPD-PCR tüpündeki bileşenler.

RAPD-PCR Bileşenleri	Son Hacim/Konsantrasyon
DreamTaq™ PCR Mastermix(2X)	12.5 µl
Primer karışımı	0.1-1.0 µM
Örnek DNA'sı	10 pg - 1 µg
ddH ₂ O	5.5 µl
Toplam hacim	25 µl

Bazı durumlarda daha iyi sonuç alınabilmesi için fazladan Taq DNA polimeraz enzimi ilave edilebilir. Bu durumda toplam sonuç değişmeyecek şekilde hesaplamalar tekrarlanır. Hazırlanan bu karışımlar Tablo 2.7'deki şartlara uygun olarak amplifikasyon için makineye yerleştirilir. Her ısırgan otu örneğinin yaprak, gövde ve kök kısımları ayrı ayrı çalışılmış ve her örnek için bileşenler x3'lü olarak hazırlanmıştır.

Tablo 2.7 : RAPD-PCR koşulları.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	1-3 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	
Bağlanma	36	30 saniye	40
Uzama	72	1 dakika/kb	
Sonlanma	72	5-15 dakika	1

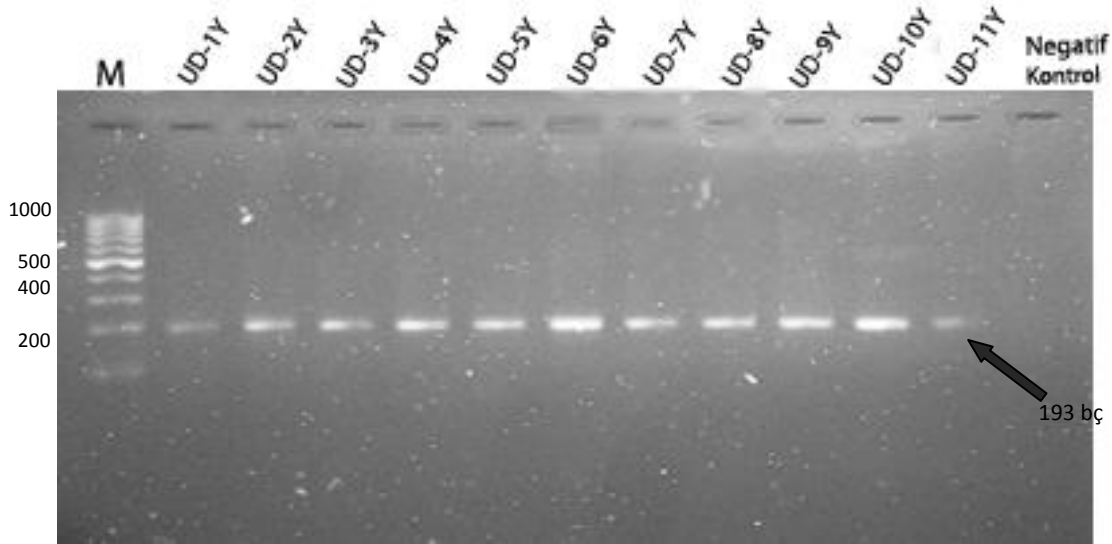
BÖLÜM 3

BULGULAR

Çalışmamızın bulguları 3 ana başlık halinde sunulmuştur. Türkiye'nin 11 farklı şehirden elde edilen ısırgan otu örneklerinin *Urtica dioica* türü olduğunun anlaşılması çalışmamızın devamı için önem arz etmektedir. Bu nedenle ilk önce örneklerimizin *U.dioica* doğruluğunu içeren sonuçlar ortaya konulmuştur. Daha sonra % 70 metanol ekstraktı ve infüzyonu yapılan *U. dioica* örneklerinin toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde içerikleri belirlenerek şehirlerarasındaki farklılıklar belirlenmiş, son olarak da yaprak, gövde, kök kısımları ayrılan *U. dioica* örneklerinin DNA'larındaki değişim incelenmiştir.

3.1. Türe Özgü Primer Dizaynı ve İlgili PCR Sonuçları

Klasik morfolojik özelliklere bakılarak tür tespiti yapılan 12 farklı şehirden temin edilen *Urtica dioica* örneklerinin moleküler açıdan da tür tespiti için, online veri tabanları (NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) ve Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/Default.aspx>)) kullanılarak dizayn edilen primer seti 5' GCCTTGTGGTTCTGGATGTC 3', ve primer 5' GCATGTCGAGTACCTCTTG 3' ile yapılan tür tayinine yönelik PCR sonucu Şekil 3.1'de verilmiştir. DNA purifikasyon-izolasyon işlemine gerek duymadan çalışılmaya olanak sağlayan FİNNZYMES Phire® Bitki Doğrudan PCR kiti ile hedeflenen DNA bölgeleri çoğaltılmıştır.



Şekil 3.1 : FİN NZYMES Phire® Bitki Doğrudan PCR kiti ile yapılan tür tayinine yönelik PCR sonuçları. 193 bç'lik amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. UD-1Y, UD-2Y... UD-10Y, UD-11Y (Antalya, Van, Muğla, İstanbul (Anadolu), Ordu, Tekirdağ, Erzurum, Mersin, Tokat, İstanbul (Avrupa), İzmir) yaprak örnekleridir. İlk kuyu (M) boy markörünü, son kuyu negatif kontrol örneğini göstermektedir.

Online veritabanları ve programlar kullanılarak dizayn edilen primer setinin, PCR sonrasında 193 bç uzunluğunda bant verdiği gözlenmiştir. Bu şekilde klasik morfolojik yöntemler ile yapılan tür tayinini moleküler yöntemlerle de teyit etmekteyiz. Kullanılan FİN NZYMES Phire® Bitki Doğrudan PCR kiti ile kros-kontaminasyon riski en aza indirilmiştir. Zimba (uni-core) ile bitkilerin yaprak dokularından 0,5 mm çapında doku kesiti elde edilmesi sırasında % 2'lik NaClO çözeltisi ile sterilizasyonu sağlanmış ve her PCR'da negatif kontrol kullanılarak kontaminasyon olmadığı doğrulanmıştır.

Kullanılan primerlerin *U. dioica* özgünlüğünün teyidi sanal ortamda BLAST analizi (Şekil 3.2), deneysel ortamda ise nane ve fasulye bitkileri kullanılarak yapılan PCR ile gösterilmiştir (Şekil 3.3). PCR için FİN NZYMES Phire® Bitki Doğrudan PCR kiti kullanılmıştır.

▼ Descriptions

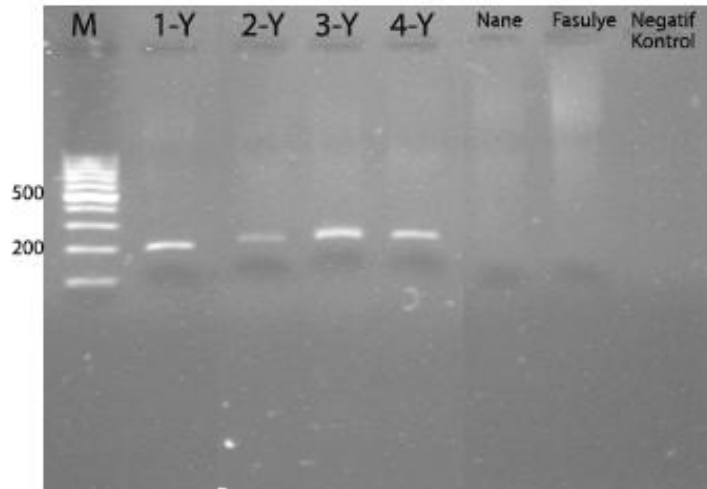
Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF059565.1	<i>Urtica dioica</i> agglutinin isolectin VII precursor (chia5.7.3) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059563.1	<i>Urtica dioica</i> agglutinin isolectin VII precursor (chia5.7.2) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059561.1	<i>Urtica dioica</i> agglutinin isolectin VII precursor (chia5.7.1) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059559.1	<i>Urtica dioica</i> agglutinin isolectin VI precursor (chia5.6.1) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059557.1	<i>Urtica dioica</i> agglutinin isolectin V precursor (chia5.5.2) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059555.1	<i>Urtica dioica</i> agglutinin isolectin V precursor (chia5.5.1) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059539.1	<i>Urtica dioica</i> agglutinin isolectin I precursor (chia5.1.3) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059537.1	<i>Urtica dioica</i> agglutinin isolectin I precursor (chia5.1.2) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059511.1	<i>Urtica dioica</i> putative agglutinin isolectin III precursor (chia5.3.1) gene, exon 3 and	40.1	40.1	100%	0.055	100%
AF059535.1	<i>Urtica dioica</i> agglutinin isolectin I precursor (chia5.1.1) gene, complete cDNA	40.1	40.1	100%	0.055	100%
XM_002458694.1	<i>Sorghum bicolor</i> hypothetical protein, mRNA	32.2	32.2	80%	14	100%
AK335177.1	<i>Triticum aestivum</i> cDNA, clone: WT012_E04, cultivar: Chinese Spring	32.2	32.2	80%	14	100%
XM_002414487.1	<i>Ixodes scapularis</i> glycerol-3-phosphate cytidyltransferase, putative	32.2	32.2	80%	14	100%
CP001628.1	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665, complete genome	32.2	84.7	80%	14	100%
BT085195.1	<i>Zea mays</i> full-length cDNA clone ZM_BFb0326G17 mRNA, complete cDNA	32.2	32.2	80%	14	100%
FM882234.1	<i>Nymphaea jamesoniana</i> mRNA for putative wuschel homeobox protein	32.2	32.2	80%	14	100%
FM882153.1	<i>Gnetum gnemon</i> mRNA for putative wuschel homeobox protein WOX3	32.2	32.2	80%	14	100%
AC234236.3	<i>Homo sapiens</i> FOSMID clone ABC13-48696600G23 from chromosome 1	32.2	32.2	80%	14	100%

Şekil 3.2 : Primer setinin Blast sonuçları.

Şekil 3.2’de düşük güvenilirlik değerine sahip farklı canlı ile eşleşmeler de görülmektedir.



Şekil 3.3: Fasulye ve nane bitkileri ile bazı *Urtica dioica* türleri ile yapılan PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren % 2’lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyu (M) boy markörünü, son kuyu negatif kontrol örneğini göstermektedir.

3.2. Toplam Antioksidan Kapasite ve Toplam Fenolik Madde İçerik Sonuçları

DNA yapısının çeşitli kirlilik tiplerine maruz kaldığında, ya da değişken ortam şartlarına göre değişim gösterdiği bilinmektedir ve bunlar canlının fizyolojik yapısında da birtakım değişikliklere neden olabilmektedir. Bu değişiklikler etnobotanik olarak kullanılan bazı bitkilerin kimyasal yapılarında da değişimler oluşturabilmektedir. Bu durumu göstermek amacıyla 12 farklı ısırgan otu örneğinin toplam antioksidan kapasitesi ve toplam fenolik içerik miktarlarındaki değişimler çeşitli deneyler ile gösterilmiştir.

CUPRAC yöntemi Cu (II) neokuprain çözeltisinin amonyum asetat tampon ortamında antioksidan madde varlığında Cu (II) neokupraine indirgenmesi esasına dayanır. 450 nm'de aborbansı ölçülen değerler CUPRAC formülü ile (sayfa 41) hesaplamasından sonra toplam antioksidan kapasite değerini vermektedir.

ABTS yöntemi 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) kromojen radikal katyonunun hidrojen verici antioksidanlar tarafından inhibe edilmesine dayalı bir metoddur 730 nm'de aborbansı ölçülen çözeltinin toplam antioksidan kapasitesi ABTS formülüne göre (sayfa 42) hesaplanmıştır.

Folin-Ciocalteu yöntemi CuSO₄ (bakır (II) sülfat) çözeltisinin alkali ortamda protein veya antioksidanlar ile kompleks yapması esasına dayanır. 750 nm'de ölçülen aborbans değerleri Folin-Ciocalteu formülü ile hesaplanarak (sayfa 43) toplam fenolik içerikleri belirlenir.

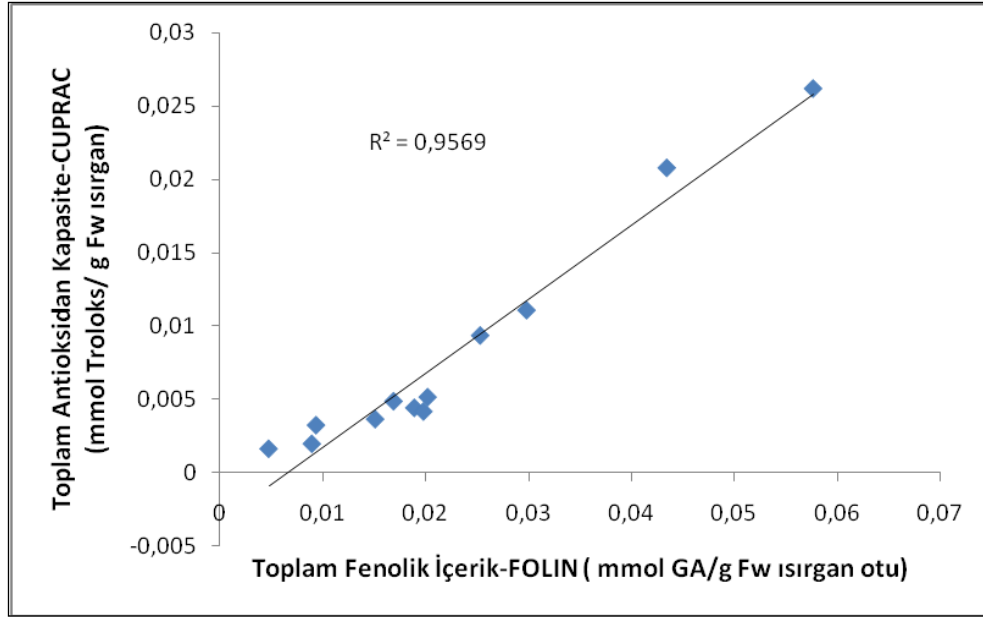
3.2.1. Isırgan Otu Yaprak Örneklerinin Sonuçları

% 70 metanol ekstraktı ve infüzyonu hazırlanan ısırgan otu yaprak örnekleri ile yapılan CUPRAC, ABTS/HRP ve Folin-Ciocalteu deneylerinin sonuçları Tablo 3.1'deki gibidir. Hesaplamalar troloks ve gallik asit için belirlenen formüller ile yapılmıştır (sayfa 41, 42, 43).

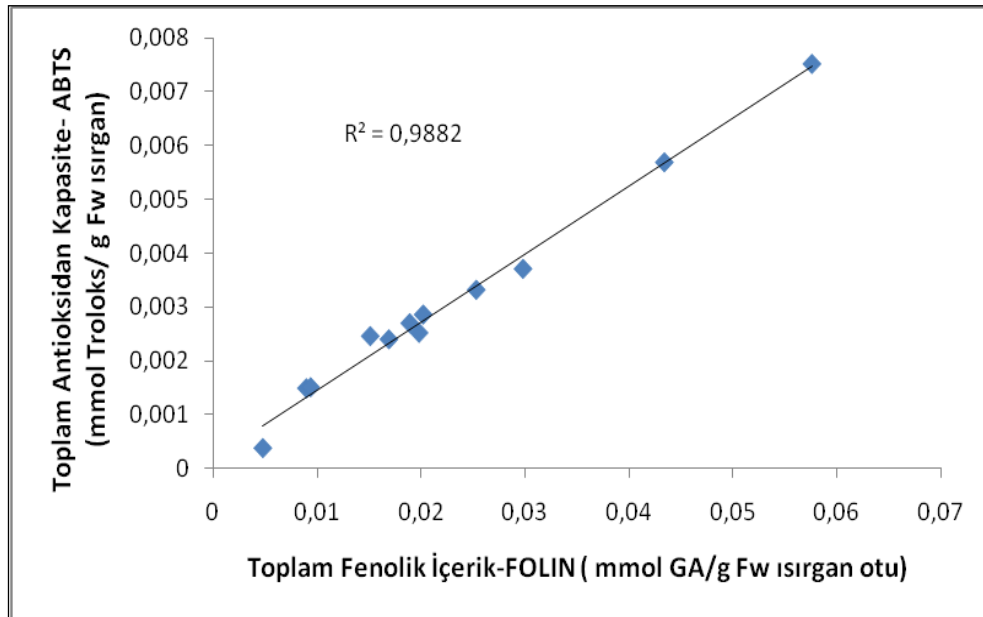
Tablo 3.1 : *Urtica dioica* yapraklarının metanol ekstraktı ve infüzyonuna ait toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde sonuçları.

Yöntem Şehir	CUPRAC mmol Troloks/g		ABTS/HRP mmol Troloks/g		Folin–Ciocalteu mmol Gallik asit/g	
	Metanol Yaprak	Su Yaprak	Metanol Yaprak	Su Yaprak	Metanol Yaprak	Su Yaprak
Antalya	$1,11 \times 10^{-2}$	1×10^{-2}	$0,37 \times 10^{-2}$	$0,43 \times 10^{-2}$	$2,98 \times 10^{-2}$	$3,6 \times 10^{-2}$
Van	$0,37 \times 10^{-2}$	$1,13 \times 10^{-2}$	$0,24 \times 10^{-2}$	$0,45 \times 10^{-2}$	$1,51 \times 10^{-2}$	$3,9 \times 10^{-2}$
Muğla	$0,51 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-2}$	$0,28 \times 10^{-2}$	$0,44 \times 10^{-2}$	$2,02 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-2}$
İstanbul (Anadolu)	$0,17 \times 10^{-2}$	$0,18 \times 10^{-2}$	$0,04 \times 10^{-2}$	$0,35 \times 10^{-2}$	$0,47 \times 10^{-2}$	$0,93 \times 10^{-2}$
Ordu	$0,44 \times 10^{-2}$	$0,98 \times 10^{-2}$	$0,27 \times 10^{-2}$	$0,42 \times 10^{-2}$	$1,89 \times 10^{-2}$	$3,7 \times 10^{-2}$
Tekirdağ	$0,94 \times 10^{-2}$	$0,75 \times 10^{-2}$	$0,33 \times 10^{-2}$	$0,37 \times 10^{-2}$	$2,53 \times 10^{-2}$	$2,8 \times 10^{-2}$
Erzurum	$2,08 \times 10^{-2}$	$11,5 \times 10^{-2}$	$0,57 \times 10^{-2}$	$0,99 \times 10^{-2}$	$4,34 \times 10^{-2}$	25×10^{-2}
Mersin	$0,5 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-2}$	$0,23 \times 10^{-2}$	$0,60 \times 10^{-2}$	$1,69 \times 10^{-2}$	$4,6 \times 10^{-2}$
Tokat	$2,62 \times 10^{-2}$	$1,72 \times 10^{-2}$	$0,75 \times 10^{-2}$	$0,52 \times 10^{-2}$	$5,76 \times 10^{-2}$	$4,9 \times 10^{-2}$
İstanbul (Avrupa)	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,31 \times 10^{-2}$	$0,14 \times 10^{-2}$	$0,36 \times 10^{-2}$	$0,89 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^{-2}$
İzmir	$0,42 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-2}$	$0,25 \times 10^{-2}$	$0,48 \times 10^{-2}$	$1,98 \times 10^{-2}$	4×10^{-2}
Konya	$0,33 \times 10^{-2}$	$1,75 \times 10^{-2}$	$0,15 \times 10^{-2}$	$0,59 \times 10^{-2}$	$0,93 \times 10^{-2}$	$4,12 \times 10^{-2}$

% 70 metanol ekstraktı yapılan *U. dioica* yapraklarının toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik korelasyonu Şekil 3.4, 3.5'te verilmiştir. Toplam fenolik madde içeriği ve toplam antioksidan kapasite korelasyonu CUPRAC yöntemi için 0,9569 (Şekil 3.4); ABTS yöntemi için 0,9882 (Şekil 3.5) olarak bulunmuştur. Folin-CUPRAC ve Folin-ABTS deneylerinin sonuçlarının değerlendirildiği bu grafiklerde toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik içeriklerinin örtüştüğü görülmektedir. Bu sonuç deney güvenilirliği açısından önemli ve destekleyicidir.



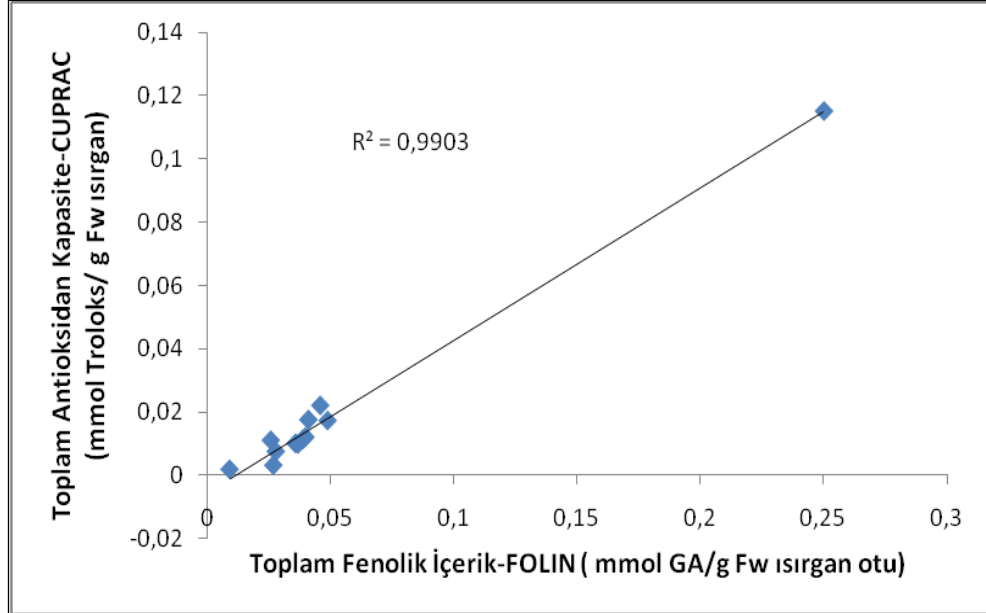
Şekil 3.4 : % 70 metanol esktratu yapılmış *Urtica dioica* yaprak örneklerinin Folin–CUPRAC korelasyonu.



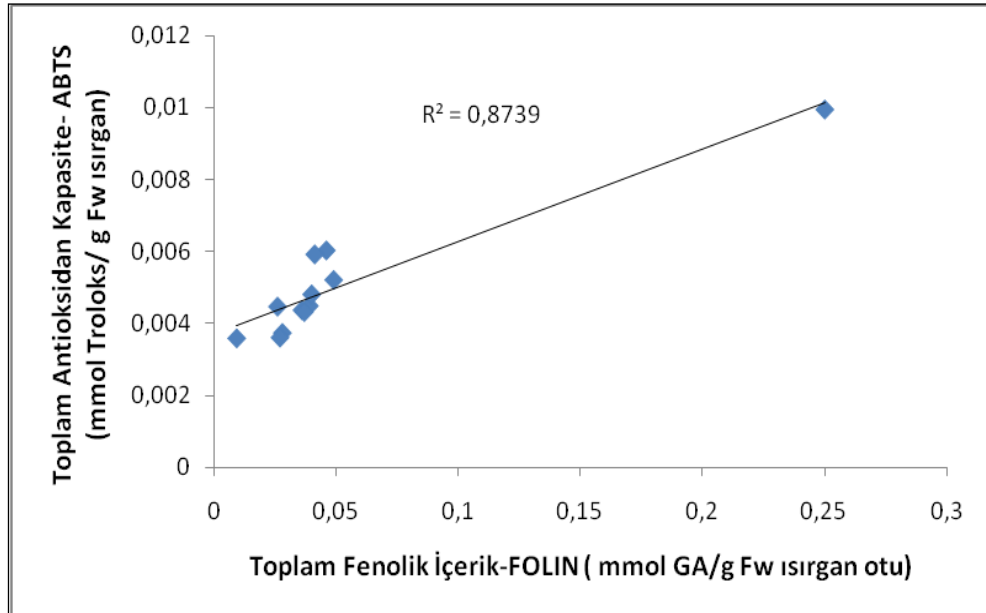
Şekil 3.5 : % 70 metanol esktratu yapılmış *Urtica dioica* yaprak örneklerinin Folin–ABTS korelasyonu.

İnfüzyonu yapılan *U. dioica* yaprak örneklerinin toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik korelasyonu Şekil 3.6, 3.7’de verilmiştir. ısırgan otu yapraklarının infüzyon örnekleri için; toplam fenolik madde içeriği ve toplam antioksidan kapasite korelasyonu CUPRAC yöntemi için 0,9903 (Şekil 3.6); ABTS yöntemi için 0,8739 (Şekil 3.7) olarak bulunmuştur.

Korelasyon eğrilerinin değerleri toplam fenolik madde içeriği ve toplam antioksidan kapasite sonuçlarının birbirleriyle örtüştüğü ve infüzyon yapılmış örnekler ile yapılan deneylerin güvenilir olduğu görülmüştür.



Şekil 3.6 : İnfüzyonu yapılmış *Urtica dioica* yaprak örneklerinin Folin–CUPRAC korelasyonu.



Şekil 3.7 : İnfüzyonu yapılmış *Urtica dioica* yaprak örneklerinin Folin–ABTS korelasyonu.

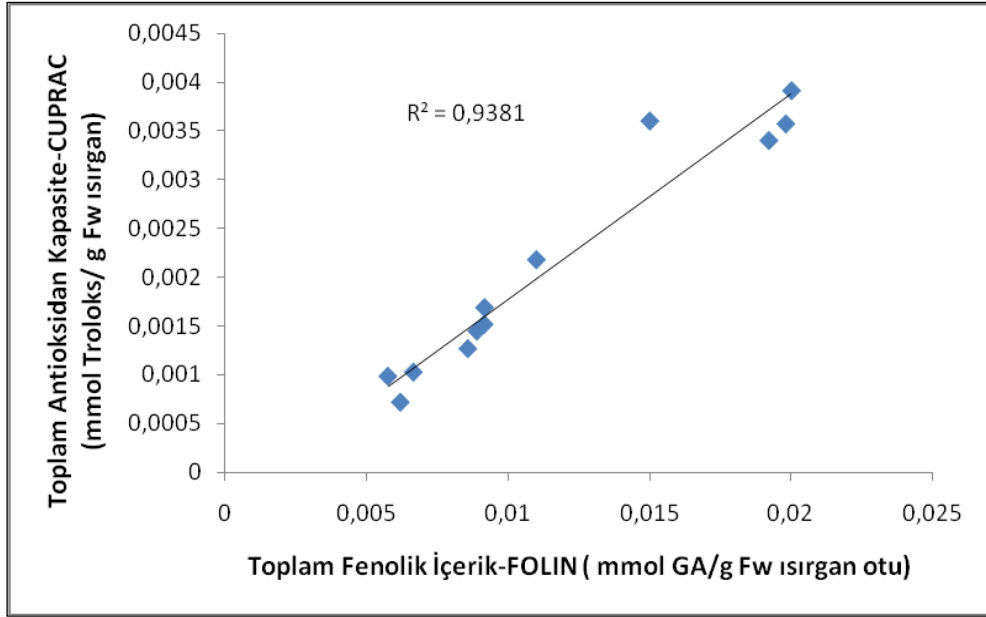
3.2.2. Isırgan Otu Gövde Örneklerinin Sonuçları

Sadece infüzyonları hazırlanan *U. dioica* gövdeleri ile yapılan CUPRAC, ABTS/HRP ve Folin–Ciocalteu deneylerinin sonuçları Tablo 3.2'deki gibidir. Hesaplamalar troloks ve gallik asit için belirlenen formüller ile yapılmıştır (sayfa 41, 42, 43).

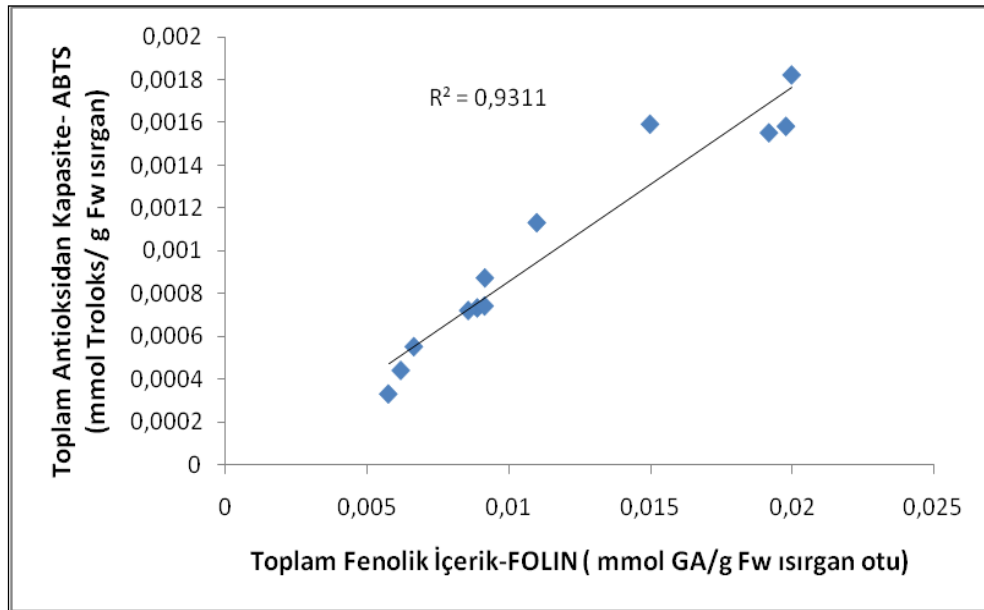
Tablo 3.2 : *Urtica dioica* gövdelerinin infüzyonuna ait toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde sonuçları.

Yöntem Şehir	CUPRAC mmol Troloks/g	ABTS/HRP mmol Troloks/g	Folin – Ciocalteu mmol Gallik asit/g
Antalya	$9,87 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-4}$	$57,6 \times 10^{-4}$
Van	$39,1 \times 10^{-4}$	$18,2 \times 10^{-4}$	200×10^{-4}
Muğla	$16,9 \times 10^{-4}$	$8,72 \times 10^{-4}$	$91,7 \times 10^{-4}$
İstanbul (Anadolu)	$10,3 \times 10^{-4}$	$5,51 \times 10^{-4}$	$66,6 \times 10^{-4}$
Ordu	36×10^{-4}	$15,9 \times 10^{-4}$	150×10^{-4}
Tekirdağ	34×10^{-4}	$15,5 \times 10^{-4}$	192×10^{-4}
Erzurum	$14,5 \times 10^{-4}$	$7,32 \times 10^{-4}$	89×10^{-4}
Mersin	$35,7 \times 10^{-4}$	$15,8 \times 10^{-4}$	198×10^{-4}
Tokat	$21,8 \times 10^{-4}$	$11,3 \times 10^{-4}$	110×10^{-4}
İstanbul (Avrupa)	$12,7 \times 10^{-4}$	$7,2 \times 10^{-4}$	$85,8 \times 10^{-4}$
İzmir	$7,22 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^{-4}$	62×10^{-4}
Konya	$15,2 \times 10^{-4}$	$7,41 \times 10^{-4}$	$91,6 \times 10^{-4}$

İnfüzyonu yapılan *U. dioica* gövde örneklerinin toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik korelasyonu Şekil 3.8, 3.9'de verilmiştir. Isırgan otu gövdelerinin infüzyon örnekleri için; toplam fenolik madde içeriği ve toplam antioksidan kapasite korelasyonu CUPRAC yöntemi için 0,9381 (Şekil 3.8); ABTS yöntemi için 0,9311 (Şekil 3.9) olarak bulunmuştur. Korelasyon eğrilerinin değerleri toplam fenolik madde içeriği ve toplam antioksidan kapasite sonuçlarının infüzyon yapılmış *U. dioica* gövde örneklerinde de birbirleriyle örtüştüğü anlamına gelmektedir.



Şekil 3.8 : İnfüzyon yapılmış *Urtica dioica* gövde örneklerinin Folin–CUPRAC korelasyonu.



Şekil 3.9 : İnfüzyon yapılmış *Urtica dioica* gövde örneklerinin Folin–ABTS korelasyonu.

3.2.3. ısırgan Otu Kök Örneklerinin Sonuçları

Ülkemizin 8 şehrinden alınan *U. dioica* kök örnekleriyle hazırlanan infüzyonlar ile toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde tayini sonuçları

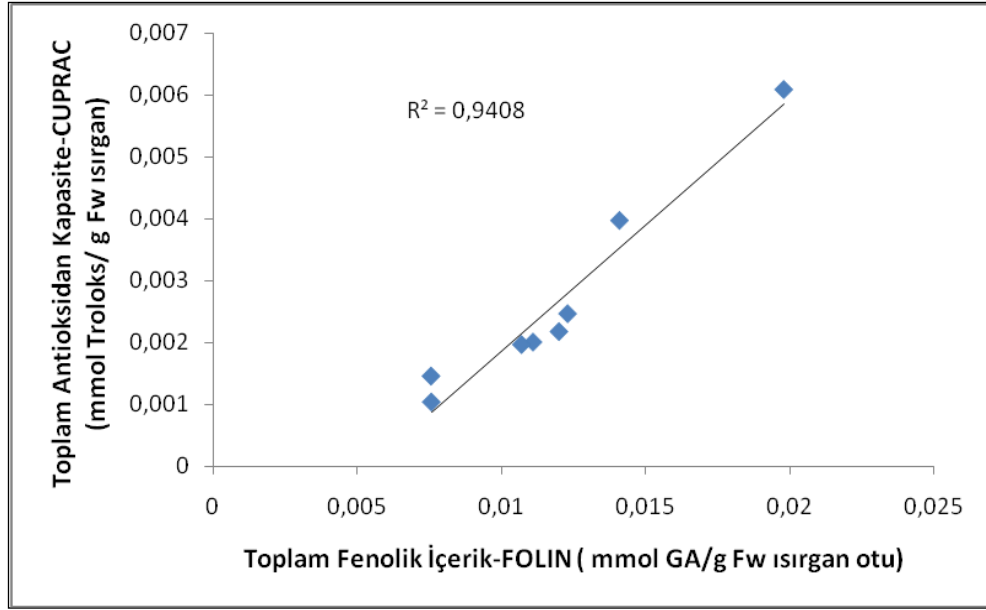
Tablo 3. 3'deki gibidir. Hesaplamalar troloks ve gallik asit için belirlenen formüller ile yapılmıştır (sayfa 41, 42, 43).

Tablo 3.3: Isırgan otu köklerinin infüzyonuna ait toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde sonuçları.

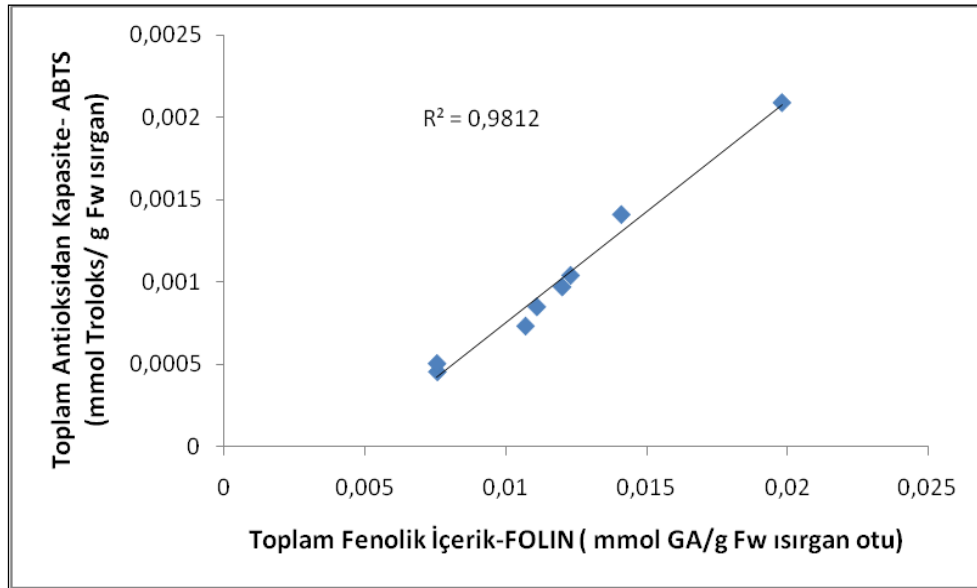
Yöntem Şehir	CUPRAC mmol Troloks/g	ABTS/HRP mmol Troloks/g	Folin – Ciocalteu mmol Gallik asit/g
Muğla	$21,7 \times 10^{-4}$	$9,7 \times 10^{-4}$	120×10^{-4}
Ordu	$24,6 \times 10^{-4}$	$10,4 \times 10^{-4}$	123×10^{-4}
Tekirdağ	$60,9 \times 10^{-4}$	$20,9 \times 10^{-4}$	198×10^{-4}
Erzurum	$10,3 \times 10^{-4}$	$4,54 \times 10^{-4}$	$75,7 \times 10^{-4}$
Mersin	$39,7 \times 10^{-4}$	$14,1 \times 10^{-4}$	141×10^{-4}
Tokat	20×10^{-4}	$8,49 \times 10^{-4}$	111×10^{-4}
İzmir	$19,6 \times 10^{-4}$	$7,32 \times 10^{-4}$	107×10^{-4}
Konya	$14,5 \times 10^{-4}$	$5,04 \times 10^{-4}$	$75,6 \times 10^{-4}$

İnfüzyonu yapılan *U. dioica* kök örneklerinin toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik korelasyonu Şekil 3.10, 3.11'da verilmiştir. Isırgan otu köklerinin infüzyon örnekleri için; toplam fenolik madde içeriği ve toplam antioksidan kapasite korelasyonu CUPRAC yöntemi için 0,9408 (Şekil 3.10); ABTS yöntemi için 0,9812 (Şekil 3.11) olarak bulunmuştur.

Korelasyon eğrilerinin değerleri toplam fenolik madde içeriği ve toplam antioksidan kapasite sonuçlarının birbirleriyle örtüştüğü anlamına gelmektedir. Bu sonuçlar infüzyon yapılmış *U. dioica* kök örnekleri ile yapılan toplam fenolik madde içeriği ve toplam antioksidan kapasite deneylerinin güvenilirliği açısından önemli ve destekleyicidir



Şekil 3.10 : İnfüzyon yapılmış *Urtica dioica* kök örneklerinin Folin–CUPRAC korelasyonu.



Şekil 3.11 : İnfüzyon yapılmış *Urtica dioica* kök örneklerinin Folin–ABTS korelasyonu.

3.3. Örneklerin DNA Konsantrasyonları

MN-NucleoSpin® Bitki DNA izolasyon kiti kullanılarak *U. dioica* bitkisinin yaprak, gövde ve kök kısımlarından DNA izolasyonu yapılmıştır. Örneklerin Qubit

Florometre cihazında Quant-IT dsDNA BR Assay Kit kullanılarak yapılan DNA konsantrasyon ölçümleri Tablo 3.4'teki gibidir.

Tablo 3.4 : *Urtica dioica* bitkisinin yaprak, gövde ve kök kısımlarının florometrik DNA konsantrasyon ölçüm sonuçları.

KODLAMA	ŞEHİR	DNA KONSANTRASYONLARI (µg/ml)	
UD-1	Antalya	Yaprak	28,8
		Gövde	18,2
UD-2	Van	Yaprak	30,1
		Gövde	21,9
UD-3	Muğla	Yaprak	9,83
		Gövde	5,29
		Kök	5,00
UD-4	İstanbul (Anadolu)	Yaprak	33,7
		Gövde	33,5
UD-5	Ordu	Yaprak	25,2
		Gövde	5,48
		Kök	11,1
UD-6	Tekirdağ	Yaprak	20,7
		Gövde	7,63
		Kök	11,0
UD-7	Erzurum	Yaprak	69,1
		Gövde	11,8
		Kök	4,97
UD-8	Mersin	Yaprak	23,7
		Gövde	0,010
		Kök	1,81
UD-9	Tokat	Yaprak	32,7
		Gövde	4,65
		Kök	10,8
UD-10	İstanbul (Avrupa)	Yaprak	18,7
		Gövde	5,81
UD-11	İzmir	Yaprak	56
		Gövde	3,33
		Kök	12,6
UD-12	Konya	Yaprak	21
		Gövde	7,10
		Kök	3,12

3.4. RAPD-PCR Sonuçları

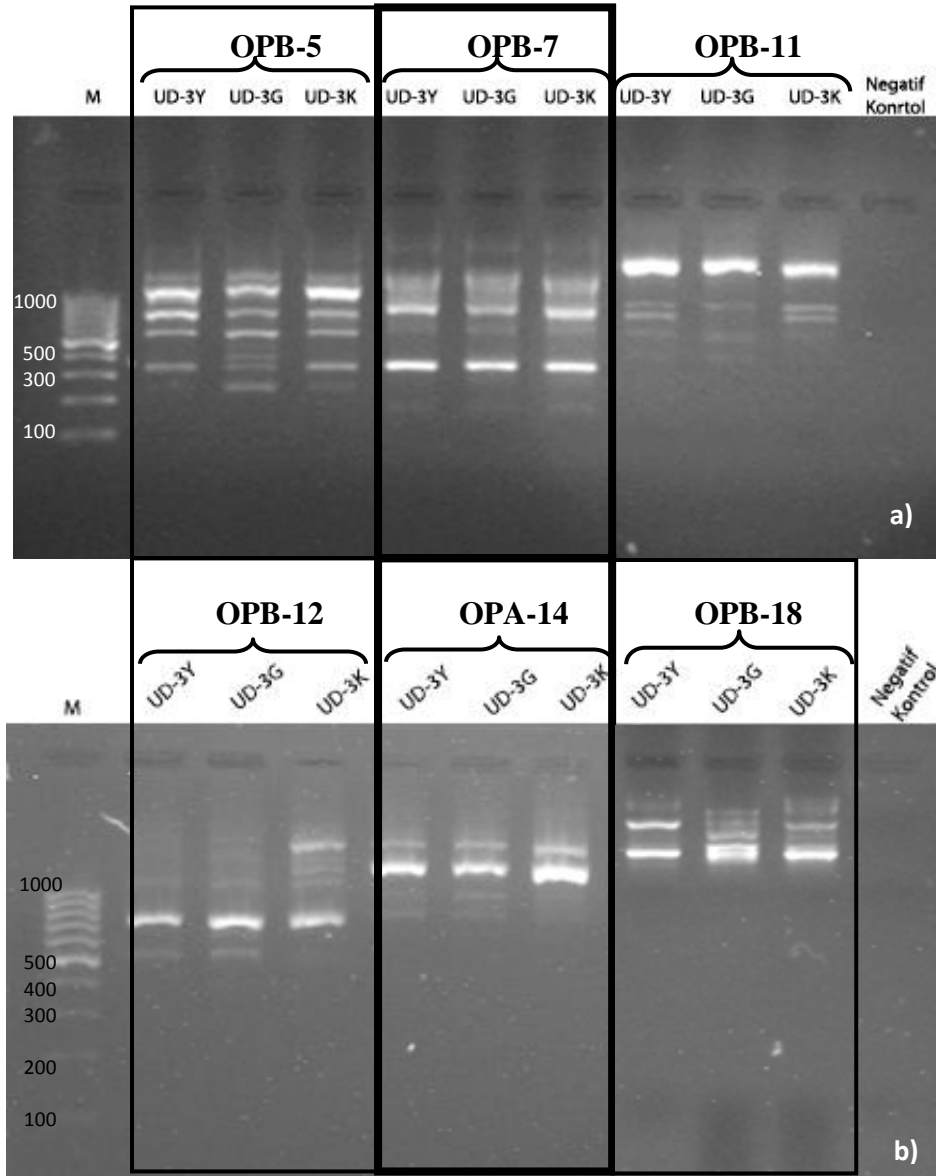
Atienzar ve Jha'nın 2006'da yaptığı çalışmada, aynı koşullar altında kullandığı 11 primer seti hayvan, bitki ve bakteriyel organizmalarda yüksek kalitede sonuçlar vermiş ve destekleyici benzer sonuçlar alındığı belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmada kullanılan primerler ile optimizasyona gerek duyulmamış ve aynı koşullar altında farklı DNA'lar ile yapılan RAPD-PCR sonuçlarından yüksek kalitede bantlar elde edilmiştir. Bu çalışmanın ışığında çalışmamızda kullandığımız bazı oligonükleotid primerler şunlardır; OPB-1, OPB-5, OPB-6, OPB-7, OPB-8, OPB-10, OPB-11, OPB-12, OPB-17.

Uzonur'un 2005 yılında *Mytilus galloprovincialis* ile yaptığı doktora çalışmasında kullandığı oligonükleotid primerlerden bazıları ise; OPA-8, OPA-9, OPA-14, OPA-18, OPB-18'dir. Bu primerler Uzonur'un bilgi ve danışmanlığında deneylerimizde kullanılmıştır.

Urtica dioica ile yapılan RAPD-PCR çalışmaları; tekrarlı ve her dokuda sonuç veren primerlerin belirlenmesi, dokular arası farklılıkları ve yine dokular arası korunmuş bölgeleri belirlemede kullanılarak primerlerin belirlenmesi ile devam edilmiştir.

Muğla örneğinin yaprak, gövde, kök DNA'ları kullanılarak 15 farklı primer ile RAPD-PCR yapılmıştır. Bu primerlerden 6 tanesi ile yapılan deney sonuçları Şekil 3.12-a,b'deki gibidir. Şekil 3.12-a,'da OPB-5, OPB-7, OPB-11 primerleri ve Muğla örneğinin yaprak, gövde ve kökleri ile yapılan RAPD-PCR sonuçları görülmektedir.

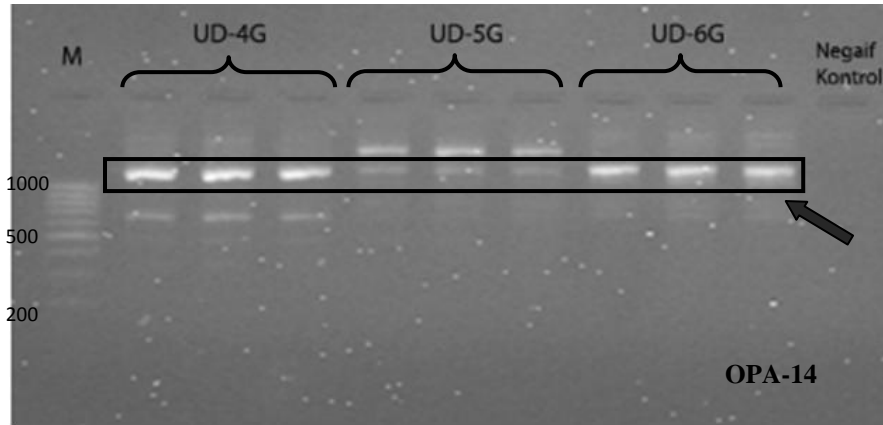
Şekil 3.12-b,'de ise Muğla örneğinin yaprak, gövde, kökleri ve OPB-12, OPA-14, OPB-18 primerleri ile yapılan RAPD-PCR'in amplifikasyon ürünlerinin % 2'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları görülmektedir.



Şekil 3.12-a,b: Muğla örneği ile belirtilen primerler kullanılarak yapılan RAPD-PCR sonuçları. Aynı bitkinin yaprak, gövde, kök kısımlarının DNA'sındaki benzerlik (OPB-7, OPA-14) ve farklılaşmalar (OPB-5, OPB-12, OPB-18) görüntülenmiştir. İlk kuyu (M) boy markörünü, son kuyu negatif kontrol örneğini göstermektedir.

Şekil 3.12-a,b'de OPB-5, OPB-12 ve OPB-18 primerleriyle elde edilen, aynı bitkinin yaprak, gövde, kök DNA'sından elde edilen RAPD profillerindeki farklılaşmalar görülmekte; OPB-7 ve OPA-14 primerlerinin monomorfik daha korunmuş bölgeleri gösterdiği düşünülmektedir.

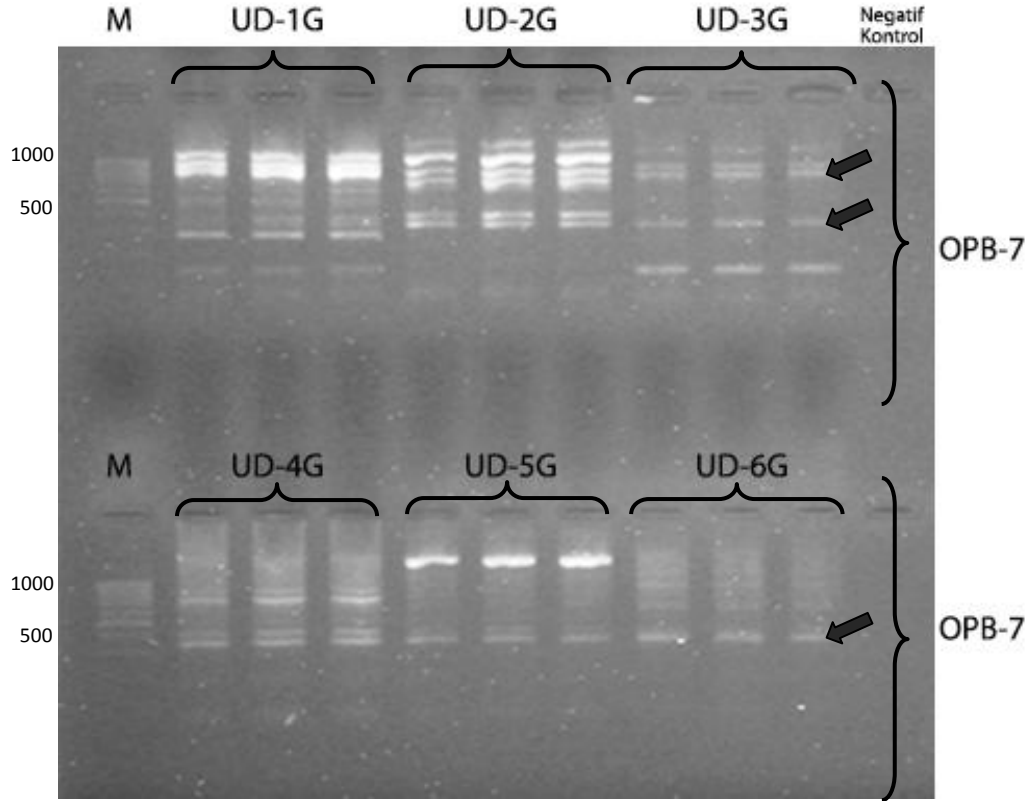
Kalıtım açısından büyük öneme sahip olan korunmuş bölgeler mutasyona uğramayan ve nesiller boyu değişmeden kalan gen bölgelerini temsil ediyor olabilir. OPA-14 ve OPB-7 primerleriyle ile yapılan RAPD-PCR amplifikasyonunda korunmuş bölgeleri ifade ettiği düşünülen sonuçlar göze çarpmaktadır. (Şekil 3.13, 14).



Şekil 3.13 : OPA-14 primeri kullanılarak İstanbul (Anadolu yakası), Ordu ve Tekirdağ gövde örnekleriyle yapılan amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyu (M) boy markörünü, son kuyu negatif kontrol örneğini göstermektedir.

Şekil 3.13'de ok ile gösterilen bandın İstanbul (Anadolu yakası), Ordu ve Tekirdağ *U. dioica* gövde örneklerindeki tür içinde korunmuş genom bölgelerini gösterdiği düşünülmektedir.

Şekil 3.14'de ısırgan otu genomunu korunmuş bölgeleri (RAMD -random amplified monomorphic DNA- bantları) varlığı ve birden fazla olabileceği oklarla gösterilmiştir.

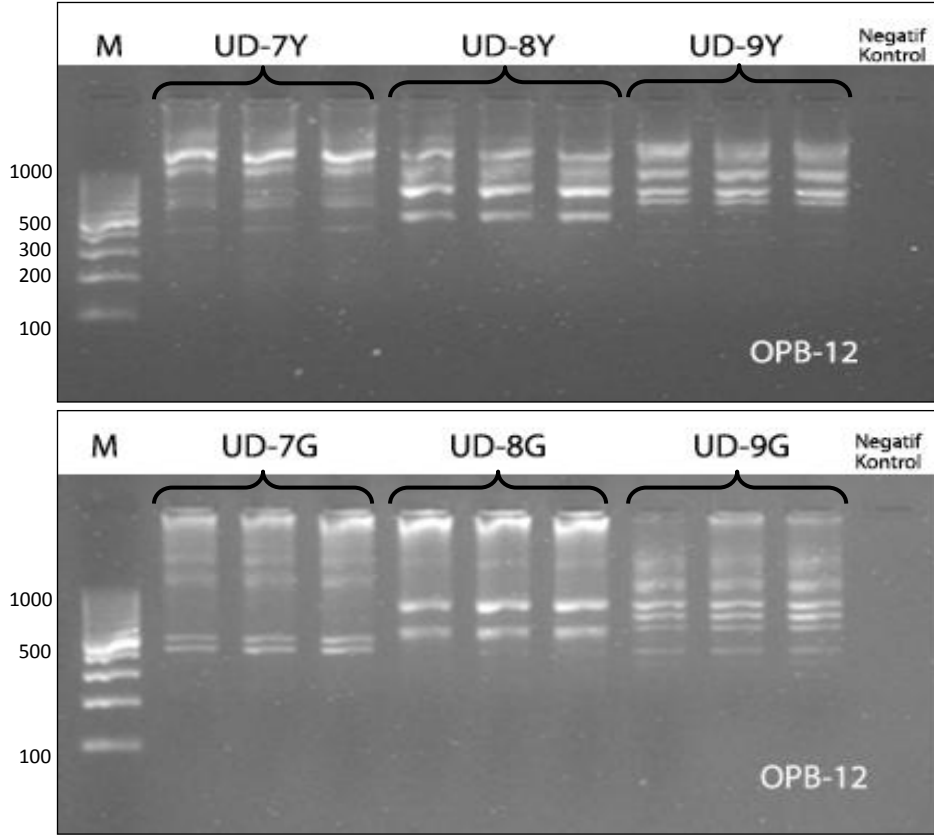


Şekil 3.14 : OPB-7 primeri ile sırasıyla Antalya, Van, Muğla, İstanbul (Anadolu yakası), Tekirdağ ve Erzurum gövde örnekleri ile yapılan RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyu (M) boy markörünü, son kuyu negatif kontrol örneğini göstermektedir.

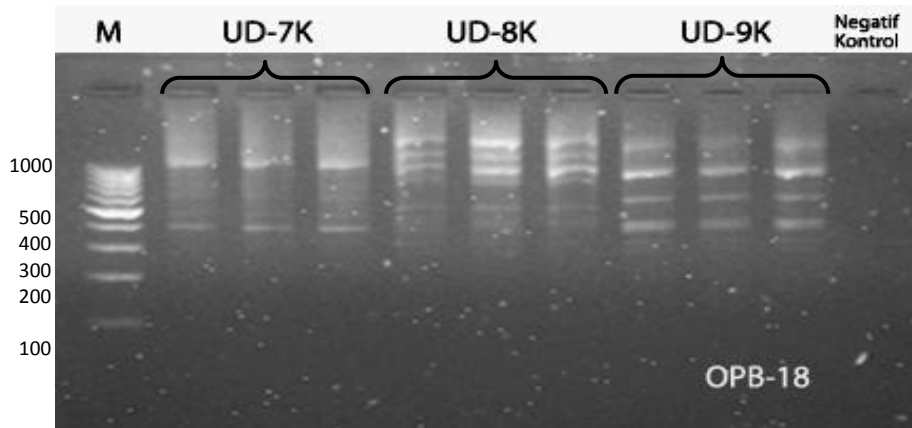
U. dioica genomundaki polimorfik bölgeleri ve değişkenlik gösteren bölgeleri incelemek amacıyla belirlenen primerlerden biri olan OPB-12 primeri ile x3'lü olarak yapılan RAPD-PCR sonuçları Şekil 3.15'de gösterilmiştir.

Şekil 3.15 incelendiğinde aynı örneklerin yaprak ve gövdelerinin RAPD-PCR profilindeki farklılıklar açık bir biçimde görülmektedir.

Genetik heterojenite varlığının incelenmesi için belirlenen diğer bir primer olan OPB-18 ile yapılan RAPD-PCR sonucu ise Şekil 3.16'te görülmektedir.



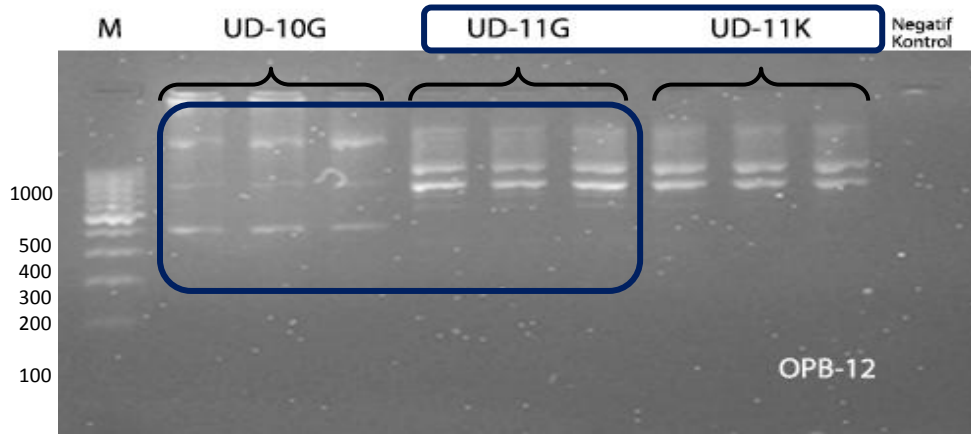
Şekil 3.15 : Erzurum, Mersin ve Tokat örneklerinin yaprak (a) ve gövde (b) kısımlarıyla yapılan RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyu (M) boy markörünü, son kuyu negatif kontrol örneğini göstermektedir.



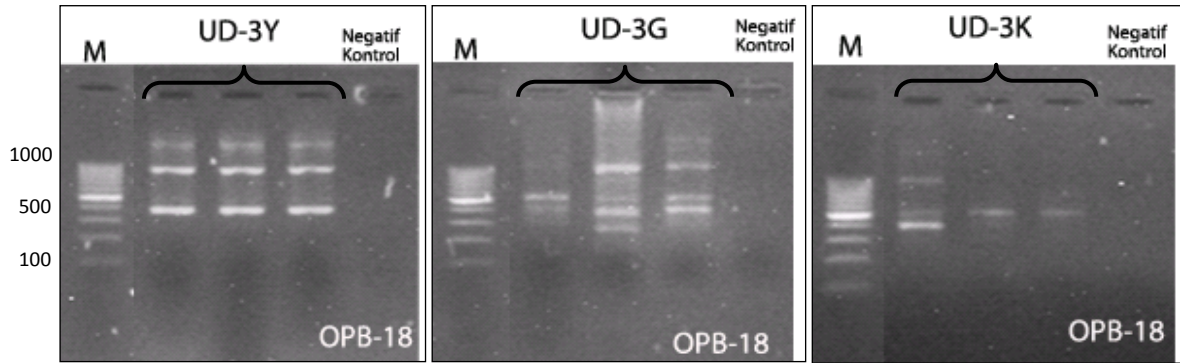
Şekil 3.16 : Erzurum, Mersin ve Tokat örneklerinin kök kısımları ile yapılan amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyu (M) boy markörünü, son kuyu negatif kontrol örneğini göstermektedir.

Erzurum, Mersin ve Tokat *U. dioica* örneklerinin kökleri ve OPB-18 primeriyle yapılan RAPD-PCR sonucunda tamamen farklı profil bantları elde edildiği görülmüştür.

Moleküler tür tayini yapılmış ısırgan otu örneklerinin genetik düzeydeki farklılaşmaları farklı boyutlarda olabilir. Adaptasyon, çeşitli mutajen ajanlar, kirlilik gibi faktörlerin etkisiyle DNA düzeyinde değişiklikler meydana gelebilir. Örneğin bireyin farklı kısımları incelendiğinde genetik düzeyde değişim görülmezken aynı türün farklı bölgedeki başka bir bireyi ile aralarında genetik düzeyde bir farklılık olabilir (Şekil 3.17), bireyin kısımları arasında farklılıklar oluşabilir (Şekil 3.18-a, b, c) ya da bu kısımlar kendi içerisinde de farklılıklar gösterebilir (Şekil 3.19, 20, 21).



Şekil 3.17 : İstanbul (Avrupa yakası) gövde, İzmir örneğinin gövde ve kök kısımları ile yapılan RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyu (M) boy markörünü, son kuyu negatif kontrol örneğini göstermektedir.

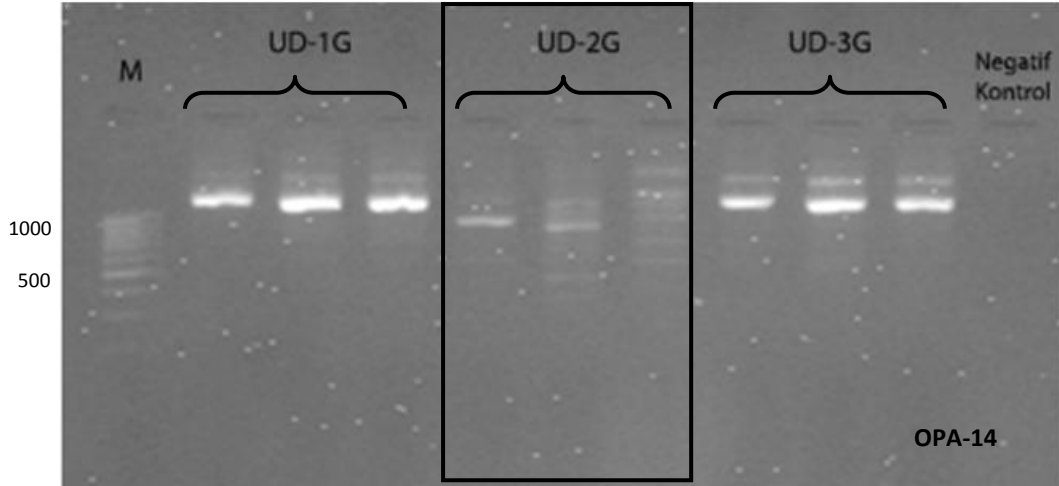


a)

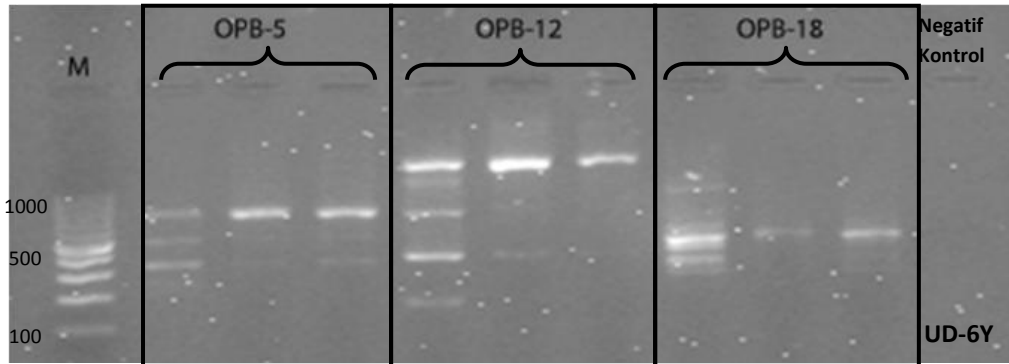
b)

c)

Şekil 3.18-a, b, c : Muğla örneğinin yaprak (a), gövde (b) ve kök (c) kısımlarının OPB-18 primeri ile yapılan RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyu (M) boy markörünü, son kuyu negatif kontrol örneğini göstermektedir.

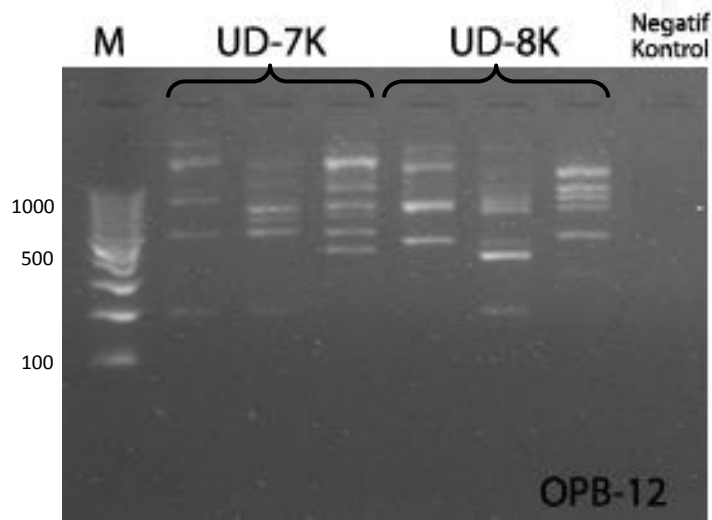


Şekil 3.19 : Van (UD-2G) örneğine ait gövdesin x3'lü RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyuda (M) boy markörü, son kuyuda negatif kontrol örneği vardır.



Şekil 3.20 : Tekirdağ (UD-6Y) örneğine ait yaprağın OPB-5, OPB-12 ve OPB-18 primerleri kullanılarak x3'lü RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyuda (M) boy markörü, son kuyuda negatif kontrol örneği vardır.

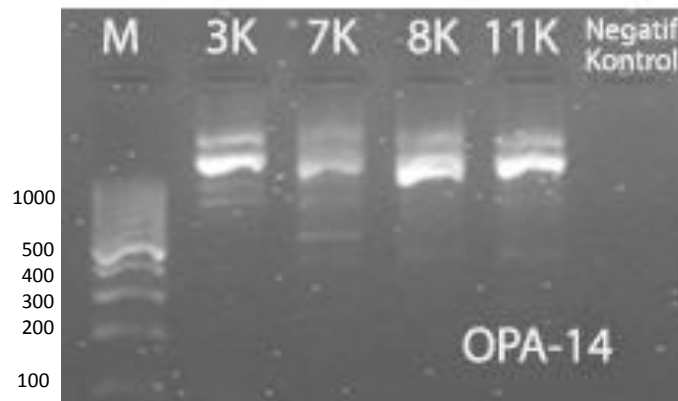
Genetik çeşitlilik ya da DNA'da farklılaşma (polimorfizm) diyebileceğimiz durum, populasyonların sürekli değişiklik gösteren çevrelerine adapte olabilmeleri için bir mekanizmadır. Genetik heterojenlik türlerin evrimsel adaptasyonları açısından çok olumlu bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. Yüzyıllardır çok farklı yayılış alanı ve farklı koşullarda yetişebilme özelliğine sahip olan ısırgan otunun genetik heterojenite ve genetik çeşitliliğinin çok yüksek olduğu düşünülmektedir.



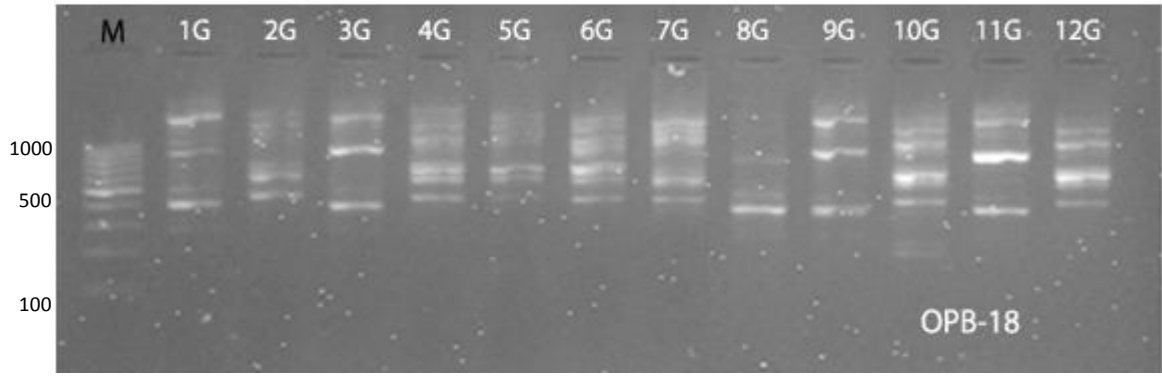
Şekil 3.21 : Erzurum ve Mersin örneklerine ait köklerin x3'lü RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyuda (M) boy markörü, son kuyuda negatif kontrol örneği vardır.

Tamamen aynı koşulları içeren x3'lü hazırlanmış RAPD-PCR sonuçlarında görülen bu değişimin bireylerin maruz kaldığı DNA hasarı oluşturan ajanlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

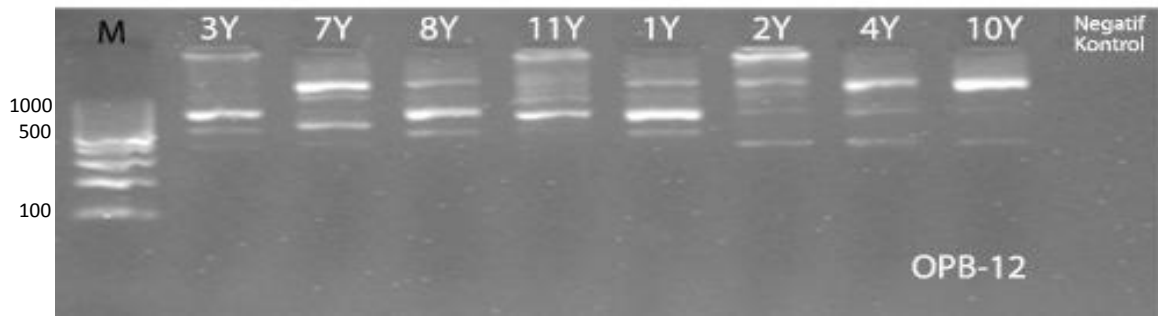
Çeşitli primerler ile yapılan RAPD-PCR sonuçlarına ait bulgular Şekil 3.22, 23, 24, 25'de verilmiştir. Şekil 3.23'de tüm *U. dioica* örneklerinin gövde kısımları ve OPB-18 primeriyle yapılan x1 RAPD-PCR sonucuna göre 12 örnek için 8 farklı RAPD profili gözlenmektedir.



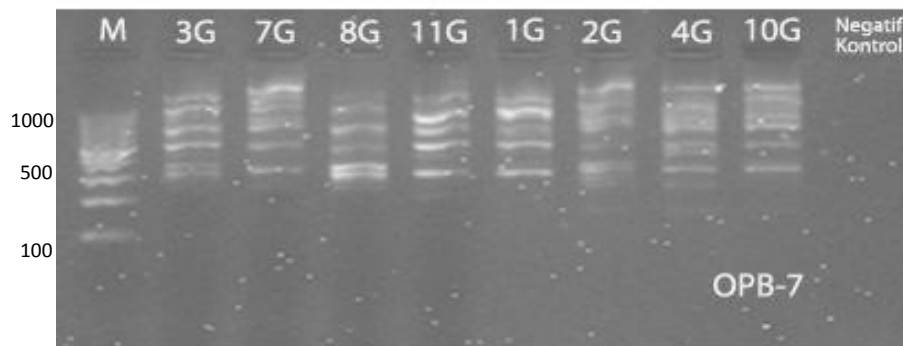
Şekil 3.22 : Sırasıyla Muğla, Erzurum, Mersin ve İzmir örnekleri ve OPA-14 primeri ile x1 hazırlanmış RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.



Şekil 3.23 : Tüm *Urtica dioica* örneklerinin gövdeleri ve OPB-18 primeriyle yapılan x1 RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. UD-1G, UD-2G..., UD-11G, UD-12G (Antalya, Van, Muğla, İstanbul (Anadolu), Ordu, Tekirdağ, Erzurum, Mersin, Tokat, İstanbul (Avrupa), İzmir, Konya) gövde örnekleridir.



Şekil 3.24 : Sırasıyla Muğla, Erzurum, Mersin, İzmir, Antalya, Van, İstanbul (Anadolu yakası) ve İstanbul (Avrupa yakası) örnek yaprakları ve OPB-12 primeri ile x1 hazırlanmış RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.



Şekil 3.25 : Sırasıyla Muğla, Erzurum, Mersin, İzmir, Antalya, Van, İstanbul (Anadolu yakası) ve İstanbul (Avrupa yakası) örnek gövdeleri ve OPB-7 primeri ile x1 hazırlanmış RAPD-PCR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı.

Tamamen aynı koşulları içeren x3'lü hazırlanmış RAPD-PCR sonuçlarında görülen bu değişimin bireylerin maruz kaldığı DNA hasarı oluşturan ajanlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Farklı DNA profillerinin gözlenmesinin nedeni heterojen genetik yapı ile ilgilidir. Ayrıca çeşitli primerler ile yapılan deneylerde de yüksek seviyedeki genetik heterojenite gözlenmektedir (Şekil 3.22, 23, 24, 25).

BÖLÜM 4

TARTIŞMA

Isırgan otunu çalışmamızda kullanmamızın temel amacı, yüzyıllardır tüm Dünya’da tedavide kullanılan bir bitki olmasıdır. Geniş yayılış alanına sahip olan ısırgan otu ülkemizde de hemen hemen şehirlerde yetişmektedir ve romatizmadan böbrek hastalıklarına, diyabetten kansere kadar geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Çalışmamızda bitkisel tedavide büyük öneme sahip ısırgan otunun moleküler tür tespiti yapılmış, şehirlerarası toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik miktarlarındaki değişim incelenmiş ve genetik yapısındaki çeşitlilik değerlendirilmiştir.

Morfolojik tür tespiti çalışmalarında destekleyici bir yöntem olarak moleküler tür tespiti çalışmaları da yapılmaktadır. Bu sayede kontrol edilemeyen ve gözden kaçan durumların ortadan kalkması ve istenmeyen sınıflandırma yanlışları engellenmiş olur.

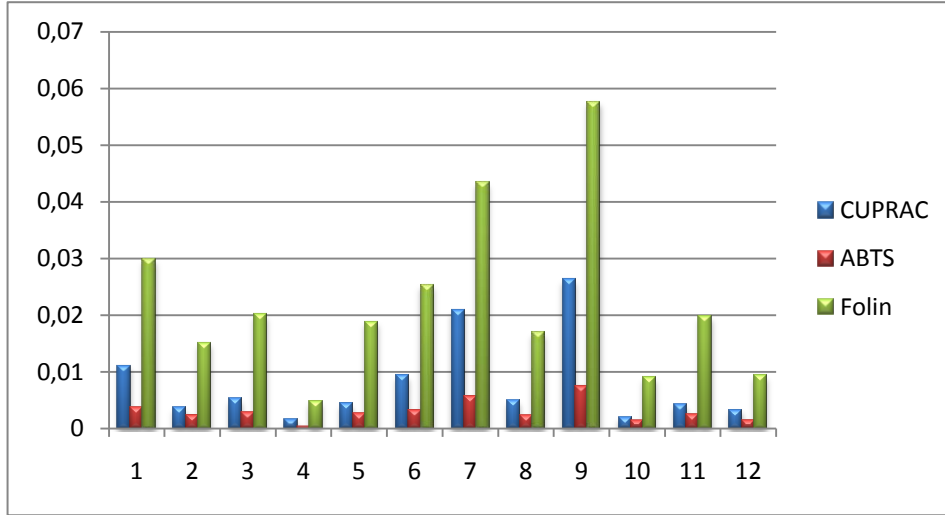
Moleküler tür tespiti için *Urtica dioica* genomuna ait primer seti NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Primer 3 (<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3>) ve Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/Default.aspx>) gibi online veritaban ve programları kullanılarak dizayn edilmiş ve 12 ısırgan otu örneğinin *U. dioica* türü olduğu ortaya konmuştur. Dizayn edilen primer ve sonrasında yapılan BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ile bu primerin doğru genoma ait olup olmadığı incelenmiş ve tüm sonuçlar *U. dioica*’ya ait olduğunu göstermiştir. Bu şekilde sürekli güncel tutulan ve oldukça güvenilir olan online pek çok siteden primer dizaynı yapılabilmektedir.

Uygun iklim şartları, hava ve su etmenlerinin temizliği gibi faktörler ile bitki gelişimi maksimum verim ile devam eder. Fakat çeşitli kirleticilerin bulunduğu, biyolojik ya da kimyasal stres oluşturan maddelerin varlığında bitkilerde genetik ve/veya fizyolojik anlamda değişiklikler olmaktadır. Fizyolojik değişiklikler ortam şartlarına uyum sağlamak için geri dönüşümlü olabileceği gibi genetik bir değişiklikten kaynaklanıyor da olabilir.

Çok farklı iklim ve şartlara uyum sağlayabilen ısırgan otu bitkisinde de kimyasal birtakım değişimler olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla 12 farklı ısırgan otu yapraklarının % 70 metanol ekstraktı ve infüzyon örnekleri ile CUPRAC, ABTS/HRP ve Folin–Ciocalteu deneyleri yapılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde genel olarak ısırgan otu yapraklarının infüzyon örneklerinin toplam antioksidan kapasite (CUPRAC yönteminde Antalya ve Tokat örnekleri, ABTS yönteminde Tokat örneği hariç) ve toplam fenolik madde içerikleri (Folin yönteminde Tokat hariç) % 70 metanol ekstraktına göre daha yüksek bulunmuştur.

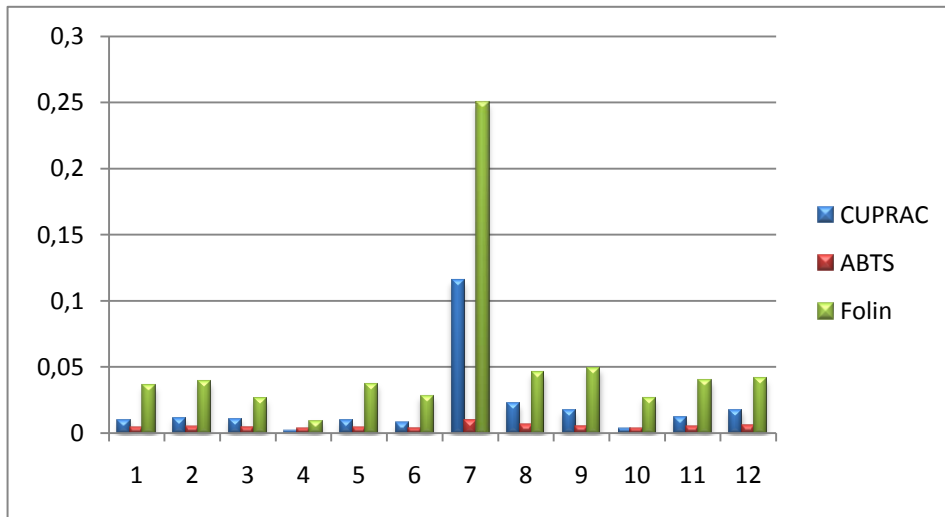
% 70 metanol ekstraktı yapılmış *U. dioica* yaprak örneklerinin CUPRAC (toplam antioksidan kapasite), ABTS (toplam antioksidan kapasite) ve Folin–Ciocalteu (toplam fenolik içerik) deneyinin sonuçları Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

Metanol ve infüzyon yapılan ısırgan otu örneklerinde en yüksek değeri veren şehirlerdeki sıralama farklılıkları metanol ve suda çözünen bileşiklerin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Genel olarak hem % 70 metanol ekstraksiyonunda hem de infüzyon örneklerinde en yüksek değeri veren şehir Erzurum’dur. Metanol ve infüzyon örnekleri ile yapılan tüm deneylerde en düşük değeri ise İstanbul Anadolu ve İstanbul Avrupa yakası örnekleri vermiştir. Bunun nedeninin İstanbul’daki sanayi ve kentleşmenin yüksek olmasından kaynaklanan kirliliğin fazlalığı olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden ısırgan otunun tüketimi sırasında ürünün yetişme yerinin öğrenilmesi kullanım sırasındaki verimin artması açısından oldukça önemlidir.



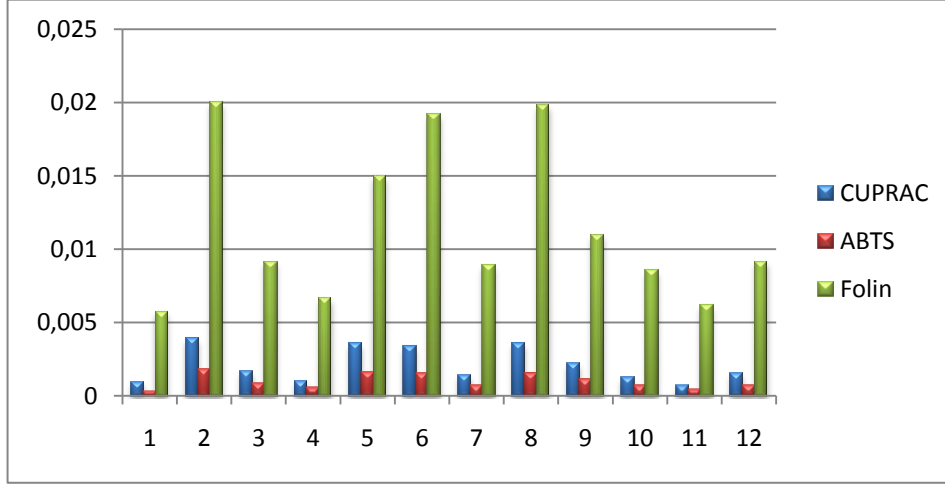
Şekil 4.1 : % 70 metanol ekstraktı yapılmış *U. dioica* yaprak örneklerinin toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik sonuçları. Örnekler sırasıyla 1, 2, 3, ... 11, 12: Antalya, Van, Muğla, İstanbul (Anadolu), Ordu, Tekirdağ, Erzurum, Mersin, Tokat, İstanbul (Avrupa), İzmir, Konya.

İnfüzyon yapılmış *U. dioica* yaprak örneklerinin CUPRAC (toplam antioksidan kapasite), ABTS (toplam antioksidan kapasite) ve Folin-Ciocalteu (toplam fenolik içerik) deneyinin sonuçları Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



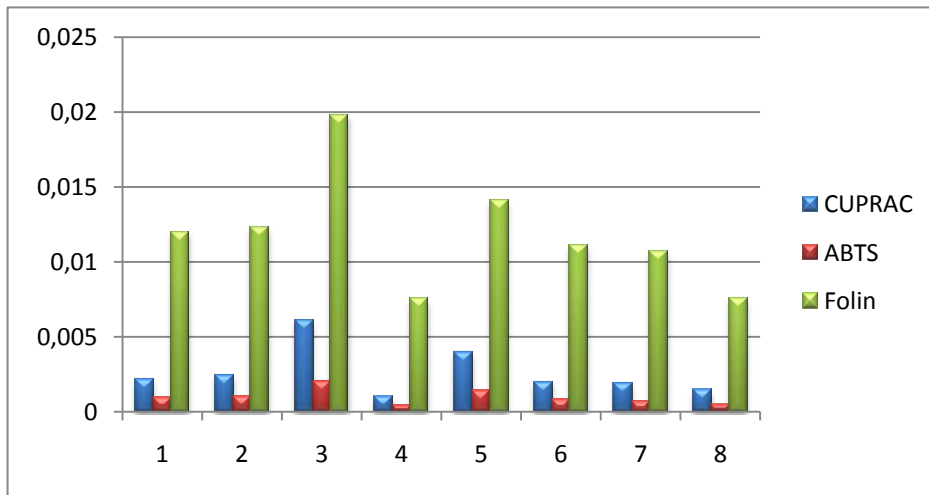
Şekil 4.2 : İnfüzyon yapılmış *U. dioica* yaprak örneklerinin toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik sonuçları. Örnekler sırasıyla 1, 2, 3, ... 11, 12: Antalya, Van, Muğla, İstanbul (Anadolu), Ordu, Tekirdağ, Erzurum, Mersin, Tokat, İstanbul (Avrupa), İzmir, Konya.

İnfüzyon yapılmış *U. dioica* gövde örneklerinin CUPRAC (toplam antioksidan kapasite), ABTS (toplam antioksidan kapasite) ve Folin–Ciocalteu (toplam fenolik içerik) deneyinin sonuçları Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3 : İnfüzyon yapılmış *U. dioica* gövde örneklerinin toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik sonuçları. Sırasıyla 1, 2, 3, ... 11, 12: Antalya, Van, Muğla, İstanbul (Anadolu), Ordu, Tekirdağ, Erzurum, Mersin, Tokat, İstanbul (Avrupa), İzmir, Konya.

İnfüzyon yapılmış *U. dioica* kök örneklerinin CUPRAC (toplam antioksidan kapasite), ABTS (toplam antioksidan kapasite) ve Folin–Ciocalteu (toplam fenolik içerik) deneyinin sonuçları Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4 : İnfüzyon yapılmış *U. dioica* kök örneklerinin toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik sonuçları. Örnekler sırasıyla 1, 2, 3, ... 7, 8: Muğla, Ordu, Tekirdağ, Erzurum, Mersin, Tokat, İzmir, Konya.

Folin-Ciocalteu yöntemine göre belirlenen toplam fenolik madde içeriği ABTS ve CUPRAC yöntemine göre daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni Folin yönteminin antioksidan karakterinde olmayan (şekerler gibi) bileşenler ile de reaksiyona girebilmesinden kaynaklanmaktadır.

Isırgan otu ile alakalı biyokimyasal deneylerden sonra genetik değişiklikler ile ilgili uygulamalar 3 aşamalı olmuştur. İlk aşamada FINNZYMES Phire® Bitki Doğrudan PCR Kiti kullanılarak *U. dioica*'ya yönelik tür tespiti yapılmıştır. Tüm örneklerin *U. dioica* olduğunun ortaya çıkarılmasından sonraki ikinci aşama, genetik çeşitliliğin değerlendirilmesinde Atienzar ve Jha, 2006; Uzunur 2005 çalışmaları ışığında 15 farklı oligonükleotid primerin denendiği RAPD-PCR aşamasıdır.

NucleoSpin® Plant II Kit kullanılarak izole edilen *Urtica dioica*'nın yaprak, gövde ve kök DNA miktarları incelendiğinde (Tablo 3.4) en yüksek toplam DNA konsantrasyonunun yaprak kısımlarından elde edildiği görülmektedir. Yaprakta bulunan kloroplast ve mitokondri organellerinin fazlalığının DNA konsantrasyonunun artmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Konsantrasyon sonuçlarımızdan elde ettiğimiz diğer bilgi ise genellikle kök kısımlarından gövde kısımlarına göre daha fazla DNA izole edilmiştir. Bu durum ise kökte bulunan meristematik hücrelerin yoğunluğunun fazla olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca gövdede bulunan bazı fenolik ve aromatik bileşiklerin DNA izolasyonunda inhibe edici özellik gösterebileceği düşünülmektedir.

Bu aşamada 12 *U. dioica* örneğine ait yaprak, gövde ve kök kısımları ile 15 farklı oligonükleotid primeri RAPD-PCR yapılmış ve monomorfik bölgelerin ve polimorfizm gösteren bölgeleri incelememizi sağlayan primerler belirlenmiştir. Monomorfik bölgeleri gösteren primerler; OPB-7 ve OPA-14 polimorfik bölgeleri gösteren primerler ise OPB-5, OPB-12 ve OPB-18 olarak belirlenmiştir. OPB-5, OPB-12, OPB-18, OPB-7 ve OPA-14 dışındaki oligonükleotid primerler ise birey içi ve bireyler arası değişim yada korunmuş bölge varlığının incelenmesi açısından yeterli görülmemiştir. Bunun nedeni devam eden deneylerde değişken sonuçlar vermesi en önemlisidir. Bunun yanında incelenen %2'lik agaroz jel fotoğrafındaki bantların silik olması, inceleme zorluğu gibi nedenler ile deneylere devam edilmemiştir.

Diğer primerler bazı örneklerde sonuç vermediği ve monomorfik bölgeler ile polimorfizm gösteren bölgeleri incelememizi sağlayacak sonuçlar vermediğinden devam eden deneylerde kullanılmamışlardır. Bu beş primer daha önceki çalışmalarda çeşitli bitki, hayvan ve bakteriyel canlılar (*Daphnia magna*, *Escherichia coli*, *Palmaria palmata*, *Platynereis dumerilii*, *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*) DNA'ları ile çalışılmıştır.

Uzun yıllar varolan ve çeşitli iklim koşullarına uyum sağlayabilen canlıların genetik polimorfizm oranlarının yüksek olduğu bilinmektedir. Bu yüksek oran değişen ortam şartları ya da olumsuz koşullar karşısında canlıyı hayatta tutabilecek bir özelliktir. Birey, yüzyıllardır gerçekleşen iklim değişiklikleri, toprak yapısındaki değişiklikler ya da sanayi ve nüfusun artması ile gerçekleşen çevre kirliliklerine karşı dirençli hale gelebilir. Bu da genetik düzeyde gerçekleşen birtakım değişiklikler ile mümkün olmaktadır.

İşte bu amaçla canlılar ya da bireyler arasındaki farklılaşmayı net bir biçimde görmemizi sağlayan RAPD-PCR yöntemi geliştirilmiştir. Genetik heterojenlik ya da monomorfik bölge incelemeleri de dahil olan tüm RAPD-PCR uygulamalarında tekrarlanabilirliğinin düşük olması bir dezavantajdır. Kullanılan malzemelerdeki küçük değişiklikler, pipetleme hatası hatta oda sıcaklığının farklı olmasına duyarlılığı RAPD-PCR tekrarlanabilirliğine olan güveni azaltmaktadır. Çalışmamızda, her RAPD-PCR sonucu kendi içerisinde değerlendirildiğinden, farklı PCR sonuçlarına ait genetik haritalardaki farklılıklar göz önünde bulundurulmaz. Bu da RAPD-PCR ile gelen bu problemi ortadan kaldırmaktadır.

Şekil 3.13, 14'de OPA-14 ve OPB-7 primerleri ve *U. dioica* gövde örnekleri ile yapılan RAPD-PCR sonuçlarında monomorfik bantların varlığı ve birden fazla olabileceği görülmüştür. Korunmuş bölgeleri ifade ettiği düşünülen bu bantlar canlı için hayati öneme sahip bölgelere ait olabilir. Tıbbi tedavide geniş kullanım alanına sahip olan ısırgan otunun böyle bölgelere sahip olduğunun tam olarak söylenebilmesi için birtakım destekleyici çalışmalara (sekans analizi gibi) ihtiyaç vardır.

Yüzyıllardır var olduğu bilinen ve Dünya üzerinde geniş yayılış alanına sahip olan ısırgan otunun değişik ortam şartlarına uyum sağlamasının en önemli nedeninin

moleküler düzeyde ortaya çıkan değişimlerden kaynaklandığı düşünölmektedir. Bu nedenle yeryüzünün farklı iklimlerine sahip olan bölgelerinden alınan ısırgan otu örneklerinde farklılaşmaların olması kaçınılmazdır. Ayrıca mutajen ajanların varlığı, olumsuz iklim şartları, kirlilik gibi durumlarda da genetik değişiklik görölmektedir ve bu değişikliğin seviyesi bu tür mutajenlerin seviyesine göre farklılık göstermektedir. Örneğin Şekil 3.17’de olduğu gibi bireyler arası polimorfizmin bulunduğu *Urtica dioica* örneklerinde birey içi (yaprak-gövde-kök) farklılık gözlenmeyebilir. Bu durumda mutasyonun olduğu fakat birey içi değişime sebep olacak düzeyde olmadığı ve bireyi genetik olarak değişikliğe uğratacak şartların derecesi bitkinin farklı kısımlarındaki farklılaşmayı belirlediği düşünölmektedir.

Şekil 3.18-a,b,c incelendiğinde Muğla örneğine ait RAPD-PCR sonuçları görölmektedir. Aynı primer kullanılarak yapılan bu deneylerde yaprak ve gövde kısımlarının RAPD profillerinin kısmen de olsa birbirine benzediği fakat kök kısmının büyük oranda farklılık gösterdiği görölmüştür. Aynı şartlar altında hazırlanan RAPD-PCR sonuçlarındaki bu değişim bitkinin mutajen ajanlara maruz kalan kısmı ile ilgili yorum yapmamızı sağlamıştır. Buna göre; bitkide kök kısmının stabil olarak bulunduğu toprak ve su gibi faktörler ile ilgili bir kirleticinin olduğu düşünölmektedir.

Tüm bunlara ek olarak x3’lü olarak hazırlanan RAPD-PCR örneklerinde görölen farklılıklar ise maruz kalınan mutajenite seviyesi hakkında bilgi vermektedir. Aynı bitkinin belli bir kısmına ait olan DNA’nın tamamen aynı olmasını beklenirken ortaya çıkan farklılık mutasyonun ne kadar ciddi boyutlarda olduğunun bir göstergesidir. Ayrıca bu mutajenlerin bitkinin belli bir kısmında değil tüm kısımlarını eşit derecede etkilediği de görölmüştür.

X1 olarak hazırlanan RAPD-PCR sonuçlarını gösteren %2’lik agaroz jel fotoğrafı incelendiğinde de bireyler arasındaki mutasyonlar net bir biçimde görölmektedir. OPB-18 ve OPB-12 primerleriyle yapılan deney sonuçlarında görölüyor ki tüm örneklerin *U. dioica* olmasına rağmen bireylerin hiçbiri birbirinin aynı olan sonuç vermemiştir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda çevrenin DNA düzeyinde etkileri ve bu etkilerin fizyolojik yansımalarının potansiyelinin ilişkilendirilmesinden önce *U. dioica*'nın içsel genetik heterojenitesinin değerlendirilmesi için RAPD-PCR yöntemi kullanılmıştır. RAMD olarak adlandırılan total DNA'nın RAPD yaklaşımıyla türe özgü monomorfik bölgeleri ve yüksek heterojenite gösteren değişken bölgeleri incelenmiştir.

İlk olarak genetik çeşitliliğin incelenmesi, daha sonra genetik heterojenitenin düzeyi ve bunların sebeplerini anlamak için daha spesifik metodlar uygulanmalıdır.

Sonuçlarımıza göre *U. dioica*'nın poliformizm gösteren genetik heterojeniteye sahip olduğunu göstermiştir. Tıbbi açıdan geniş etki mekanizması olan *U. dioica*'nın tüm genom sekansının çalışılması açısından önemli bir ön hazırlık olmuştur.

Genetik ve moleküler düzeyde yeterli çalışma bulunmayan *U. dioica* gibi tıbbi açıdan önemli olan bitkilerin etkin kullanımında ön çalışma olarak önemlidir.

Sonraki çalışmalarda, monomorfik bölgelerin sekans çalışmalarının tamamlanmasından sonra korunmuş bölgelerin gen haritaları çıkartılarak rekombinant DNA teknolojisi ile yararlı sekansların çoğaltılması ve ilaç üretimi mümkün olabilmektedir.

RAPD-PCR profillerinde görülen değişim göz önüne alındığında, bu değişimin bulunduğu ortam uyum amaçlı mı gerçekleştiği ya da herhangi bir kirletici ajan ile mi olduğu konusu bir netlik kazanmaz. Bunun yanında gerçekleşen polimorfizmin bitkinin fizyolojik yapısında nasıl bir değişiklik oluşturduğu, tıbbi açıdan yararlı olan etki mekanizmalarındaki değişim (azalma ya da artma), kimyasal, biyokimyasal ya da

biyolojik yapılarındaki değişim tek başına RAPD-PCR yöntemi ile sonuca ulaştırabileceğimiz bir yol değildir.

Yılın iki ayrı döneminde toplanan ısırgan otunun toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik değerleri incelendiğinde en yüksek sonucun alındığı şehirlerin genel olarak ilkbahar döneminde toplanan bireylere ait olduğu görülmüştür. % 70 metanol ekstraktı ve infüzyonu yapılan tüm örneklerde ise genel olarak İstanbul Avrupa-Anadolu yakası örnekleri en düşük değerleri vermiştir. Tüm bu sonuçların ışığında ısırgan otunun tedavi amaçlı kullanımını sırasında İstanbul şehrinde yetişmemiş ve ilkbahar döneminde toplanan bitkinin kullanılması istenilen sonucun alınması açısından önem taşımaktadır.

Doğada yabani olarak da yetişebilen türlerden biri olan *U. dioica* için toksikolojik takiplerin yapılması söz konusu değildir. Fakat tarımının yapılması durumunda; kimyasal içeriğinin zenginliği, kolay yetiştirilebilirliği ve bitkinin tüm kısımlarının tıbbi açıdan büyük öneme sahip olması ve bunlara ek olarak verimsiz tarım arazilerinin tekrar kullanılabilirliğine olanak sağlayabilir.

REFERANSLAR

Abu-Amsha, R., Croft, K. D., Puddey, I. B., Proudfoot, J. M., Beilin, L. J., Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clinical Science*, 91, 449-458, 1996.

Agarwal, C., Singh, R.P., Dhanalakshmi, S., Agarwal, R., Anti-angiogenic efficacy of grape seed extract in endothelial cells. *Oncology*. 681-685, 2003.

Ağaoğlu, Ö., Kafkasya karışık ılıman yağmur ormanı ve yüksek alpin çayırları, t.c. orman ve çevre bakanlığı doğa koruma ve milli parklar genel müdürlüğü gef 11 proje müdürlüğü. *Biyolojik Çeşitlilik ve Doğal Kaynak Yönetimi Projesi*, 2004.

Aka, G. E., Balıkesir çevresinde doğal yayılış gösteren “zarar görebilir” kategorisindeki *Lilium candidum* L. (Liliaceae)’da RAPD tekniğini kullanarak genetik çeşitliliğin belirlenmesi ve koruma stratejilerinin geliştirilmesi. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. 2005.

Alpsoy, L., Uzonur, I., Sakçalı, M. S. and Karaman, S., Antioxidant and antimutagenic activities of *Viscum album* fruit ethanolic extract in human lymphocytes. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9, No. 17, 2539-2543, 2010.

Altun, R. Ve Özden A., Tamamlayıcı ve alternatif tıp. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Güncel Gastroenteroloji 8/3, 2004.

Arvoet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., Legret, P., Standardisation d’un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49, 462-468, 1994.

Arif, İ.A., Bakir, M. A., Khan, H. A., Farhan, A. H., Homaidan, A. A., Bahkali, A. H., Sadoon, M., Shobrak, M., A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 2079-2096, 2010.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., Novel total antioxidant index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem.* 29;52(26):7970-81, 2004.

Atienzar, F. A. and Jha, A. N., The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutat Res* 613, 76-102, 2006.

Avcı, M., Çeşitlilik ve endemizm açısından Türkiye'nin bitki örtüsü. *Coğrafya Dergisi*, Sayı:13, 27-55, 2005.

Ayan, A. K., Çalışkan Ö., Çırak C., Isırgan otu (*Urtica Spp.*)'nun ekonomik önemi ve tarımı. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 21(3): 357-363, 2006.

Baytop, A., *Farmasötik Botanik*, İstanbul Üniv. Yayınları, 3158, İstanbul, 1983.

Baytop, T., Türkiye'nin tıbbi ve zehirli bitkileri. İsmail Akgün Matbaası, İstanbul, Türkiye, 258-259, 1996.

Baytop, T., Türkiye'de bitkiler ile tedavi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 480s., 1999.

Bell, J. R. C., Donovan, J. L., Wong, R., Waterhouse, A. L., German, J. B., Walzem, J. R., (+) Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *American Journal of Clinical Nutrition*. 71, 103- 108, 2000.

Bharmauria, V., Narang, N., Verma, V., Sharma, S., Genetic variation and polymorphism in the Himalayan nettle plant *Urtica dioica* based on RAPD marker. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 3(3), pp. 166-170., 2009.

Bothmer, R., Van., Jacobsen, N., Baden, C., Linde-Laursen, I., Jorgessen, R. B., An ekogeographical study of the genus hordeum. systematic and ecogeographic studies on crop genopools. 7. Int. Board for Plant Genetic Resources, Rome, 1991.

Botstein, D., White, R., Skolnick, M. and Davis, R. W., Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Of Human Genet.*, 32; 314-331, 1980.

Budak, H., Bolek, Y., Dokuyucu, T., Akkaya, A., Potential uses of molecular markers in crop improvement. *KSU Journal of Science and Engineering*, 7(1), 75-79, 2004.

Cadenas, E., Packer, L., *Handbook of antioxidants*. Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5, 2002.

Cao, G., Prior, R. L., In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1173-1181, 1999.

Cetinus, E., Kılınç M, İnanç F, Kurutaş E. B, Buzkan N. The role of *Urtica dioica* (Urticaceae) in the prevention of oxidative stress caused by tourniquet application in rats. *Tohoku J Exp Med.*, 205: 215–221, 2005.

Chen K., A Guide to the John William Harshberger, 1869 – 1929 Papers, 1886 – 1929. Pennsylvania University University Archives and Records Center, 1996.

Cook, N. C., Samman, S., Flavonoids –Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76, 1996.

Cul, J., Juhasz, B., Tosaki, A., Cardioprotection with grapes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 40, 762-769, 2002.

Çelebi, S., Değişik konsantrasyonlarda nitrat içeren hoagland çözeltilerinde yetiştirilen *Urtica dioica* L. bitkilerinde nitrat birikimi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2001.

Çöllü Z., *Urtica pilulifera* L. bitkisinin antioksidan aktivitesinin araştırılması, Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2007.

Çulcu, T., İnsan hücrelerindeki DNA hasar ve mutasyonlarının RAPD tekniği kullanılarak araştırılması. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2007.

Doğaç E., Türkiye’deki relict endemik sığla ağacı (*Liquidambar Orientalis* Mill. var. *Orientalis* ve *L. Orientalis* Mill. var. *İntegriloba* Fiori) populasyonlarındaki genetik çeşitliliğin RAPD (Rastgele üretilen polimorfik DNA) belirteçleri yardımıyla belirlenmesi. Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2008.

Dilsiz, N., Moleküler Biyoloji, Palme yayıncılık, Ankara, 61-3, 2004.

Ercişli, S., Agar G., Orhan E., Yıldırım N., ve ark., Interspecific variability of RAPD and fatty acid composition of some pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) growing in southern anatolia region in Turkey. *Biochem. Syst. Ecol.* 35: 764-769., 2007.

Ergüden, D., Türkiye denizlerindeki tirsilerin (*Alosa* spp.) moleküler sistematigi, Su Ürünleri A.B.D. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, 2007.

Erlich, H. A., Gelfald D., Sninsky I., Recent advances in the polymerase chain reaction, *Science*, 252, 1643-1650., 1991.

Eröztürk, N., Bir yudum sağlık, Anahtar Yayınları, İstanbul, 2000.

Ertuğ, F., An ethnobotanical study in central Anatolia (Turkey), *Economic Botany* 54(2) pp. 155–182, 2000.

Fijalek, Z., Soltzyk K., Lozak A., Kominek A., Ostapczuk P., Determination of some micro- and macroelements in preparations made from peppermint and nettle leaves. *Pharmazie*. 58: 480–482, 2003.

Gao, I., Mazza, G., Characterization quantitation and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries. *J. Agric. Food Chem.* 43 (2), 343-346, 1995.

Girotti S., Ferri E., Maccagnani L., Budini R., Bianchi G., Plasma Antioxidant Capacity Determination: Comparative Evaluation of Chemiluminescent and Spectrophotometric Assays. *Talanta*, 56, 407-414, 2002.

Güçlü, K., Sözgen, K., Tütem, E., Özyürek, M., Apak, R., Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceutical. *Talanta*, 65, 1226-1232, 2005.

Gülçin, I., Kufrevioglu O., Oktay M, Büyükokuroğlu M., Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J Ethnopharmacol.* 90: 205–215, 2004.

Güngör, N., Spektrofotometrik CUPRAC yönteminin tiyol grubu içeren antioksidan bileşiklere uygulanması. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2009.

Heller, W., Forkmann, G., Biosynthesis of flavonoids, the flavonoids: Advances in research since 1986. Chapman & Hall, London, 499-535, 1993.

Işık, K., Biyolojik çeşitlilik, Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayınları, 1997.

Işık, F. E., Edirne bölgesinde yetişen *Trifolium resupinatum* L. var. *Microcephalum* bitkisinin fitokimyasal incelenmesi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 2005.

Kav, S., Hanoğlu Z., Algier L., Türkiye’de kanserli hastalarda tamamlayıcı ve alternatif tedavi yöntemlerinin kullanımı. literatür taraması. *International Journal Of Hematology And Oncology*, 1,18, 2008.

Kavaklı, Ş., Farklı büyüme gücündeki bazı idris (*Prunus Mahaleb* L.) tiplerinin RAPD tekniği ile moleküler tanımlamaları. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2006.

Keevil, J. G., Hashim, E. O., Reed, J. D., Folts, J. D., Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *Journal of Nutrition.* 130, 53-56, 2000.

Kekeç, G., Sakçalı, M. S., ve Uzonur, I., Assesment of genotoxic effects of boron on wheat (*Triticum aestivum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using

RAPD analysis. Bulletin of Environmental Contaminaton & Toxicology 84: 759-764, 2010.

Kence, A., Türkiye'nin biyolojik zenginlikleri (Giriş), 2005.

Kılıçoğlu, M. Ç., Özkoç, İ., Fungal sistematikteki moleküler gelişmeler. OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 23(1), 65-72, 2008.

Kızıllarlan, C., İzmit körfezi'nin güney kesiminde etnobotanik bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2008.

Koç, A., Akbulut M., Orhan E., Çelik Z., ve ark., Identification of Turkish and standard apple rootstocks by morphological and molecular markers. Genet. Mol. Res. 8: 420-425., 2009.

Koç, H., Bitkilerle sağlıklı yaşama, G.O.P. Üniversitesi. Tokat. Ümit Ofset Basımevi Ankara. 388s, 2002.

Konrad, L., Müler, H. H., Lenz, C., Laubinger, H., Aumüller, G., Lichius, J. J., Antiproliferative effect on human prostate cancer cells by stinging nettle root (*Urtica dioica*) extract. Planta Medica, 66: 44–47, 2000.

Karaman, Ş., Türkiye'de yetiştirilen bazı elma çeşitlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin ve antioksidan özellik gösteren başlıca bileşenlerinin karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi Kimya Bölümü Yüksek Lisans Tezi, 2008.

Koyuncu, F., Marmara denizi biyoindikatör türleri için moleküler tayin anahtarı oluşturma. Fatih Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, 2010.

Leporatti, M. L., Corradi, L., Ethnopharmacobotanical remarks on the province of Chieti town (Abruzzo, Central Italy). Journal of Ethnopharmacology, 74: 17–40, 2001.

Mart, S.,.. Bahçe ve Hasanbeyli (Osmaniye) halkının kullandığı doğal bitkilerin etnobotanik yönden araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006.

Miller, N. J., Rice Evans, C. A., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A., A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412, 1993.

Miraldi, E., Ferri, S., Mostaghimi, V., Botanical drug an preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). Journal of Ethnopharmacology, 75:77–87, 2001.

Nychas, G. J. E., Tassou, C. C., Skandamis, P., Making the most of herbs, spices and their active components. In: S. Roller (Ed.). Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. 176-200, 2003.

Özhatay, N., Byfield, A., Hatay, S., Türkiye'nin 122 önemli bitki alanı. Doğal Hayatı Koruma Yayınları (WWF)., 2005.

Özyürek, M., Güçlü, K., Bektaşoğlu, B., Apak, R., Spectrophotometric determination of ascorbic acid by the modified CUPRAC method with extractive separation of flavonoids–La(III) complexes. *Analytica Chimica Acta* 588 88–95, 2007.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., Shahabimajd, N., Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (11), pp. 1142-1145, 2006

Rao, K. N., Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnolog. *African J. Of Biotechnology*, Vol.3(2), Pp 136-145, 2004.

Rubio-Moraga, A., Castillo-Lopez, R., Gomez-Gomez, L., ve Ahrazem, O., Saffron is a monomorphic species as revealed by RAPD, ISSR and microsatellite analyses. *BMC research notes* 2: 189, 2009

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N., Enzymatic amplification of beta- globulün genomic secuencias ve restriction site analysis for diagnosis of sickle anemia. *Science*, 230, Pp.1350-1354, 1985.

Sanchez, C. M., Polyphenolic fractions from Wine by-products as potential antitumoral and/or protective agents against UV damage. Doktora tezi. Barcelona Kimya Araştırma Enstitüsü, 2006.

Seçmen, O., Gemici Y., Görk G., Bekat L., Leblebici E., Tohumlu bitkiler sistematiği. Ege Üniversitesi Basımevi, 181-182, 2004.

Seçmen, Ö., Türkiye florası (ders notları). Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı İşleri, 2004.

Serafini, M., Laranjinha, J. A. N., Almeida, L. M., Mainai, G., Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 11, 585-590, 2000.

Singleton, V. L., Rossi, J. A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158, 1965.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178, 1999.

Sözgen, K., Çekiç, S. D., Tütem, E., Apak, R., Spectrophotometric total protein assay with copper(II)-neocuproine reagent in alkaline medium. *Talanta*, 68, 1601-1609, 2006.

Svenning, J., Skov, F., The relative roles of environment and history as controls of tree species composition and richness in europe. *Journal Of Biogeography* 32(6): 1019-1033, 2005.

Tahir, K. M., Beyond conservation: the role of tfnet in sustainable utilization of native tropical fruit species. In Mai, B., Ramamani, Y.S., Rao, V.R. (Ed) Conservation and use of native tropical fruit. *Species Biodiversity In Asia* Pp 21-22. Proceeding of the third annual meeting of tropical fruit genetic resources project, Chongqing, China 25-28 March, 2003.

Telo, S., Meme kanseri oluşturulan ratlarda ısırgan otunun antioksidan enzimler üzerine etkilerinin incelenmesi. Fırat Üniversitesi Biyokimya Ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2006.

Towsend, C. C., Davis, P. H., *Flora of Turkey*. Vol. 7,633-636, 1982.

Tütem, E., Apak, R., Günaydı, E., Sözgen, K., Spectrophotometric determination of vitamin E (α -tocopherol) by the copper(II)-neocuproine reagent. *Talanta*, 44, 249-255, 1997.

Uzonur, I., Abasıyanık, M. F., Cam, S., Çobanlı, K., Elmas, A., Erdoğan, H., Hizal, S., Karabulut, D. S., Özdemir, M., Yeşil, F. A., ve Petek, M., A preliminary report on target organ genotoxicity biomonitoring by an 'Improved Random Amplified Polymorphic DNA Assay'. *Fres. Environ. Bull* 13, 12a, 1453-1456, 2004.

Uzonur, I., Genotoksik tesirin *Mytilus galloprovincialis*'de geliştirilmiş RAPD-PCR yöntemi ile takibi. İstanbul Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Ens., Doktora Tezi, 2005.

Varol, İ., Bazı turunçgil türlerinde embriyogenik kallusların *in vitro* muhafazası ve genetik kararlılıklarının RAPD markırları ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 2007.

Visioli, F., Galli, C., Olive oil polyphenols and their potential effects on human health. *J.Agric. Food Chem.* 4292-4296, 1998.

Vural, H. C., Dağeri, A., Optimization of DNA isolation for RAPD-PCR analysis of selected (*Echinaceae purpurea* L. Moench) medicinal plants of conservation concern from Turkey. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 3(1), pp. 016-019., 2009.

Weissing, K., DNA fingerprinting plants and fungi. CRC Press, USA, 1995.

Welsh, J., Mc Clelland, M., Fingerprinting genome-using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res., 18, 7213-7218, 1990.

Williams, J. G. K., Kublık, A. R., Lıvık, K. J., Rafalsk1, J. A., Tingey, S. V., DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18, 6531–6535, 1990.

Yavuz, T., Aslan, D., Güner, G. Ve Kutay, F.Z., Tıbbi laboratuarlarda standardizasyon ve kalite yönetimi. Türk Biyokimya Derneği Yayınları, 2002.

Yesbek, A., *T. Dicoccoides* ve *T. Dicoccon* türleri arasındaki genetik çeşitliliğin RAPD-PCR tekniği ile belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2007.

Yıldırım1ı, Ş., Etnobotanik ve Türk etnobotaniği. Kebikeç-İnsan Bilimleri İçin Kaynak Araştırmaları Dergisi; 17: 175-193, 2004.

Yıldız, L., Bazı bitki örneklerinde antioksidan kapasitenin spektrofotometrik ve kromotografik tayini. İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fak., Kimya Bölümü Analitik Kimya A.B.D., Yüksek Lisans Tezi, 2008.

Yıldız, L., Başkan K. S., Tütem E., Apak R., Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and netle. Talanta 77, 304–313, 2008.

Zhou, R., Shi, S., ve Wu, C., Molecular criteria for determining new hybrid species-an application to the *Sonneratia* hybrids. Molecular phylogenetics and evolution 35(3): 595-601, 2005.