

BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN BAZI BİTKİ TÜRLERİNİN
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

HALİT ÖZKAN İÇİGEN

Kütahya Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca
Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi BURCU ÇETİN

Mayıs – 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

"Halit Özkan İÇİGEN tarafından hazırlanan "Bitki Doku Kültürü Yöntemi ile Elde Edilen Bazı Bitki Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi" adlı tez çalışması, aşağıda belirtilen jüri tarafından Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek OYBİRLİĞİ/OYÇOKLUĞU ile Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir."

27/05/2019

Prof.Dr. Önder UYSAL
Enstitü Müdürü, Fen Bilimleri Enstitüsü

Prof.Dr. Hayri DAYIOĞLU 
Anabilim Dalı Başkanı, Biyoloji Anabilim Dalı

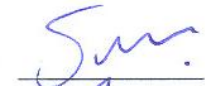
Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÇETİN
Danışman, Biyoloji Anabilim Dalı

Sınav Komite Üyeleri

Prof. Dr. Tuba İÇA
Biyoloji Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Yasemin TEKŞEN
Farmakoloji Bölümü, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÇETİN
Biyoloji Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında Akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığını ve benzerlik oranının % 1.5 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.



Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÇETİN



Halit Özkan İÇİGEN

BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN BAZI BİTKİ TÜRLERİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Halit Özkan İçigen

Biyoloji, Yüksek Lisan Tezi, 2019

Tez Danışmanı: Dr. Öğr.Üyesi Burcu ÇETİN

ÖZET

Tıbbi bitkilerin bitki doku kültürü yöntemleri ile üretimi konusunda yapılacak çalışmalar son derece önemlidir. Bu tez çalışmasında *Valeriana officinalis* L., *Prunella vulgaris* L. ve *Taraxacum officinale* L. tıbbi bitkilerinin yaprak eksplantlarına uygulanan farklı konsantrasyon ve kombinasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicilerinin kallus ve kök oluşumlarına etkileri araştırılmıştır. Daha sonra elde edilen rejeneratların antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır.

Bitkilere ait kurutulmuş adventif kök ve kalluslardan elde edilen ekstrelerin *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* bakterileri ve *Candida kruseii* fungusu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. *Antimikrobiyal aktivite testi sonuçlarına göre*; *P. vulgaris* adventif kökleri ve kallusları *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* bakterileri; *V. officinalis* adventif kökleri *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* bakterileri ve *Candida kruseii* fungusu; *T. officinale* kalluslarının ise *Staphylococcus aureus* bakterisi ve *Candida kruseii* fungusu üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Farklı konsantrasyon ve kombinasyondaki bitki büyüme düzenleyicilerinin antimikrobiyal aktivite üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Adventif Kök, Antimikrobiyal Aktivite, Bitki Doku Kültürü, Kallus, Tıbbi Bitki

**DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF SOME PLANT SPECIES
OBTAINED BY PLANT TISSUE CULTURE METHOD**

Halit Özkan İçigen

Biology, M. SC. Thesis, 2019

Thesis Supervisor: Assist. Prof. Burcu ÇETİN

SUMMARY

Valeriana officinalis L, *Prunella vulgaris* L and *Taraxacum officinale* L have medical importances. In this study, the effects of plant growth regulators in different concentrations and combinations on callus and root formations applied to the leaf explants grown *in vitro* by plant tissue culture method were investigated. Then the antimicrobial activity of the regenerate tissues were investigated.

The effects of extracts obtained from dried adventitious roots and calli belonging to plants on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* bacteria and *Candida kruseii* fungi were investigated. According to the results of antimicrobial activity test, *P. vulgaris* adventif roots and calli have antimicrobial effect on *P. aeruginosa* and *E. coli* bacteria. *V. officinalis* adventive roots have antimicrobial effect on *P. aeruginosa*, *E. coli* bacteria and *C. kruseii* fungi. *T. officinale* callus was found to have antimicrobial effect on *S. aureus* bacterium and *C. kruseii* fungus. Plant growth regulators of different concentrations and combinations were observed to be effective on antimicrobial activity.

Key Words: Adventive Root, Antimicrobial Activity, Callus, Medical Plant, Tissue Culture

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada bana çok yardımcı olan başta danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÇETİN'e, tezime olan katkılarından dolayı Doç. Dr. Fatih KALYONCU'ya, desteğini hep yanımda hissettiren biricik eşim Fatma KÖSE İÇİGEN'e ve oğlum Toprak İÇİGEN'e, beni bu yaşa getirip okutan ve üzerimde büyük emekleri olan annem Vahide İÇİGEN, babam Ömer Faruk İÇİGEN, kardeşim Umut İÇİGEN ve ÜNAL ailesine, tez dönemimdeki ekstra yardımlarıyla KÖSE ailesine, düzeltmeler konusunda çok yardımcı olan Talha KÖSE'ye, dostlukları ve motivasyon kaynakları nedeniyle Hüseyin AKARTUNA, Taner ÇİÇEK, Hüseyin İNCE, Kerem BAYDAR, Sinan ve Kenan ILGAT kardeşlere teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bitki Doku Kültürü	3
2.2. Kallus Kültürü.....	3
2.3. Organogenez	4
2.4. Bitki Büyüme Düzenleyicileri.....	5
2.5. <i>Prunella vulgaris</i> L.' nin Sistematığı ve Genel Bilgiler	6
2.6. <i>Valeriana officinalis</i> L. 'nin Sistematığı ve Genel Bilgiler	8
2.7. <i>Taraxacum officinale</i> L.' nin Sistematığı ve Genel Bilgiler.....	10
2.8. Literatür Çalışmaları	11
2.8.1 <i>Prunella vulgaris</i> ile yapılan çalışmalar	11
2.8.2 <i>Valeriana officinalis</i> ile yapılan çalışmalar	14
2.8.3 <i>Taraxacum officinale</i> ile yapılan çalışmalar.....	16
3. MATERYAL VE METOD	19
3.1. Bitki Materyalleri.....	19
3.2. Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar ve Laboratuvar Ekipmanları	19
3.2.1. Stok çözeltilerin hazırlanması ve saklanması	21

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.2. Bitki büyüme düzenleyicilerinin hazırlanması ve saklanması	23
3.2.3. MS besiyerinin hazırlanması	23
3.2.4. Bitki büyüme düzenleyicisi eklenmiş MS besiyerinin hazırlanması (250 mL için).....	24
3.3. Sterilizasyon Aşamaları	25
3.3.1. Biyogüvenlik kabininin sterilizasyonu	26
3.3.2. Alet ve ekipmanların sterilizasyonu	26
3.3.3. Besiyeri ve kavanozların sterilizasyonu	26
3.3.4. Bitki tohumlarının sterilizasyonu	26
3.4. In Vitro Doku Kültürü Çalışmaları	27
3.5. <i>P. vulgaris</i> İn Vitro Doku Kültürü Çalışmaları	27
3.5.1. <i>P. vulgaris</i> yaprak eksplantlarına bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi	27
3.6. <i>V. officinalis</i> tohumlarının in vitro çimlendirilmesi.....	28
3.6.1. In vitro çimlendirilen <i>V. officinalis</i> yaprak eksplantlarına bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi	29
3.7. <i>T. officinale</i> İn Vitro Doku Kültürü Çalışmaları.....	30
3.7.1. <i>T. officinale</i> yaprak eksplantlarına bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi	30
3.8. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	32
4.1. <i>Prunella vulgaris</i> Bitkisi ile Yapılan Çalışma Bulguları	32
4.1.1. <i>P. vulgaris</i> bitki eksplantlarına bitki büyüme düzenleyicilerin etkileri	32
4.1.2. Elde edilen <i>P. vulgaris</i> adventif köklerinin ve kalluslarının antimikrobiyal aktivite sonuçları	44
4.2. <i>Valeriana officinalis</i> Bitkisi ile Yapılan Çalışmaların Bulguları	45
4.2.1. <i>V. officinalis</i> tohumlarının in vitro çimlendirme bulguları	45
4.2.2. İn vitro çimlendirilen <i>V. officinalis</i> yaprak eksplantlarına bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi	45
4.2.3. Elde edilen <i>V. officinalis</i> adventif köklerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları	53
4.3. <i>Taraxacum officinale</i> Bitkisi ile Yapılan Çalışma Bulguları	54

İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa**

4.3.1. <i>T. officinale</i> bitki eksplantlarına bitki büyüme düzenleyicilerin etkileri	54
4.3.2. Elde edilen <i>T. officinale</i> kalluslarının antimikrobiyal aktivite sonuçları	60
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	62
KAYNAKLAR DİZİNİ	65



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Mikroçoğaltım yöntemleri	4
2.2. <i>Prunella vulgaris</i> 'in görünümü	7
2.3. <i>P. vulgaris</i> 'in Türkiye'deki yayılımı (Tubives, 2019)	8
2.4. <i>Valeriana officinalis</i> L.'in görünümü	9
2.5. <i>Valeriana officinalis</i> L.'in Türkiye'deki Yayılım Alanları (Tubives,2019).	9
2.6. <i>Taraxacum Officinale</i> 'nin Görünümü	10
3.1. <i>İn vitro</i> koşullarda mikroçoğaltımı yapılan <i>P. vulgaris</i>	28
3.2. <i>V. officinalis</i> tohumları	29
3.3. Çimlenmiş <i>V. Officinalis</i>	30
3.4. <i>İn vitro</i> koşullarda mikroçoğaltımı yapılan <i>T. Officinale</i>	31
4.1. 1 mg/L NAA içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	36
4.2. 1 mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	37
4.3. 1 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	38
4.4. 2 mg/L NAA içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	39
4.5. 2 mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	40
4.6. 2 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	41
4.7. 3 mg/L NAA içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar.....	42
4.8. 3 mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	43
4.9. 3 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	43
4.10. 3 mg/L NAA içeren MS besin ortamındaki yapraklardan oluşan kallus kültürünün bakterilere karşı oluşturmuş oldukları zonlar	44
4.11. <i>V. officinalis</i> yaprak eksplantlarında gözlenen ilk kök oluşumları (1 mg/L NAA + MS)	46

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.12. 1 mg/L NAA içeren MS besi ortamlarında oluşan adventif kökler	47
4.13. 1 mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP içeren MS besi ortamlarında oluşan adventif kökler	47
4.14. 1 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren MS besi ortamlarında oluşan adventif kökler	48
4.15. 2 mg/L NAA içeren içeren MS besi ortamlarında oluşan adventif kökler	48
4.16. 2 mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP içeren MS besin ortamlarında oluşan adventif kökler	49
4.17. 2 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren içeren MS besin ortamlarında oluşan adventif kökler ..	49
4.18. 3 mg/L NAA içeren MS besin ortamlarında oluşan adventif kökler	50
4.19. 3 mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP içeren MS besin ortamlarında oluşan adventif kökler	50
4.20. 3 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren MS besin ortamlarında oluşan adventif kökler	51
4.21. Deney gruplarından elde edilen köklerinin bir arada görüntüsü	51
4.22. Büyüme düzenleyici eklenmemiş MS besin ortamında yetişen 3 aylık <i>V. officinalis</i>	52
4.23. <i>V. officinalis</i> adentif köklerinin bakterilere karşı oluşturmuş oldukları zonlar	53
4.24. 1 mg/L NAA içeren içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	55
4.25. 1 mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP içeren içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	56
4.26. 1 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	56
4.27. 2 mg/L NAA içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	57
4.28. 2 mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	57
4.29. 2 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	58
4.30. 3 mg/L NAA içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	58
4.31. 3 mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	59
4.32. 3 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar	59
4.33. Etiv içerisinde kurutulan kalluslar ve kurutulmuş kalluslar	60
4.34. <i>T. Officinale</i> kalluslarının bakterilere karşı oluşturmuş oldukları zonlar	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Bitki Büyüme Düzenleyicileri	5
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Ekipmanları	19
3.2. MS besin ortamının içeriği (mg/L), (Babaoğlu vd., 2001)	21
3.3. MS stok çözeltileri içeriği (gr/100ml)	22
3.4. MS besin ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicileri ve çözücüleri	23
3.5. Bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları	24
3.6. Tohum Sterilizasyonu	27
3.7. <i>V. officinalis</i> ; <i>P. vulgaris</i> ; <i>T. officinale</i> yaprak eksplantlarına uygulanan bitki büyüme düzenleyicileri	27
4.1. <i>P. vulgaris</i> ’e ait gözlem sonuçlarına göre belirlenen kök ve kallus yüzdeleri	33
4.2. <i>P. vulgaris</i> ’e ait gözlem sonuçlarına göre 7 hafta sonra belirlenen kök, kallus ve toplam kök sayıları	33
4.3. Uygulamalar sonucunda elde edilen ve antimikrobiyal analiz için kurutulan <i>P.vulgaris</i> ’e ait kök–kallus toplam miktarları (gr).	35
4.4. <i>P. vulgaris</i> ’e ait antimikrobiyal aktivite zon çapları (mm)	44
4.5 <i>V. officinalis</i> yaprak eksplantlarında kök oluşturan eksplant sayısı ve kök oluşturma yüzdesi	46
4.6. Antimikrobiyal aktivite analizi için kurutulan <i>V. officinalis</i> kök miktarları (gr)	52
4.7. <i>V. officinalis</i> ’e ait antimikrobiyal aktivite zon çapları (mm)	53
4.8. <i>T. officinale</i> ’e ait gözlem sonuçlarına göre belirlenen kök ve kallus yüzdeleri	55
4.9. <i>T. officinale</i> ’e ait antimikrobiyal aktivite zon çapları (mm)	61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
BAP	Benzilaminopürin
NAA	Naftalen Asetik Asit
2,4 D	2,4 Diklorofenoksi Asetik Asit
MS	Murashige ve Skoog Besin Ortamı
mg/L	Miligram/Litre
cm	Santimetre
ml	Mililitre
IAA	Indol-3-Asetik Asit
IBA	Indol-3-Butirik Asit

1. GİRİŞ

Türkiye florası, 10.000'den fazla bitki türü sayısı ile yaklaşık 12.000 tür olarak belirlenmiş Avrupa'daki bitki sayısına yakındır. Bu rakamlar Türkiye'nin bitki çeşitliliğinin ne kadar zengin olduğunu göstermektedir (Temel vd., 2018). Bitkilerin eski dönemlerden bugüne kadar tedavi etme amacıyla kullanıldıkları bilinmektedir. Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de tedavi edici özellikleri keşfedilen ve yıllardır kullanılan pek çok bitki türü bulunmaktadır (Benli ve Yiğit, 2005). Tarım ve Orman Bakanlığı'na ait tıbbi bitki listesinde 615 adet bitki bulunduğu rapor edilmektedir (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2019).

İlaç, kozmetik ve gıda gibi önemli sanayi dallarında kullanılmalarından dolayı pek çok bitki antimikrobiyal aktiviteleri açısından araştırılmış ve bu çalışmalardan önemli sonuçlar elde edilmiştir (Mahesh ve Satish, 2008; Rasool vd., 2010; Sohail vd., 2014; Çetin vd., 2018). Antimikrobiyal etkinliğe sahip olan bitkiler ilaç, gıda koruyucu, tıbbi ve tarımsal mücadele amaçlı olarak kullanılmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

Bitkiler yaşamın yapıtaşları olan karbonhidrat, protein ve yağ üretimine yani birincil metabolitlere ek olarak "sekonder metabolitler" olarak adlandırılan maddeleri de sentezleyebilirler. Sekonder metabolitlerin biyoaktif özelliklerinin keşfedilmesi ve bunların tıp, kozmetik, kimya, gıda, tekstil, tarımsal mücadele, boya ve koku gibi birçok endüstri alanında yaygın olarak kullanılması, tıbbi ve aromatik bitkilerin dünya pazarlarındaki önemini giderek arttırmaktadır (Ramachandra ve Ravishankar, 2002).

Biyoteknolojik yöntemler doğal ortamlarda karşılaşılan sorunları çözmek için sekonder metabolitlerin üretiminde alternatif yöntemler olarak ortaya çıkmaktadır. Bitki doku kültürü teknikleri ile sekonder metabolit üretimine olan ilgi giderek artmaktadır (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015). Mikroçoğaltım, organizma meristemlerinden veya olgunlaşmış/olgunlaşmamış somatik hücrelerden istenen miktarlarda bitki üretebilen bitki doku kültürü yöntemlerinden biridir. Mikroçoğaltım, bitki hücrelerindeki genetik bilginin tam bir bitki üretme kabiliyeti olarak tarif edilen totipotensi özelliğine dayanmaktadır. Totipotensi özelliğine sahip bitki hücreleri, bitki büyüme düzenleyicileri tarafından sürgün, kök veya kallus üretimine yönlendirilebilirler. Bu sayede, bütün bir bitki tek bir hücreden veya dokudan elde edilebilir. Mikroçoğaltım uygulamalarında en sık kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ise oksinler ve sitokininlerdir (Dias

vd., 2016; Çetin ve Kalyoncu, 2018).

Labiatae familyasına ait olan *Prunella vulgaris* L. tıbbi öneme sahip bir bitkidir. Bu bitki “self heal (kendi kendini tedavi eden)” olarak adlandırılmaktadır. Geleneksel Avrupa tıbbında boğaz ağrısını hafifletmek, ateşi düşürmek ve yara iyileşmesini hızlandırmak amacıyla kullanıldığı bilinmektedir (Psotova vd., 2003). Çin'de halk arasında ateş düşürücü olarak kullanılmıştır. Fitokimyasal çalışmalar *P. vulgaris*' in fenoller, saponinler, alkaloidler, tanenler, terpenler ve anyonik polisakarit prunellin içerdiğini göstermektedir. Bitkinin antimikrobiyal, antioksidan, antiviral gibi pek çok aktivitesinin olduğu önceki çalışmalarla tespit edilmiştir (Mahboubi vd. 2015).

Valerianaceae familyasına ait *Valeriana officinalis* L. geleneksel tıpta kullanılan değerli bir bitkidir. Bitkinin kökleri uyku ve kaygı bozukluklarına karşı sedatif olarak kullanılmaktadır. Türkiye'de “kedi otu” olarak bilinen *V. officinalis*' in antimikrobiyal ve antioksidan özellikler barındırdığı belirlenmiştir (Düzgüner ve Erbil, 2019).

Taraxacum officinale L., Asteraceae (Compositae) familyasının bir üyesi olup Kuzey yarımküreye özgü çok yıllık bir bitkidir. Karahindiba olarak bilinmektedir. Yüksek besin değerine sahip olması dolayısıyla yaprakları çay ya da salata olarak ve kökleri de kahve olarak tüketilmektedir. Eski dönemlerden beri tıbbi amaçla da kullanılmaktadır. İshal, dalak ve karaciğer rahatsızlıkları ve gut tedavisinde faydalı olduğu bilinmektedir. Yakın dönemlerde yapılan çalışmalarla karahindibanın antioksidan, antienflamatuar, antidiyabetik özelliklerinin olduğu belirlenmiştir (Çetin vd., 2018).

Bu tez çalışmasında *in vitro* koşullarda yetiştirilmiş *V. officinalis*, *P. vulgaris* ve *T. officinale* bitkilerinin yaprak eksplantlarına uygulanan farklı konsantrasyon ve kombinasyonlardaki Benzil Amino Pürin ve Naftalen Asetik Asit bitki büyüme düzenleyicilerinin kallus ve kök rejenerasyonlarına etkisi ve bu rejeneratların antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bitki Doku Kültürü

Tıbbi bitkilere karşı giderek artan taleple birlikte doğal koşullarda zorlu şartlar altında oluşan sekonder metabolitler yetersiz gelmeye başlamıştır. Bu metabolitlerin elde edilmesinde, doğal ortamdan bitki toplamanın güçlüğü ve masraflı olması, sürekli toplanan bitkilerin nesillerinin tükenme tehlikesi ile karşı karşıya kalması, iklimsel koşulların oluşan sekonder metabolit miktarını ve kalitesini değiştirmesi, bitki kültürlerinde yaşanan başarısızlıklar ve yeterli miktar elde edilebilmesi için büyük tarım alanlarının gerekmesi gibi çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu gibi sebeplerle yetersiz kalan doğal üretime alternatif olarak biyoteknolojik yöntemler özellikle bitki hücre ve doku kültürleri kullanılmaktadır (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015).

Bitki doku kültürü yöntemleri, bitkinin çeşitli kısımlarının (apikal, meristem, kök, yaprak ve gövde gibi doku veya organları), bitki hücrelerinin (meristematik veya kallus hücreleri) ya da tam bir bitkinin aseptik koşullarda ve yapay besin ortamında kültüre alınması işlemleridir (Güven ve Gürsul, 2014). Bitki doku kültürüne yönelik ilk çalışma 1902 yılında Gottlieb Haberlandt tarafından bitkilerin totipotensi özelliğinin keşfedilmesinden sonra yapılmıştır. Bu çalışmada, izole edilmiş bitki hücreleri bir besin çözeltisi içinde yetiştirilmiştir. Bununla birlikte, ilk başarılı bitki hücresi kültürü 1922'de Kolte ve Robbins tarafından gerçekleştirilmiştir (Dias vd., 2016).

Bitki doku kültürü teknikleri ile üretilen sekonder metabolit miktarları doğal ortamda yetişen bitkilerde bulunan sekonder metabolitlerden daha verimli olabilmektedir; iklim, coğrafi koşullar, mevsimsel sınırlılıklar gibi çevresel etkenlerin olumsuzlukları ortadan kalkmakta, ihtiyaç duyulan tarımsal alan miktarı azalmakta, kontrolsüz toplanma nedeniyle bitkilerin neslinin tükenme tehlikesinin önüne geçilmekte, miktar olarak daha fazla, hızlı ve aynı zamanda daha kaliteli ve standart nitelikli üretim yapılabilmektedir (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015).

Sekonder metabolit üretiminde kullanılan farklı bitki doku kültürü yöntemleri bulunmaktadır. Tez çalışması kapsamında Kallus Kültürü ve Organogenez yöntemlerinden bahsedilecektir.

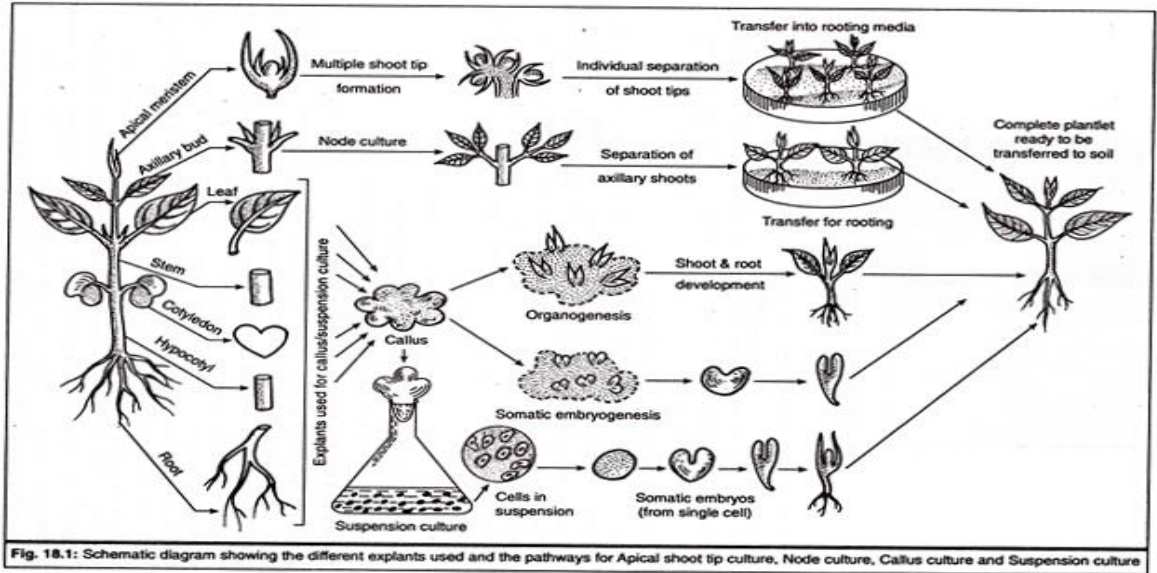
2.2. Kallus Kültürü

Kallus yani bitki yara dokusu, ana bitkiden alınan bölünme yeteneğini yitirmemiş

eksplantların *in vitro* koşullarda steril besin ortamlarına alınması ile elde edilen morfolojik düzeni olmayan hücre kütleleridir (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015). Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada bitki doku kültürü yöntemlerinden birisi olan kallus kültürünün, doğal antimikrobiyal bileşiklerin elde edilmesi için kullanıldığı bildirilmektedir (Çetin vd., 2017).

2.3. Organogenez

Bitki hücrelerinin totipotent özellik taşımaları organogenez olayının temelini oluşturmaktadır. Eğer bir bitki hücresi zarar görmemiş bir hücre zarı ve çekirdeğe sahipse mitoz bölünmelerle yeni bir bitkisel doku meydana getirebilmektedir. Bu bölünmeler sonucu doğrudan adventif kök veya sürgünler oluşması direkt organogenez, önce kallus sonra kallustan sürgün veya kökler oluşmasına ise indirekt organogenez olarak adlandırılır (Babaoğlu vd., 2001). Organogenezi sağlamak için besin ortamındaki oksin/sitokinin oranının uygun şekilde ayarlanması gerekmektedir. Besin ortamında oksin konsantrasyonunun sitokinin konsantrasyonundan fazla veya sadece oksin bulunması kök oluşumunu, sitokinin konsantrasyonunun oksinden fazla olması veya tek başına sitokinin içermesi sürgün oluşumunu uyarır (Kocaçalışkan, 2008).



Şekil 2.1. Mikroçoğaltım Yöntemleri (<http://www.biologydiscussion.com/plants/plant-tissue-culture/study-notes-on-organogenesis-biotechnology/61330>).

2.4. Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Hormon kelimesi Yunanca “uyarma” manasına gelmektedir. Çok hücrelilerin tümünde bulunan hormonlar, organizmanın parçalarını kontrol eden kimyasal sinyallerdir. Hormon vücudun bir bölümünde üretildikten sonra diğer bölümlere taşınarak, taşındığı bölgede özgül bir reseptöre bağlanıp hedef hücrelerin yanıt vermesini tetikler. Çok küçük miktarları bile ciddi değişikliklere sebep olabilir (Campell ve Reece, 2008).

Son yıllarda kimya sektörü tarafından doğal hormonlarla benzer fizyolojik aktiviteler gösteren sentetik bileşikler de üretilmiştir. Bitkiler tarafından doğal olarak üretilen hormonlar ve kimya endüstrisi teknikleriyle sentezlenenlere genel olarak bitki büyüme düzenleyicileri adı verilmektedir (Gürel vd. 2013).

Çizelge 2.1. Bitki Büyüme Düzenleyicileri.

HORMON	ÜRETİLDİĞİ YER	ANA İŞLEVLER
OKSİN - Indol-3-asetik asit(IAA), - Indol butirik asit (IBA), - Naftalen asetik asit (NAA), - 2,4-diklor fenoksi asetik asit (2,4-D)	-Genç yapraklar, -Tohum embriyosu, -Apikal tomurcukların meristemleri.	- Gövde uzamasını (sadece düşük konsantrasyonlarda) kök büyümesini, hücre farklılaşmasını ve dallanmayı sağlar; meyve gelişimini düzenler; apikal dominansı artırır; fototropizma ve gravitropizmada iş görür.
SİTOKİNİNLER -Zeatin -izopentenil adenin (2İP)	-Köklerde üretilirler ve diğer organlara taşınırlar.	Kök büyüme ve farklılaşmasını etkiler; hücre bölünmesi ve büyümesini teşvik eder; çimlenmeyi teşvik eder; senesensi geciktirir.

Çizelge 2.1. (devam). Bitki Büyüme Düzenleyicileri.

GİBERELLİNLER - GA ₃	-Apikal tomurcukların ve köklerin meristemleri, -genç yapraklar, -embriyo	Tohum ve tomurcuk çimlenmesini, gövde uzamasını ve yaprak büyümesini artırır; Çiçeklenmeyi ve meyve gelişimini teşvik eder, kök büyümesini ve farklılaşmasını etkiler.
ABSİSİK ASİT	- Gövde, - Yaprak, - Yeşil meyve, - Kök	Büyümeyi engeller; su stresi sırasında stomalar kapanır; dormansinin kırılmasını engeller.
ETİLEN	-Yaşlı yaprak ve çiçekler, - Olgun meyve dokuları, - Gövde nodyumları	Meyve olgunlaşmasını artırır, bazı öksin etkilerini bastırır; türe bağlı olarak, köklerin yaprakların ve çiçeklerin büyümesini artırır veya engeller

2.5. *Prunella vulgaris* L.' nin Sistematığı ve Genel Bilgiler

Alem (Kingdom) : Plantae (Bitkiler)

Alt Alem (Subkingdom): Tracheobionta (Damarlı Bitkiler)

Bölüm (Division): Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)

Sınıf (Class): Magnoliopsida (İki çenekliler)

Alt Sınıf (Subclass): Asteridae

Takım (Order): Lamiales

Familya (Family): Lamiaceae

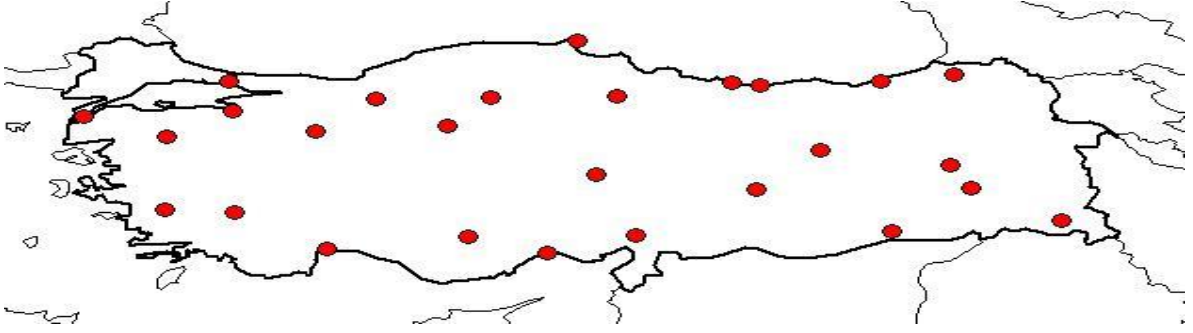
Cins (Genus): *Prunella*

Tür (Species): *Prunella vulgaris* L. (Yara Otu) (Tubives, 2019).



Şekil 2.2. *Prunella vulgaris*'in görünümü
 (<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:455176-1>,
<https://lucillelucasegallery.com/artworks/prunella-vulgaris-self-heal/>).

Lamiaceae familyasından olan *P. vulgaris* çok yıllık ve otsu bir bitkidir. Çoğunlukla tarlalar, korular, yol kenarları, nemli kenarlar ve derelerde yetişmektedir. Mayıs ve Eylül ayları arasında çiçeklenme görülmektedir. Avrupa ve Sibiry kökenli olan *P. vulgaris*' in Avrasya, Kuzey Afrika'da yaygın olarak yetiştiği bilinmektedir. *P. vulgaris* Türkiye'de ise Amasya, Ankara, Antalya, Artvin, Aydın, Balıkesir, Bitlis, Bolu, Bursa, Çankırı, Çanakkale, Denizli, Eskişehir, Giresun, Hakkari, İstanbul, İçel, Kayseri, Malatya, Mardin, Muş, Ordu, Osmaniye, Rize, Sinop, Tunceli ve Karaman'da yetişmektedir (Tubives, 2019).



Şekil 2.3. *P. vulgaris*'in Türkiye'deki yayılımı (Tubives, 2019).

P. vulgaris tıbbi açıdan öneme sahiptir. Bu bitki kendi kendini iyileştiren, tedavi eden (self heal) bitki olarak bilinmektedir. 17. yüzyılda geleneksel Avrupa tıbbında popüler olduğu ve boğaz ağrısını hafifletmek, ateşi düşürmek ve yara iyileşmesini hızlandırmak için bir ilaç olarak kullanıldığı bilinmektedir (Psotova vd., 2003).

Çin geleneksel tıbbında ateş düşürücü olarak sıklıkla kullanılmaktadır. *Prunella* türleri üzerinde yapılan biyolojik etkinliğine ilişkin yürütülen çalışmalar sonucunda antimikrobiyal, antienflamatuvar, antiviral, antikanser, antioksidan, antihipertansif ve antihiperglisemik etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan fitokimyasal çalışmalar sayesinde *Prunella* türlerinin triterpenik saponinler, flavonoidler, antosiyaninler, tanenler, organik asitler, kumarinler, steroidler, yağ asitleri, ozlar, uçucu yağlar, diterpenler, seskiterpenler, vitaminler, aminoasitler ve eser elementleri içerdiği belirlenmiştir (Mahboubi vd., 2015; Rasool vd., 2010; Ahmed ve Ezer, 2008).

2.6. *Valeriana officinalis* L. 'nin Sistematigi ve Genel Bilgiler

Alem (Kingdom) : Plantae (Bitkiler)

Alt Alem (Subkingdom): Tracheobionta (Damarlı Bitkiler)

Bölüm (Division): Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)

Sınıf (Class): Magnoliopsida (İki çenekliler)

Alt Sınıf (Subclass): Asteridae

Takım (Order): Dipsacales

Familiya (Family): Valerianaceae

Cins (Genus): *Valeriana*

Tür (Species): *Valeriana officinalis* L. (Kedi otu) (Tubives,2019).



Şekil 2.4. *Valeriana officinalis* L. 'in görünümü (<http://evyziva.sk/s-valeriana-sa-vyspime-dorozova/>, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:156_Valeriana_officinalis_L.jpg).

Valeriana officinalis L. Valerianaceae familyasına ait çok yıllık otsu bir bitkidir. Haziran Temmuz döneminde çiçeklenmektedir. Çalılıklar ve ıslak çayırarda rastlanmaktadır. Avrupa, Kafkasya, Orta ve Kuzey Asya'da doğal olarak yetişmektedir. Türkiye'nin kuzey batısından kuzey doğusuna uzanan dağlık bölgelerde bolca yetişmektedir. Bolu, Kars, Ağrı, Bursa, Çanakkale, Erzurum, Kayseri şehirleri bitkinin en çok yetiştiği yerlerdir (Tubives, 2019).



Şekil 2.5. *Valeriana officinalis* L.'in Türkiye'deki Yayılım Alanları (Tubives,2019).

V. officinalis Türk Kodeksinde 1954' de Türkçe isim olarak kediotu denilmiştir. Valerianaceae familyasına kayıtlı bitkinin çok eski dönemlerden bu yana halk arasında önemli bir tedavi edici olarak tercih edilmektedir (Düzgüner ve Erbil,2019). *V. officinalis*' in sedatif,

antidepresan anksiyolitik, hipnotik ve antikonvülsan amaçlarıyla kullanıldığı bilinmektedir. Kurutulmuş kök ve rizomları uykusuzluk ve kaygı bozuklukları gibi rahatsızlıklar için sakinleştirici olarak kullanılmaktadır (Letchamo vd., 2004).

V. officinalis kimyasal bileşiminde alkaloidleri, aminoasitler ve epoksi iridoid esterleri içermektedir. Yapılan çalışmalarla farklı *in vitro* şartlar altında *V. officinalis* ekstralarının antimikrobiyal ve antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Neamati vd., 2014).

2.7. *Taraxacum officinale* L.' nin Sistematigi ve Genel Bilgiler

Alem (Kingdom) : Plantae (Bitkiler)

Alt Alem (Subkingdom): Tracheobionta (Damarlı Bitkiler)

Bölüm (Division): Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)

Sınıf (Class): Magnoliopsida (İki çenekliler)

Alt Sınıf (Subclass): Asteridae

Takım (Order): Asterales

Familiya (Family): Asteraceae

Cins (Genus): *Taraxacum*

Tür (Species): *Taraxacum officinale* L. (Karahindiba)



Şekil 2.6. *Taraxacum officinale* L.' nin görünümü (<https://www.frozensseeds.com/collections/medicinal-herb-seeds/products/dandelion-seeds-taraxacum-officinale>, <http://www.paundurlic.com/vlaski.recnik/celarec.php?id=2160>).

Taraxacum officinale L., Asteraceae (Compositae) familyasına aittir. Çok yıllık otsu bir bitkidir ve kuzey yarım kürede yetişmektedir. Ilıman bölgelerde, yol kenarlarında çokça

yetişmektedir. *T. officinale* halk arasında karahindiba olarak bilinmektedir. Yapraklarının salatalarda ve köklerinin kahve olarak tüketilmesinin yanı sıra geçmiş dönemlerde tıbbi amaçlıda kullanıldığı bilinmektedir. Karaciğer (hepatit) ve dalak rahatsızlıkları, ödem, gut ve ishal gibi hastalıkların iyileştirilmesinde kullanılmaktadır. Karahindiba bitkisinin kökleri Kanada'da kayıt altına alınmış bir ilaçtır ve idrar söktürücü olarak satılmaktadır (Sohail vd., 2014).

2.8. Literatür Çalışmaları

2.8.1 *Prunella vulgaris* ile yapılan çalışmalar

Rasool vd. (2008) *P. vulgaris* 'in doğal ortamda yetişen sürgün uçlarını eksplant kaynağı olarak kullandıkları çalışmalarında, 6-benzilamino pürin (BAP) ve naftalenasetik asitin (NAA) *in vitro* ortamda *P. vulgaris* 'in çoğaltılmasına etkisini incelemişlerdir. Yarım kuvvette ve 15 μ M BAP içeren Murashige ve Skoog (MS) besiyerinde eksplant başına en yüksek sayıda (30 ± 0.6) sürgün elde ettiklerini, aynı BAP seviyesine sahip tam kuvvet MS besiyerinden ise (15 ± 0.4) sayıda sürgün elde ettiklerini bildirmişlerdir. NAA ve BAP kombinasyonlu besiyerinin köklenme ile birlikte çoklu aksiller sürgün rejenerasyonunu desteklediğini ispatlamışlardır. Yarım kuvvetteki MS ortamda geliştirilen sürgünlerin, MS besin ortamında geliştirilenlerden daha sağlıklı olduklarını, sürgünlerin ($\frac{1}{2}$) MS bazal besiyerinde iyi bir şekilde köklendiğini ve sürgün başına ortalama 8 kök verdiklerini belirlenmişlerdir.

Turker vd. (2009) *P. vulgaris* bitkisi ile yaptıkları çalışmada sürgün ucu eksplantlarından 3,0 mg/L BA ile 0,1 mg/L IAA içeren MS ortamda en iyi sürgün oluşumlarını elde etmişlerdir. Rejenerasyon çalışmalarında, denedikleri diğer eksplantlar olan yaprak ayası, yaprak sapı, gövde internodları ve kök eksplantlarında başarısız olmuşlardır. Sürgün ucu eksplantlarından elde ettikleri sürgünleri 3 mg/L IAA veya 3 mg/L IBA içeren ortamlarda inkübe ederek, en iyi kök oluşumlarını gözlemlemişlerdir.

Rasool vd. (2010) tarafından doğal ortamda ve *in vitro* koşullarda yetişmiş *P. vulgaris* bitkisinin MeOH, EtOH, CHCl_3 özütleri, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri açısından karşılaştırılmıştır. *In vitro* ve doğal bitki özleri Agar kuyusu difüzyon yöntemi ile tıbbi açıdan önemli bakteri suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite açısından farklı çözücü sistemlerinde taranmıştır. Hem doğal hem de *in vitro* bitki özütlerinin MeOH özü, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* ve *Klebsella pneumoniae* 'ye karşı neredeyse eşit

derecede etkili olduğu gözlemlenmiştir. Çalışma hem *in vitro* hem de doğal kurutulmuş bitki özlerinin benzer antioksidan ve antimikrobiyal inhibisyon göstermesi nedeniyle *in vitro* olarak yetiştirilen *P. vulgaris*' in, doku kültürü tekniğinin, farmasötik endüstrisinde doğal *P. vulgaris* yerine kullanılabilme potansiyeli olduğunu gösterir.

Kour vd. (2014) yaptıkları çalışmada *P. vulgaris*'e ait çeşitli eksplantları farklı kombinasyonlarda tidiazuron (TDZ) ve 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) içeren MS besin ortamında callus elde edebilmek için inkübe etmişlerdir. En iyi kallus bu eksplantlar arasından 1,0 mg/L TDZ ve 0,5 mg/L 2,4-D'ye sahip ortamda internod eksplantında gözlenmiştir. Daha sonra 1,0 mg/L TDZ ve 0,05 mg/L indol-3-asetik asit (IAA) içeren MS ortamında kallusları çoğaltmışlardır. Kalluslar aktarıldıkları 1,5 mg/L benzil amino purin (BAP) ve 0,01 mg/L IAA ile desteklenmiş MS ortamında sürgün oluşturmuşlardır. Diğer bir çalışma olarak direkt sürgün eldesi çalışmaları için nod eksplantlarını kullanmışlardır. Bu eksplantlardan 0,5 mg/L BAP ve 0,05 mg/L IAA eklenmiş MS ortamında en iyi sürgün oluşumlarını gözlemişler. Bu ortamlarda oluşan sürgünleri, hormonsuz MS ortamında uzatmışlar. İlk kallustan elde edilen (indirekt) sürgünleri ve direkt (nodlardan) elde edilen sürgünleri 0,5 mg/L, 1 mg/L ve hormonsuz IAA da köklendirmişlerdir. En iyi kök oluşumları 0,5 mg/L IBA da gözlemlenmiştir.

Fazal vd. (2014) çalışmalarında *P. vulgaris* tohumlarını 30 gün boyunca katı Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında inkübe etmişlerdir. 30 günün sonunda elde ettikleri bitkiciklerin yapraklarını, 6-benziladenin (BA; 1.0 mg/L) ve naftalen asetik asit (NAA; 1.5 mg/L) içeren katı Murashige ve Skoog (MS) ortamına aktarmışlar. Aktarılan yaprak eksplantlarından 30 gün sonunda kırılğan yapıda kalluslar elde etmişlerdir. Elde edilen kallusları her birinde 0,49 g olacak şekilde farklı NAA konsantrasyonları (0,5-2,0 mg/L) içeren sıvı MS ortamına aktarmışlardır. Calluslar 49 gün boyunca 25 °C derece ortamda 125 rpm olarak ayarlanmış çalkalayıcıda bırakılmış ve 7 gün arayla gelişimleri gözlemlenmiştir. Bütün ortamlarda en yüksek biyokütle oranı 21.gün tespit edilmiş ve 28-49 gün arasında giderek azalmıştır. 21.gün yapılan gözlem sonrasında 1,0 mg/L NAA içeren sıvı ortamda en yüksek biyokütle birikimi (2,13 g/L) gözlenmiştir. 49.gün sonunda toplam fenolikler (TP), toplam flavonoidler (TF) ve antioksidan aktivitelerin araştırılması için kökler toplanıp kurutulmuştur. Daha yüksek TPC (0.995 GAE mg / g-DRB) ve TFC (6.615 RE mg/g-DRB), 0,5 mg/L NAA ile muamele edilmiş kültürlerde gözlenmiş. Buna karşılık, daha yüksek antioksidan aktivite (% 83.53) 1,5 mg/L NAA ile muamele edilmiş kültürlerde gözlenmiştir.

Mahboubi vd. (2015) *P. vulgaris* ekstraktlarının (metanol, etanol ve sulu) toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriklerini bir spektrofotometre ile belirlemişlerdir. Ayrıca bitkinin antimikrobiyal aktivite gösterip göstermediğini sıvı dilüsyon yöntemi ile analiz etmişlerdir. Analiz sonuçlarına göre *P. vulgaris* ekstraktlarının toplam fenolik içeriği en çok sulu ekstraktta (156,5 mg GAC / g) daha sonra sırasıyla etanol ve metanol ekstraktındadır ve *P. vulgaris* metanol ekstraktının (82,8 mg QE / g) toplam flavonoid içeriği etanol ekstraktından (22,7 mg QE / g) ve sulu ekstrakttan (16,2 mg QE/g) daha yüksektir. Ayrıca metanol veya etanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri sulu ekstrakttan daha yüksektir. Mikroorganizmaların farklı ekstraktlara duyarlılığı patojen tipleri ile ilgilidir. Toplam fenolik içerik ile antimikrobiyal aktivitesi arasında pozitif bir ilişki yoktur. Fenolik ve flavonoid içerik kaynağı olarak *P. vulgaris* etanolik ekstresi, antimikrobiyal olarak kullanılabilir.

Fazal vd. (2016) *P. vulgaris* ile ilgili yaptığı çalışmada, farklı oranlarda (1:2; 1:3; 2:1; 3:1) gümüş (Ag) ve altın (Au) nanoparçacıklarının (NP) tek başlarına ya da naftalen asetik asit ile kombinasyonunun etkilerinin kallus kültürü gelişimine ve sekonder metabolitlerin üretimine etkisini araştırmıştır. Ag (30 µg/L), AgAu (1: 2) ve AgAu (2: 1) NP'leri, NAA (2,0 mg/L) ile kombinasyon halinde, % 95 kontrol ile karşılaştırıldığında % 100 kallus artışı gözlemlenmiştir. Test edilen farklı NP'ler arasında, NAA olan veya olmayan AuNP'ler, büyüme kinetiğinin log fazlarında (35-42 gün) daha yüksek biyokütle üretmişlerdir. Ayrıca, kallus kültürlerinde yalnızca AgAu (1:3) ve AuNP'ler toplam protein içeriğini (855 -µg-BSAE / mg-taze ağırlık (FW)), süperoksit dismutazı (0,54 nM / dak / mg-FW) ve peroksidaz enzimini (0,39 nM / dak/ mg FW) arttırmıştır. AgAuNP'ler (1:3), NAA ile birlikte, maksimum fenolik birikimi (TPC 9,57 mg / g-kuru ağırlık (DW)) ve flavonoid (6,71 mg / g-DW) içeriğini indüklemiştir.

Fazal vd. (2016) yapılan bu çalışmada *P. vulgaris*'in kallus kültürlerinde çeşitli spektral ışıkların biyokütle birikimi ve antioksidant sekonder metabolitlerin üretimine etkilerini incelemişlerdir. *P. vulgaris*'in yeşil ışıkta kallus miktarında bir artış olduğunu, sarı ve mor ışıkların, büyüme kinetiği sırasında taze biyokütleyi geliştirdiğini, mavi ışıkların fenolik ve flavonoid üretimini arttırdığını, sarı ışığın toplam fenolikler ve flavonoidler üretimi ayrıca, süperoksit dismutaz, peroksidaz ve proteaz aktivitelerini arttırdığını gözlemlenmiştir.

Komal vd. (2018) çalışmalarında *P. vulgaris*' in etanolik ve sulu ekstratlarını 38 dirençli *Escherichia coli* suşu üzerinde engelleyici özelliği olup olmadığını araştırmışlar ve kuyu difüzyon

yöntemiyle de Ciprofloxacin, Ofloxacin, Cefixime ve Tobramycin ile karşılaştırılmasını yapmışlardır. Sonuç olarak *P. vulgaris*' in *Escherichia coli* ye karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

2.8.2 *Valeriana officinalis* ile yapılan çalışmalar

Castillo vd. (2000) çalışmalarında *Valeriana edulis ssp. procera* bitkisini, yaprak kaynaklı kallus ve süspansiyon kültürlerinden, dolaylı organogenez ve somatik embriyogenez yoluyla elde edilmesini araştırmışlardır. Kallus gelişimi için yapraklar, 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ve kinetin ile desteklenmiş yarı katı MS ortamında kültüre alınmıştır ve embriyogenik ve organogenik kallus gelişimi, 16 hafta sonra gözlenmiştir. Oluşan kalluslar, kinetin ve 1-naftalenasetik asit (NAA) ile takviye edilmiş yarı katı ve sıvı Murashige ve Skoog (MS) ortamına aktarılmıştır. Sürgün ve somatik embriyo görünümü 4 hafta sonra gerçekleşmiştir. Oluşan sürgünlerde köklenme ve somatik embriyolarda filizlenme gözlenmiştir. Daha sonra seraya aktarılmıştır. Süspansiyon kültürlerinde kallus kültürlerine göre daha iyi bir organogenik ve embriyogenik tepki verdiği gözlenmiştir. Morfogenik kallusun histolojik gözlemleri, hem somatik embriyoların hem de sürgünlerin aynı kallus türünden oluştuğunu ortaya koymuştur.

Letchamo vd. (2004)'nin çalışmasında sertifikalı ticari organik alanlardan seçilmiş iki çeşit *V. officinalis*, bitkisinin yeraltı kısımlarının bileşimi ve uçucu yağ içeriği hidrodistillasyon, ardından gaz kromatografisi ve spektrometre ile analiz edilmiştir. Bitkilerden daha yaşlı olanda valerenal, valerenik asit ve alfa-humulen içeriklerinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Uçucu yağın *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Saccharomyces cerevisiae*' ye karşı güçlü bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Zayova vd. (2010) çalışmalarında Kediotu'nun (*V. officinalis*) *in vitro* kontrollü koşullarda çimlendirilmiş fidelerden hızlı ve efektif mikroçoğaltımı ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. En yüksek tohum çimlenme yüzdesi, soğuk stratifikasyon işleminden sonra GA₃ çözeltisine batırılan tohumların MSG3 (0,1 mg/L BAP + 0,2 mg/L GA₃ + 0,2 mg/L NAA) ortamında inkübe edilmesiyle elde edilmiştir. Murashige ve Skoog (MS) ortamının varyantları olarak değerlendirilen sekiz farklı besin ortamından (MS1 - MS8), BAP ve askorbik asit ile takviye edilmiş MS3 (1 mg/L BAP + 10 mg/L AA (Askorbik asit)) ortamında mikroçoğaltma ve tomurcuk oluşumunun uyarılmasında en

etkili sonucu vermiştir. En iyi köklenme düşük konsantrasyonda 0,1 mg/L NAA veya IBA ile güçlendirilmiş yarı-kuvvetli MS ortamında gerçekleşmiştir.

Tousi vd. (2010) çalışmalarında *V. officinalis*'e ait kök ve rizomların valepotriatlar ve valerenik asitleri içermesinden dolayı (varsayılan farmakolojik aktivitelerle) kök çoğalmasının oldukça önem arz ettiğinden bahsetmiş ve bitki doku kültürü yöntemi ile köklerin pratik, hızlı ve büyük miktarlarda elde etme yöntemini araştırmışlardır. Dört aylık bitkilerin yaprakları, sapları ve kök bölümlerinden (hem bazal hem de apikal) türetilen eksplantlar, farklı konsantrasyonlarda (0,625-5 μ M) oksin ve sitokin hormonları ile takviye edilmiş MS besiyerinde kültüre alınmışlardır. Daha sonra, en verimli koşulları bulmak için, gelişmiş kök kültürlerinde valerenik asitlerin ve valepotriatların birikimi incelenmiştir. Maksimum valerenik asit (% 0.84) 1.25 μ M indol-3-asetik asit ile takviye edilmiş ortamda yaprak sapı eksplantlarında geliştirilen köklerde ve valepotriat içerikleri (% 7,41) 0.625 μ M indol-3-asetik asit ile takviye edilmiş ortamda kök bazal segmentlerinde oluşturulan köklerde ölçülmüştür. Bu değerler, kontrol olarak bitki büyüme düzenleyicileri olmayan bazal ve apikal kök segmentlerinden alınan köklerden anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda yaprak eksplantlarından 5 μ M α -naftalen asetik asit ile desteklenmiş ortamlarda direkt oluşan köklerin en yüksek ortalaması (29.00) olarak belirlenmiştir. Ayrıca 2,5 μ M α -naftalen asetik asit içeren ortamlarda kök apikal segmentlerinde dolaylı olarak geliştirilen maksimum kök sayısı (30.05) olarak gözlenmiştir. Bu sonuçların, bitki büyüme düzenleyicilerin yanı sıra eksplant tipinin organogenezi etkilediğini bildirmişlerdir.

Zamini vd. (2016) çalışmalarında *in vitro* ortamda oksinlerin (2,4-D ve NAA) kallus indüksiyonu üzerindeki etkilerini, *V. officinalis*'in bazal yaprak+yaprak sapı (L1) ve orta yaprak (L2) eksplantlarını kullanarak araştırmışlardır. En iyi kallus oluşumuna (% 95,8) L2 eksplantlarında 2,4 D (1,5 mg/L) + KIN (1 mg/L) içeren MS'te ulaşmış, ancak 2,4-D (2 mg/L) + KIN (0,5 veya 1 mg/L) ile anlamlı bir fark olmadığını tespit etmiştir. Tüm kalluslardan kök elde etmişlerdir, bunun gelecekte büyük ölçekli üretim için zaman ve maliyetten kazanç sağlayacağını bildirmişlerdir. Kallus farklılaşması için test edilen sitokinler (BAP, TDZ ve KIN) arasında en yüksek rejenerasyon (%62,5), sürgün sayısı (5,87) ve sürgün uzunluğu (5,96 cm) ile BAP (0,5 mg/L) + IBA (0,5 mg/L) kombinasyonu üzerinde meydana gelmiştir. Elde edilen sonuçların, eksplant tipinin kallus oluşumu üzerindeki etkisinin de anlamlı olduğunu ortaya koymuştur. KIN veya TDZ'nin

aksine, BAP'a IBA'nın eklenmesi, bitki rejenerasyonu ve kallus başına sürgün sayısı için pozitif sinerjistik etki göstermiştir.

Düzgüner ve Erbil (2019) Ardahan ilinden toplanan *V. officinalis* bitkisinin antimikrobiyal ve antioksidan etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada kediotunun hem metanol hem de etanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi *Bacillus megaterium* (DSM 32), *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) ve *Yarrowia lipolytic*' ya karşı incelenmiştir. Bitkilerin toplam oksidan ve antioksidan düzeyleri ELISA yöntemiyle Glutasyon (GSH) düzeyi ise spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Sonuçlar kediotunun analiz edilen mikroorganizmalara karşı düşük düzeyde antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. GSH düzeyi ve antioksidan kapasitesi etanol ekstraktlarında metanol ekstraktlarına göre daha düşüktür. Sonuç olarak *V. officinalis*' in yararlı etkilerini belirleyen antibakteriyel ve antioksidatif içeriklerinin etki mekanizması ile ilişkisinin *in vitro* çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

2.8.3 *Taraxacum officinale* ile yapılan çalışmalar

Furuno vd. (1993) araştırmalarında *T. officinale* kallus kültürlerinden bitkinin tamamını üretmişlerdir. Sürgün kültürleri öncelikle 0.1ppm N6-benzyladenine ile birlikte 0.1ppm a-naphthaleneacetic acid içeren ya da içermeyen ½ MS besi yerinde bekletilmiştir. Daha sonra fitohormonsuz besi yerinde kök veren bu sürgünler toprağa aktarılmışlar ve normal çiçekli ve tohumlu bitki olarak büyütülmüşlerdir.

Ermayanti ve Martin (2011) çalışmalarında besiyerinde yetişmiş olan *T. officinale* bitkisinin yaprak ayası, yaprak sapı ve kök eksplantlarının rejenerasyonunu araştırmışlardır. En iyi ortamı seçmek için tüm eksplant türleri NAA (0, 0,5, 1,0 ve 2,0 mg/L) ile birlikte BAP (0, 0,5 ve 1,0 mg/L) ile desteklenmiş MS katı ortamda kültürlenmiştir. Eksplantlar 6 hafta boyunca büyütüldükten sonra kallus, sürgün ve kök oluşumları gözlemlenmiştir. Sonuçlara göre sürgün oluşumu için 0,5 mg/L NAA ile birlikte 1 mg/L'de BAP kombinasyonu, yaprak aya ve sapından kök oluşumu için ise sadece NAA kombinasyonlu MS ortamı uygundur. Sürgün rejenerasyonu için en iyi eksplantın kök olduğu, iki hafta sonra kallus oluşumu ve üç hafta sonrada çoklu sürgünlerin büyüdüğü tespit edilmiştir. Kök eksplantlarından kök elde edilemediği ve çoklu sürgün rejenerasyonu için en iyi

ortamın 0,5 mg/L NAA içeren veya hiç NAA içermeyen 1 mg/L BAP MS besin yeri olduğu bulunmuştur.

Sohail vd. (2014) çalışmalarında *T. officinale* bitkisinin yaprak ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesini, seçilen farklı bakteri suşlarına karşı araştırılmasını amaçlamışlardır. Metanol, kloroform ve distile su ekstraktları, agar kuyusu difüzyon yöntemi ile analiz edilmiştir. Metanol ve Kloroform ekstraktlarının test edilen tüm bakteriyel patojenlere (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus Subtilis* ve *Micrococcus luteus*) karşı etkili olduğu ve distile su ekstraktlarının hiçbir aktivite göstermediği bulunmuştur. Yapılan farklı fitokimyasal analiz sonuçları, antibakteriyel etki sağlayabilecek olan Alkaloidler, Tanenler ve Flavonoidler gibi sekonder metabolitlerin varlığını göstermektedir.

Çetin vd. (2018) tarafından gerçekleştirilen çalışmada *T. officinale'* nin yaprak eksplantlarından organogenez yöntemiyle mikroçoğaltımı yapılmış bitkilerin antimikrobiyal etkisine bakılmıştır. Çalışmada dört haftalık çimlenme fidesinden elde edilen yaprak eksplantları 2 cm²'lik parçalara bölünerek organogenez çalışmaları için 2 mg/L benzil amino pürin (BAP) ve 2 mg /L indol butrik asit (IBA) ile desteklenmiş MS ortamında aktarılmıştır. Elde edilen sürgünler her 4 haftada iki kez alt kültürlenerek sürgünler hasat edilmiş ve 24±2 °C oda sıcaklığında kurutulmuştur. *T. officinale* den elde edilen etanol ve kloroform ekstreleri dokuz bakteri türüne (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 , *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve *Kocuria rhizophila* ATCC 9341) karşı analiz edilmiştir. Sonuç olarak, *T. officinale'* nin etanol ekstreleri, sırasıyla *Escherichia coli* ve *Proteus vulgaris'* e karşı 21 mm ve 23 mm inhibisyon zonları oluşturmuş ancak gram negatif bakteriler üzerinde zayıf etkili bulunmuştur.

Muhammed vd. (2018) çalışmalarında yerel olarak Irak'tan toplanan yabani bitkiler ve *in vitro* ortamda çimlendirilmiş tohumlardan elde edilen *T. officinale* bitkilerinin farklı kısımlarını (yapraklar, saplar ve kökler) kullanmışlar ve *in vitro* ortamda mikroçoğaltım için hızlı ve etkili bir protokol oluşturmak için farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (NAA, BAP, IAA ve BA) ile desteklenmiş Murashige ve Skoog (MS) ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Çalışma sonuçları, *T. officinale* bitkisinin *in vitro* ortamda mikroçoğaltma yeteneğinin doğrudan ve dolaylı organogenez yoluyla gerçekleştiğini göstermiştir. *In vitro* ortamda

çimlendirilmiş bitkinin, yabani bitkiye göre daha iyi bir eksplant kaynağı olduğu, yaprak saplarının doğrudan organogenez yoluyla mikroçoğaltım için köklerin ise dolaylı organogenez için en iyi eksplant olduğunu belirlemişlerdir. En iyi kallus oluşumunun yaprak sapı eksplantlarından, en iyi sürgün oluşumunun kök eksplantlarından ve en iyi kök rejenerasyonunun ise yaprak eksplantlarından gözlemlendiği belirtilmiştir.

Sahu vd. (2018) çeşitli oksin ve sitokinin kombinasyonları ile takviye edilmiş MS ortamı kullanılarak, yaprak kaynaklı kallustan ve *T. officinale'* nin *in vitro* rejenere kültürlerinden biyolojik olarak aktif antioksidan bileşiklerin *in vitro* biyosentezi için etkili ve tekrarlanabilir bir protokol geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda ile 0,25 mg/L 2,4-D (2,4-Dikloro fenoksiasetik asit) ile 0,05 mg/L KIN (kinetin) ve 0,25 mg/L 2,4-D (2,4-Dikloro fenoksiasetik asit) ile 0,05 mg/L 2-iP [N6- (2-İzopentenil adenin)] içeren MS ortamlarında, sırasıyla %80 ve % 92 kallus oluşumları belirlenmiştir. Yaprak eksplantlarından direkt sürgün organogenezi 0,5 mg/L BAP (6-Benzil aminopurin) ve 2,5 mg/L NAA (a-Naftalin asetik asit) içeren besin ortamında gözlenmiştir. Daha sonra çalışmada *in vitro* rejenere olan bitkiler toprağa aktarılmıştır. Yapılan analiz sonuçlarına göre *in vitro* kallus ve rejenere bitkilerin, yabani yetişen bitkilere kıyasla kontrollü koşullarda 38 kat daha fazla kinik asit bileşik içerikli biyosentez yaptığı belirlenmiştir.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Bitki Materyalleri

Tez çalışmasında bitki materyali olarak tıbbi ve ekonomik açıdan önemli olan *Valeriana officinalis*, *Prunella vulgaris* ve *Taraxacum officinale* bitkilerinin yaprak eksplantları kullanılmıştır. Eksplantların elde edilmesi için, *V. officinalis* tohumları *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş, *in vitro* steril olarak elde edilen bitkiciklerden yapraklar izole edilmiştir. Diğer bitkiler olan *P. vulgaris* ve *T. officinale* bitkilerinin yaprak eksplantları ise *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımı yapılan bitkilerden elde edilmiştir.

3.2. Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar ve Laboratuvar Ekipmanları

Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasalların güvenilir markalardan seçilmesi, cihazlar ve laboratuvar ekipmanlarının ise kalibrasyonlarının yapılmış olması elde edilen sonuçların doğruluğu ve başarısı açısından büyük bir önem taşımaktadır. Tez çalışmasında Çizelge 3.1.'de belirtilen cihaz ve laboratuvar ekipmanları kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Ekipmanlar.

ÜRÜN	KULLANIM ALANI
pH metre	Hazırlanan besiyerinin pH'ını ölçmek
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Besiyeri hazırlamak
Otoklav	Malzemeleri steril hale getirmek
Saf su cihazı	Çözelti ve besiyeri hazırlamak
Buzdolabı	Stok solüsyonlarını saklamak
Mikropipet	İstenilen oranda sıvı aktarmak
Cork borer	Eşit ölçülerde eksplant kesmek
Biyogüvenlik kabini	Çalışma esnasında kontaminasyonu önlemek
Hassas terazi	İstenilen oranda tartım yapmak
Beher	Çözelti ve besiyeri hazırlamak

Çizelge 3.1. (devam). Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Ekipmanlar.

Erlen	Çözelti ve besiyeri hazırlamak
Mezür	İstenilen oranda çözelti hazırlamak
Otoklav bandı	Sterilizasyonu kontrol etmek
Pens	Eksplantları ve tohumları tutmak
Bistüri ve Bistüri ucu	Eksplantları kesmek
Peçete	Tohumların sterilizasyon sonrası kurutmak
Buzdolabı poşeti	Otoklava konulacak malzemeleri bir arada tutmak
Porselen levha	Eksplantları düzgün olarak kesmek
Alüminyum folyo	Otoklava konulacak malzemeleri sarmak
Etüv	Bitkileri kurutmak
Çalkalama cihazı	Sıvı kültüre alınan bitkileri çalkalamak
Cam pipet	Besiyeri hazırlarken stok çözeltileri aktarmak
Kauçuk puar	Cam pipete istenilen hacimde stok çözelti çekmek
Parafilm	Kavanoz kapaklarının etrafını kapatmak

Bitki doku kültürü uygulamalarında farklı konsantrasyonlarda elementler içeren birçok besin ortamı bileşimi kullanılmaktadır. Tez çalışmasında, bitki besin ortamı olarak Murashige ve Skoog (MS) tarafından geliştirilen ortam kombinasyonu kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Tohum çimlendirme çalışmaları herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besin ortamında yapılmıştır. Diğer çalışmalarda ise MS besin ortamına eklenen farklı konsantrasyon ve kombinasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicileri ile kök ve kallus oluşumları teşvik edilmiştir.

Çizelge 3.2. MS besin ortamının içeriği (mg/L), (Babaoğlu vd., 2001).

Komponentler	Kültür Ortamındaki Konsantrasyon (mg/L)
Makro	MS
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .H ₂ O	440
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
KH ₂ PO	170
Mikro Elementler	MS
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
Zn SO ₄ 7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25
Cu SO ₄ 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8
Organik Bileşikler	MS
myo-İnositol	100
Nikotinik asit	0,5
Pridoksin-HCL	0,5
Thiamin- HCL	0,1
Glisin	2,0

3.2.1. Stok çözeltilerin hazırlanması ve saklanması

Besiyerinin hazırlanmasındaki ilk basamak, stok çözeltileri hazırlanmasıdır.

Stok çözeltilerin hazırlanması (100 mL için) ;

- i. Çizelge 3.3. MS stok solüsyonları içeriğinde (gr/100ml) bulunan kimyasallar belirtilen gramajlarda tartılarak bir miktar saf suda çözülmüş daha sonra hacimleri 100 mL' ye tamamlanmıştır. Örneğin: Stok A da belirtilen dört kimyasal ayrı ayrı olarak tartılmış. Tartılan kimyasallar 100 ml'lik şişenin içerisine aktarılmış ve öncelikle bir miktar saf su ile çözdürülmüştür. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra çözelti 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- ii. Stok adına göre şişelerinin üzerine harflendirme yapılmış ve hazırlanma tarihleri şişenin üzerine yazılmıştır.
- iii. Güneş ışınlarından korumak amacıyla amber şişeler kullanılmıştır.
- iv. Hazırlanan stok çözeltiler +4° C' de buzdolabında saklanmıştır.

Çizelge 3.3. MS stok çözeltileri içeriği (gr/100ml).

STOK A	Glisin Nikotinik asit Pridoksin-HCL Thiamin- HCL	0,04 0,01 0,01 0,002	VİTAMİNLER
STOK D	Na ₂ EDTA.2H ₂ O FeSO ₄ .7H ₂ O	0,746 0,556	MİKRO ELEMENTLER
STOK E	CaCl ₂ .H ₂ O	8,8	KALSİYUM VE KLORÜR KAYNAĞI
STOK F	KH ₂ PO ₄	3,4	MAKRO ELEMENT
STOK G	H ₃ BO ₃ Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O CoCl ₂ .6H ₂ O KI	0,124 0,005 0,0005 0,0166	MİKRO ELEMENTLER
STOK H	MnSO ₄ .H ₂ O MgSO ₄ .7H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,338 7,4 0,0005 0,1725	MİKRO ELEMENTLER

3.2.2. Bitki büyüme düzenleyicilerinin hazırlanması ve saklanması

Bitki büyüme düzenleyicilerinin hazırlanması (100 mL için) ;

- BAP ve NAA 0,02 g olacak şekilde ayrı ayrı tartılmıştır.
- Çözücüleri olan NaOH 0,1 N olarak hazırlanmıştır.
- Toz halde buluna BAP üzerine damla damla NaOH eklenmiş ve tamamen çözünme gerçekleşinceye kadar karıştırılmıştır.
- Tamamen çözünme gerçekleştikten sonra saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- Aynı işlemler NAA içinde tekrarlanmıştır.
- Şişelerin üzerine içerikleri ve hazırlanma tarihleri yazılmıştır.
- Güneş ışınlarından korumak amacıyla amber şişeler kullanılmıştır.
- Hazırlanan stok çözeltiler +4° C' de buzdolabında saklanmıştır.

Çizelge 3.4. MS besin ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicileri ve çözücüleri.

BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİ	ÇÖZÜCÜ
NAA	NaOH
BAP	NaOH

3.2.3. MS besiyerinin hazırlanması

MS besiyerinin hazırlanması (1 L için) ;

- MS besin ortamını hazırlamak için 1,5 litrelik bir beherin içerisine 500 mL kadar saf su konmuştur,
- Çizelge 3.3'de belirtilen A'dan H'ye kadar olan stok çözeltilerinin her birinden beşer ml puar yardımıyla cam pipete çekilip beher içine ilave edilmiştir,
- Beherin içerisine 30 gr. sakkaroz, 1,9 gr KNO₃ ve 0,1 gr *myo*-İnositol tartılarak ilave edilmiştir.
- Çözeltiye saf su ilave edilerek çözelti hacmi 1 litreye tamamlanmıştır,
- Çözeltinin pH'sı 5,7-5,8 olarak 0,1 N NaOH veya/ve 0,1 N HCl ile ayarlanmıştır,
- Besin ortamının yarı katı olması için 1 litreye 7 gr agar ilave edilmiştir, sıvı besin ortamı hazırlanacak ise agar eklenmemiştir,

- vii. Çözelti, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı yardımıyla yaklaşık 250°C ve 600 rpm de şeffaflaşmaya kadar kaynatılmıştır,
- viii. Hazırlanan besin ortamı, kavanozlar içerisine 30'ar ml olacak şekilde paylaştırılmış ve kavanoz kapakları gevşek şekilde kapatılmıştır,
- ix. Besiyeri, otoklav ile steril edilmiştir.

3.2.4. Bitki büyüme düzenleyicisi eklenmiş MS besiyerinin hazırlanması (250 mL için)

Çizelge 3.5. Bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları.

KOD	NAA-BAP (mg/L)	NAA (mg/250 mL)	BAP (mg/250 mL)
1	0 - 0	-	-
2	1 - 0	1.25	0
3	1 - 0.5	1.25	0.625
4	1 - 1	1.25	1.25
5	2 - 0	2.5	0
6	2 - 0.5	2.5	0.625
7	2 - 1	2.5	1.25
8	3 - 0	3.75	0
9	3 - 0.5	3.75	0.625
10	3 - 1	3.75	1.25

- i. MS besin ortamını hazırlamak için 500 mililitrelik bir beherin içerisine 125 mL kadar saf su konmuştur,
- ii. Çizelge 3.3'de belirtilen A'dan H'ye kadar olan stok çözeltilerinin her birinden 1,25 ml puar yardımıyla cam pipete çekilmiş ve direkt tartılan elementler beher içine ilave edilmiştir,,
- iii. Beherin içerisine 30 gr. sakkaroz, 1,9 gr KNO₃ ve 0.1 gr myo-İnositol tartılarak ilave edilmiştir,
- iv. Çizelge 3.5' de belirtilen hacimlerde BAP ve NAA kodda belirtilen behere mikropipet yardımıyla ilave edilmiştir,
- v. Çözeltiye saf su ilave edilerek çözelti hacmi 250 mililitreye tamamlanmıştır,

- vi. Çözeltinin pH' sı 5.7-5.8 olarak 0.1 N NaOH ve/veya 0.1 N HCl ile ayarlanmıştır,
- vii. Besin ortamının yarı katı olması için 1 litreye 7 gr agar ilave edilmiştir,
- viii. Sıvı kültür hazırlanmak isteniyorsa agar eklenmemiştir,
- ix. Çözelti, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı yardımıyla yaklaşık 250 °C ve 600 rpm de şeffaflaşmaya kadar kaynatılmıştır,
- x. Hazırlanan besin ortamı katı ise, kavanozlar içerisine 25'er ml olacak şekilde paylaştırılmış ve kavanoz kapakları gevşek şekilde kapatılmıştır,
- xi. Hazırlanan besin ortamı sıvı ise, kavanozların hacminin 1/5' i sıvı besin ortamı ile doldurulmuştur.
- xii. Kavanozların üzerine hangi kodlu hormon konsantrasyonuna göre hazırlandıkları yazılmıştır,
- xiii. Besin ortamı kodlarına göre ayrı ayrı poşetlenmiş ve otoklav ile steril edilmiştir.

3.3. Sterilizasyon Aşamaları

Bitki doku kültürü çalışmalarında yapılan sterilizasyon işlemleri çalışmaların başarısı için en önemli aşamalardan birisidir. Bir bitkinin ve patojen bir bakterinin büyümesi gerekli şartlar birbirine çok yakındır. Uygun bir besin ortamı, uygun sıcaklık ve nem miktarı sağlandığında bir bitki kolayca büyüebildiği gibi bir bakteri de kolayca üreyebilmektedir. Ortamdan bakteri ve maya-küflerin uzaklaştırılmasıyla çalışmalar sorunsuz olarak devam edecektir. Aksi takdirde kontamine olan bir ortamda bitki kültürünün yapılması zorlaşacaktır.

Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılacak olan bitki tohumlarının, besiyerinin, ekipmanların ve çalışma ortamının çalışma öncesinde mutlaka steril edilmesi gerekmektedir. Uygulanan sterilizasyon tekniklerinin önceden valide edilmesi, çalışmanın başarısını artıracaktır.

Sterilizasyon işlemlerini, steril edilecek yer ve malzemeye göre 4'e ayırabiliriz;

- Biyogüvenlik kabininin sterilizasyonu
- Alet ve ekipmanların sterilizasyonu
- Besiyeri ve kavanozların sterilizasyonu
- Bitki tohumlarının sterilizasyonu

3.3.1. Biyogüvenlik kabininin sterilizasyonu

Çalışma biyogüvenlik seviye 2 tip kabin kullanılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce kabin içi dikkatli bir şekilde % 70'lik etil alkolle silinmiştir. Kullanılacak malzemeler kabin içine alınmadan önce % 70'lik etil alkolle silinmiş daha sonra kabin ultraviyole lambası 15 dakika açılarak çalışma ortamının steril olması sağlanmıştır.

3.3.2. Alet ve ekipmanların sterilizasyonu

Kullanılacak laboratuvar aletleri (pens, bistüri, bistüri ucu, peçete, süzgeç, fayans, distile su, cork borer) içine yeterli ısı girebilecek şekilde gevşek olarak alüminyum folyoya sarılmıştır. Alüminyum folyoya sarılı aletler setler halinde buzdolabı poşetine konulmuş ve 1 atmosfer basınç altında 20 dakika süre ile 121°C' de otoklavda steril edilmiştir. Sterilitenin kontrolü için otoklav bandı kullanılmıştır.

3.3.3. Besiyeri ve kavanozların sterilizasyonu

İçerisine MS besiyeri konulacak olan kavanozlar ve kapakları döküm yapılmadan önce dikkatli bir şekilde temizlenmiştir. Kontaminasyon riskini azaltmak için kapaklar ve kavanozlar ağızları açık şekilde otoklavlanarak ön sterilizasyon yapılmıştır. MS besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri eklenmiş MS besin ortamı kavanozlara döküldükten sonra aynı konsantrasyonda bitki büyüme düzenleyicisi içeren kavanozlar bir arada olacak şekilde buzdolabı poşetine yerleştirilmiş ve 1 atmosfer basınç altında 20 dakika süre ile 121°C' de otoklavda steril edilmiştir.

3.3.4. Bitki tohumlarının sterilizasyonu

Tohum sterilizasyona başlamadan önce sterilizasyon işleminde kullanılacak malzemelerin steril edilmesi gerekmektedir. Bu yüzden 3 adet içi saf su dolu kavanoz, 2 adet boş kavanoz, alüminyum kağıda sarılı peçeteler, tohum süzgeci ve pensten oluşan set otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. Biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilen işlemde boş şişelerden birisinin içerisine % 70'lik etil alkol diğer boş şişenin içerisine ise %10'luk çamaşır suyu (%0.5 NaOCl içerir) konulmuştur. Sterilizasyon işlemleri için tohumlar süzgeç içine konulduktan sonra sırasıyla 3 dk % 70'lik etil alkol içerisinde ardından 5 dakika % 10' luk çamaşır suyunda (%0.5 NaOCl içerir) bekletilmiştir. Böylece tohumlar üzerlerinde bulunması muhtemel olan mikroorganizmalardan

arındırılmıştır. Uygulanan kimyasalların uzaklaştırılması amacıyla tohumlar 3 er dakika 3 ayrı distile steril su içinde durulanmışlardır.

Çizelge 3.6. Tohum Sterilizasyonu.

%70'lik Etil Alkol	%10'luk Çamaşır Suyu (%0.5 NaOCl içerir)	Steril dH ₂ O
3 Dakika	5 Dakika	3 Seri – 3'er Dakika

3.4. *In Vitro* Doku Kültürü Çalışmaları

Çalışmada *V. officinalis*; *P. vulgaris*; *T. officinale* yaprak eksplantlarına uygulanan bitki büyüme düzenleyicilerin etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda yalnızca BAP ve BAP ile NAA kombinasyonundan oluşan 9 uygulama ve ek olarak kontrol amacı ile herhangi bir büyüme düzenleyicisi içermeyen 10 MS besin ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. *V. officinalis*; *P. vulgaris*; *T. officinale* yaprak eksplantlarına uygulanan bitki büyüme düzenleyicileri.

Bitki Büyüme Düzenleyiciler (mg/L)					
	NAA	BAP		NAA	BAP
1	0	0	6	2	0.5
2	1	0	7	2	1
3	1	0.5	8	3	0
4	1	1	9	3	0.5
5	2	0	10	3	1

3.5. *P. vulgaris* *In Vitro* Doku Kültürü Çalışmaları

3.5.1. *P. vulgaris* yaprak eksplantlarına bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi

In vitro koşullarda mikroçoğaltım sonucu elde edilmiş *P. vulgaris* bitkisinin yaprakları farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren MS besin ortamlarına aktarılmışlardır (Çizelge 3.5). Yapraklar cork borer yardımıyla 1cm²'lik büyüklükte kesilmiştir. Eksplantlar 5 adet kavanoza her

bir kavanozda 3 yaprak olacak şekilde aktarılmıştır. Her uygulama için 15 eksplant toplamda ise 150 eksplant kullanılmıştır. Eksplantlar 22 hafta boyunca kültüre edilmişlerdir ve 2 alt yarı katı kültür ve 1 alt sıvı kültür olmak üzere toplam 3 alt kültüre alınmıştır. En iyi gelişim gösteren 2-3-4-8 numaralı uygulamalardaki eksplantlar ise gelişimlerinin devamı amacıyla 1 defa daha alt sıvı kültüre alınarak toplam 4 alt kültür yapılmıştır. Düzenli olarak yapılan gözlemler sonucunda eksplantlarda meydana gelen; ilk köklenme, ilk kallus, kallus büyüklüklerindeki ve sayılarındaki artış oranları tespit edilmiştir. Kültür işlemleri sonucunda elde edilen materyaller oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kuruyan kök ve kalluslar tartılarak antimikrobiyal aktivite analizleri için saklanmıştır.



Şekil 3.1. *In vitro* koşullarda mikroçoğaltımı yapılan *P. vulgaris*.

3.6. *V. officinalis* tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesi

Biyogüvenlik kabinine daha önceden otoklavda steril edilmiş malzemeler ve MS besiyeri içeren kavanozlar % 70'lik etil alkolle silinerek alınmıştır. Steril edilmiş tohumlar steril pens yardımıyla MS besiyeri içeren kavanozlara aktarımları gerçekleştirilmiştir. Tohum yerleştirilmiş olan kavanozların üzerleri etiketlenmiş ve kapakları kapatıldıktan sonra etrafı parafilm veya streç film yardımıyla sarılarak dışarıdan gelen kontaminasyonları önlemek için hava ile teması tamamen

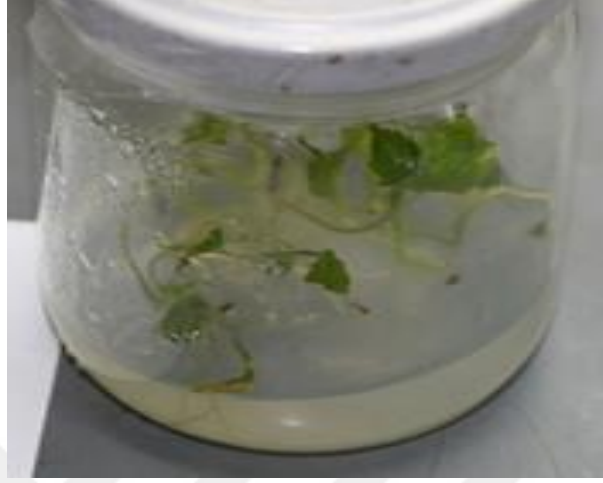
engellenmiştir. Kavanozlar bitki büyüme odasında 24 ± 2 °C de 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık koşullarda inkübe edilmişlerdir. Tohumların çimlenme kontrolü 7 gün ara ile yapılmış ve ilk çimlenme günü belirlenmiştir.



Şekil 3.2. *V. officinalis* tohumları.

3.6.1. *In vitro* çimlendirilen *V. officinalis* yaprak eksplantlarına bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi

MS besin ortamına ekimi yapılan *V. officinalis* tohumlarından 12 hafta sonunda elde edilen bitkilerinden izole edilen yapraklar farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren MS besin ortamlarına aktarılmışlardır (Çizelge 3.5). Eksplantlar bir kavanozda eşit büyüklükte 3 adet olacak şekilde her ortamdan 5'er kavanoza aktarılmıştır. Her uygulama için 15 eksplant toplamda ise 150 eksplant ile çalışılmıştır. Eksplantlar 23 hafta boyunca kültüre edilmiş; 2 alt yarı katı kültür ve 1 alt sıvı kültür olmak üzere toplam 3 defa alt kültüre alınmışlardır. Alt kültüre almak yani aynı bitki büyüme düzenleyicisi konsantrasyona sahip MS besiyerine eksplantları aktarmak, eksplantlar açısından besin yetersizliğine bağlı gelişmeme durumunu engellemektedir. Düzenli aralıklar ile yapılan gözlemler sonucunda eksplantlarda meydana gelen gelişmeler belirlenmiştir. Kültür işlemleri sonucunda elde edilen kök ve kalluslar hasat edilerek gölgede oda sıcaklığında kurutulmuşlar, antimikrobiyal aktivite analizleri için saklanmıştır.



Şekil 3.3. Çimlenmiş *V. officinalis*.

3.7. *T. officinale* *İn Vitro* Doku Kültürü Çalışmaları

3.7.1. *T. officinale* yaprak eksplantlarına bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi

İn vitro koşullarda mikroçoğaltım ile büyütülmüş olan *T. officinale* bitkisinin yaprak eksplantları farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren MS besin ortamlarına aktarılmışlardır (Çizelge 3.5). Eksplantlar bir kavanozda 3 yaprak olacak şekilde her ortamdan 5'er kavanoza aktarılmıştır. Her farklı konsantrasyon için 15 eksplant toplamda ise 150 eksplant kullanılmıştır. Yapraklar çok ince olması nedeniyle bistüri yardımıyla eşit boylarda kesilmiştir. Eksplantlar 12 hafta boyunca kültür ortamlarında inkübe edilmişlerdir. Eksplantlarda meydana gelebilecek kararma ve besin eksikliği problemlerinin önlenmesi amacıyla, dört hafta ara ile 2 defa alt yarı katı kültür işlemi yapılmıştır. Düzenli olarak yapılan gözlemler sonucunda eksplantlarda meydana gelen gelişmeler; ilk kallus gözlenme zamanı, kallus oluşum ve gelişim durumları ile kalluslardan meydana gelen kök sayıları tespit edilmiştir. Kültür işlemleri sonucunda elde edilen materyaller 40 °C' de etüvde 48 saat kurutulmuşlardır. Kuruyan kök ve kalluslar tartılarak antimikrobiyal aktivite analizleri için saklanmıştır.



Şekil 3.4. *In vitro* koşullarda mikroçoğaltımı yapılan *T. officinale*.

3.8. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Uygulamalar sonucunda elde edilen kallus ve kök ekstrelerinin elde edilmesi için kuru materyaller 0.3 gram tartılarak 5 ml etanol içerisine alınmıştır. Ekstraksiyon işlemi karanlıkta, oda sıcaklığında ve 120 rpm hızında çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Onuncu gün sonunda etanol bir süzgeç aracılığı ile süzülerek ayrılmış ve evaporatörde uçurularak ekstreler elde edilmiştir. Her bir ekstreline üzerine 5 ml DMSO ilave edilerek ekstre tekrar çözülmüş ve antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılacak süspansiyonlar elde edilmiştir. Testlerde bakteri kültürü olarak *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Enterococcus faecalis*; *Escherichia coli* ve fungus kültürü olarak da *Candida krusei* kullanılmıştır. Her bir mikroorganizma öncelikle Mueller Hinton Broth besiyerine aktarılarak 48 saat 30 °C’ de inkübe edilmiştir. 48 saat boyunca 30 ° C’de inkübe edilen bakteriyel suşlar % 0.85 NaCl içinde süspansiyon haline getirildi ve 0,5 MacFarlanda ayarlanmıştır. Daha sonra bu kültürlerden Mueller Hinton Agar besiyeri yüzeyine steril eküvyon ile yayma ekim yapılmış ve tüm petri yüzeyine boşluk bırakılmadan mikroorganizma aşılama sağlanmıştır. Tüm petri kaplarının merkezine steril cam pastör pipeti ile 6 mm çapında kuyucuklar açılmış ve bitki ekstresi örneklerinden bu kuyucuklara 0,5 ml aktarım yapılmıştır. Aşılama ve aktarım işlemleri sonrası petri kapları 24-48 saat süre ile 30 °C’ de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca petri kapları incelenerek mikrobiyal gelişimin olmadığı zon çapları ölçülerek kaydedilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Prunella vulgaris* Bitkisi ile Yapılan Çalışma Bulguları

4.1.1. *P. vulgaris* bitki eksplantlarına bitki büyüme düzenleyicilerin etkileri

Mikroçoğaltım ile elde edilmiş olan *P. vulgaris* bitkiciklerinin yaprakları cork borer yardımıyla 1 cm²' lik eksplantlar halinde kesilerek farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda BAP ve NAA içeren MS besin ortamlarında (Çizelge 3.7) inkübe edilmişlerdir. Eksplantlar 2 defa yarı katı kültüre alınmıştır. Öncelikle bu kültür uygulamalarında en iyi gelişimi gösteren 4 deney grubundaki (2, 3, 4, 8) eksplantlar sıvı kültürlerle aktarılmışlardır. Daha sonra ise tüm deney grupları alt sıvı kültüre alınarak toplam 4 alt kültüre alınmıştır. Kültür çalışmaları yaklaşık 22 hafta sürmüştür.

Yapılan gözlemler sonucunda kök oluşumlarının yaprak eksplantlarının yaralı bölgelerinde meydana geldiği, köklerin MS ortama değdikleri yerlerde kallus oluşturdıkları ve bu bölgelerden tekrar çok sayıda kök oluşturdıkları belirlenmiştir. Kültür işlemlerinin 26. gününde yapılan gözlemler sonucunda ilk kök oluşumları 3 mg/L NAA (Deney Grup No:8) içeren besin ortamında %80, 1 mg/L NAA (Deney Grup No:2) içeren besin ortamında %53.3 ve 2 mg/L NAA (Deney Grup No:5) içeren besin ortamında %46.6 oranlarında belirlenmiştir. Kültür işlemlerinin 47. gününde yapılan gözlemlerde tüm uygulamalarda kök oluşumları gözlenmiştir. En iyi kök gelişimleri yine ilk kök oluşumlarının gözlendiği 3 mg/L NAA(Deney Grup No:8) içeren besin ortamında %80 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4. 5.).

En iyi kök gelişimleri 3, 4, 8 numaralı deney gruplarında, en uzun kök oluşumları 2, 4, 8 numaralı deney gruplarında kültüre alınan yaprak eksplantlarında gözlenmiştir. Sıvı kültür çalışmaları için, öncelikle en iyi ve en uzun kök gelişimlerinin gözlendiği 2, 3, 4 ve 8 numaralı deney gruplarında elde edilen kökler seçilmiştir ve kökler aynı bitki büyüme düzenleyicileri içeren sıvı ortamlarda alt kültüre alınmışlardır (Şekil 4.13. ; 4.14.; 4.15.; 4.19.).

Yapılan uygulamalar sonucunda herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol grubu hariç tüm uygulamalarda kallus oluşumları gözlenmiştir. En iyi kallus oluşumları 3 mg/L NAA (Deney Grup No:8) bitki büyüme düzenleyicisini içeren MS besin ortamında gözlenmiştir.

Çizelge 4.1. *P. vulgaris* 'e ait Gözlem Sonuçlarına Göre Belirlenen Kök ve Kallus Yüzdeleri.

Deney Grubu	NAA	BAP	Eksplant sayısı			4. Hafta % Kallus	4. Hafta % Kök	7. Hafta % Kallus	7. Hafta % Kök	12. Hafta % Kallus	12. Hafta % Kök
			1.	2.	3.						
1	0	0	15	15	15	0	0	0	0	0	0
2	1	0	15	15	15	%80	%53.3	%80	%60	%80	%66.6
3	1	0.5	15	12	12	%93.3	%0	%100	%75	%100	%91.6
4	1	1	15	15	15	%80	%0	%93.3	%13.3	%93.3	%73.3
5	2	0	15	15	15	%86.6	%46.6	%86.6	%60	%86.6	%60
6	2	0.5	15	15	15	%73.3	%13.3	%73.3	%53.3	%80	%66.6
7	2	1	15	15	15	%73.3	%0	%73.3	%26.6	%73.3	%60
8	3	0	15	15	15	%100	%80	%100	%80	%100	%80
9	3	0.5	15	15	15	%60	%0	%60	%40	%60	%60
10	3	1	15	3	3	%0	%0	%33.3	%33.3	%33.3	%33.3

Çizelge 4.2. *P. vulgaris* 'e ait gözlem sonuçlarına göre 7 hafta sonra belirlenen kök, kallus ve toplam kök sayıları.

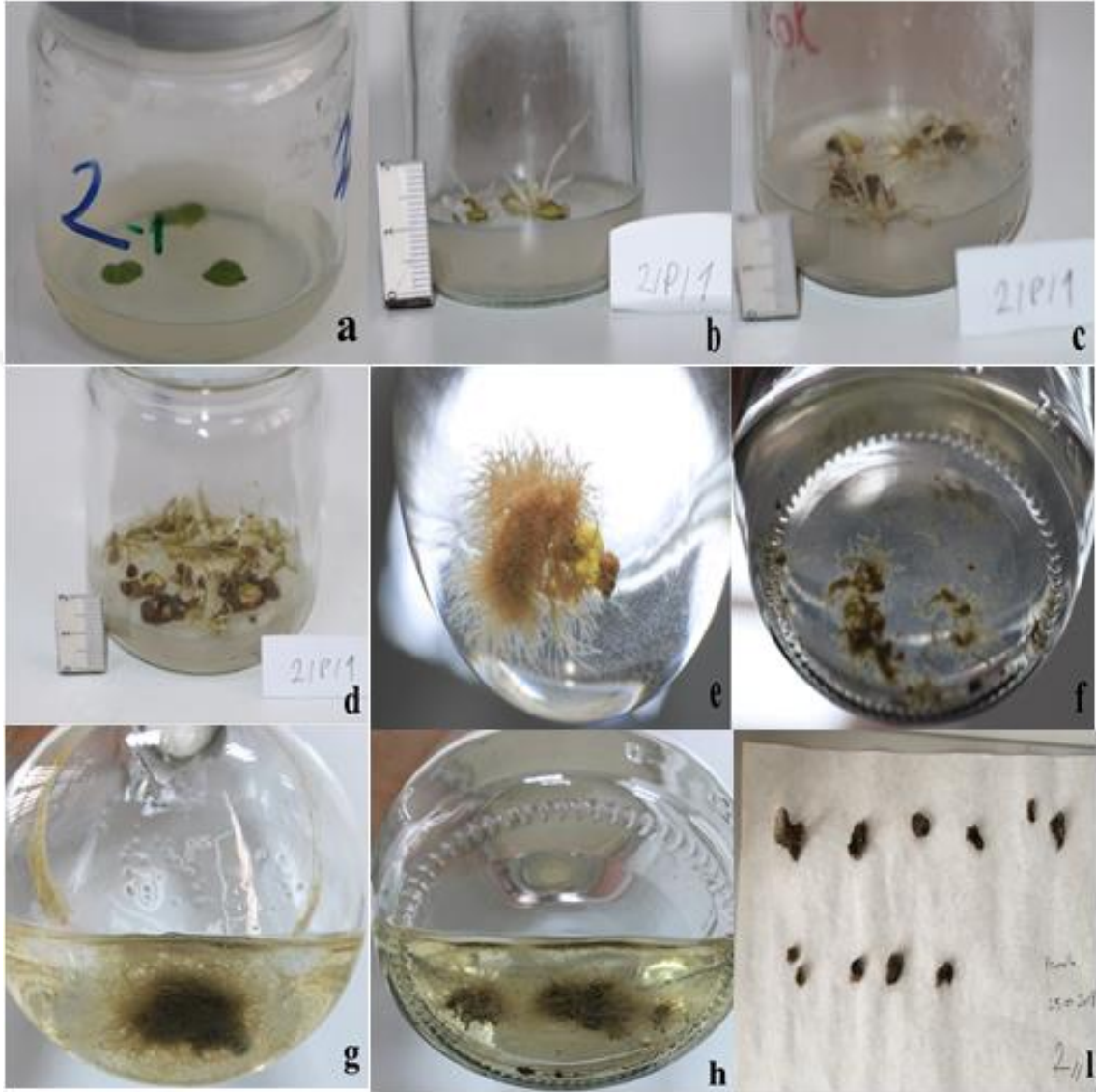
Deney grubu	Kavanoz numarası	Eksplant sayısı	Kallus oluşturan eksplant sayısı	Kök oluşturan eksplant sayısı	Eksplantlarda oluşan kök sayıları
2	1	3	2	2	25+11
	2	3	3	3	Çok sayıda
	3	3	1	1	30
	4	3	3	2	7+11
	5	3	3	1	5
3	1	3	3	2	1+3
	2	3	3	2	5+9
	3	Kontamine			
	4	3	3	3	1+1+1
	5	3	3	2	2+3
4	1	3	3	0	0
	2	3	3	1	4
	3	3	2	0	0
	4	3	3	0	0
	5	3	3	1	3

Çizelge 4.2. (devam). *P. vulgaris* 'e ait gözlem sonuçlarına göre 7 hafta sonra belirlenen kök, kallus ve toplam kök sayıları.

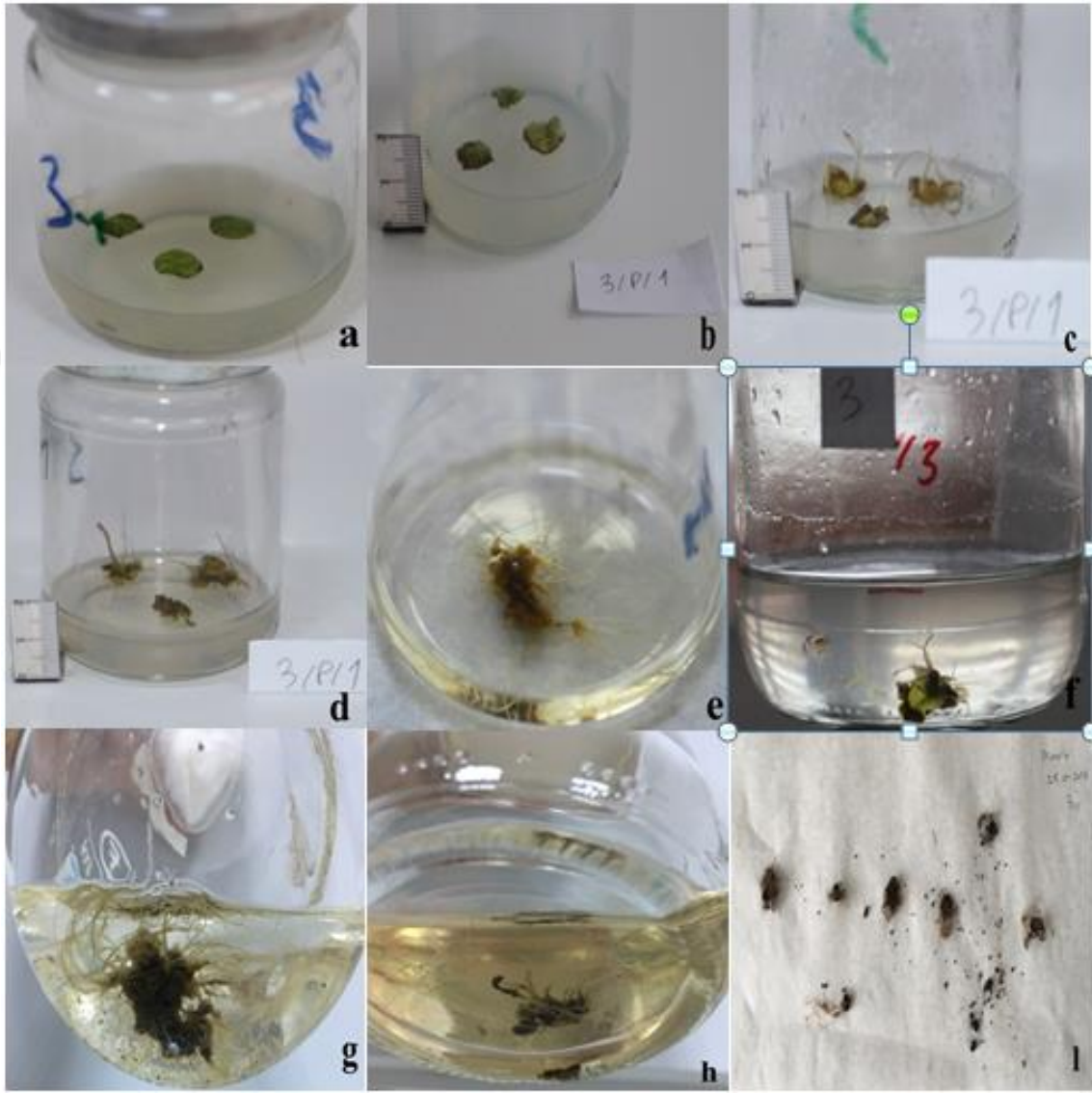
Deney grubu	Kavanoz numarası	Eksplant sayısı	Kallus oluşturan eksplant sayısı	Kök oluşturan eksplant sayısı	Eksplantlarda oluşan kök sayıları
5	1	3	3	3	1+11+18
	2	3	3	3	8+2+13
	3	3	3	1	11
	4	3	2	0	0
	5	3	2	2	2+17
6	1	3	2	0	0
	2	3	3	2	6+13
	3	3	2	2	3+1
	4	3	2	2	7+7
	5	3	2	2	8+4
7	1	3	2	1	1
	2	3	3	1	4
	3	3	2	0	0
	4	3	2	1	2
	5	3	2	1	7
8	1	3	3	1	10
	2	3	3	2	15+6
	3	3	3	3	12+4+ÇOK
	4	3	3	3	20+14+2
	5	3	3	3	18+1+6
9	1	3	2	2	1+1
	2	3	2	0	0
	3	3	1	1	4
	4	3	3	2	15+4
	5	3	1	1	15
10	1	KONTAMİNE			
	2				
	3				
	4	3	1	1	1
	5	KONTAMİNE			

Çizelge 4.3. Uygulamalar sonucunda elde edilen ve antimikrobiyal analiz için kurutulan *P. vulgaris* 'e ait kök -kallus toplam miktarları (gr).

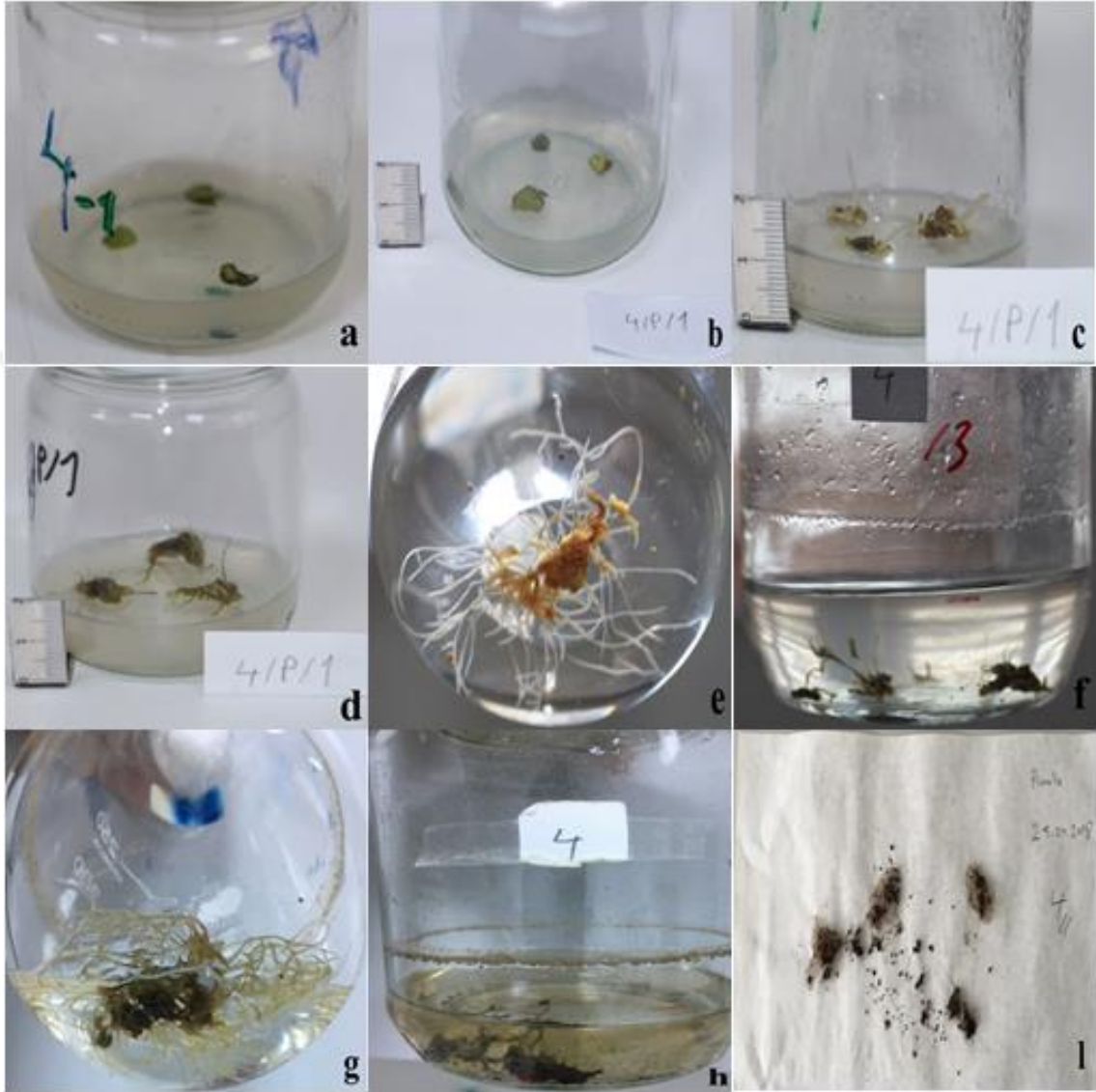
Deney Grup No	Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)		Elde edilen kök-kallus miktarı (gr)
	NAA	BAP	
2	1	0	0.9920 g
3	1	0.5	0.8555 g
4	1	1	0.9865 g
5	2	0	0.39 g
6	2	0.5	0.257 g
7	2	1	0.5180 g
8	3	0	1.8365 g



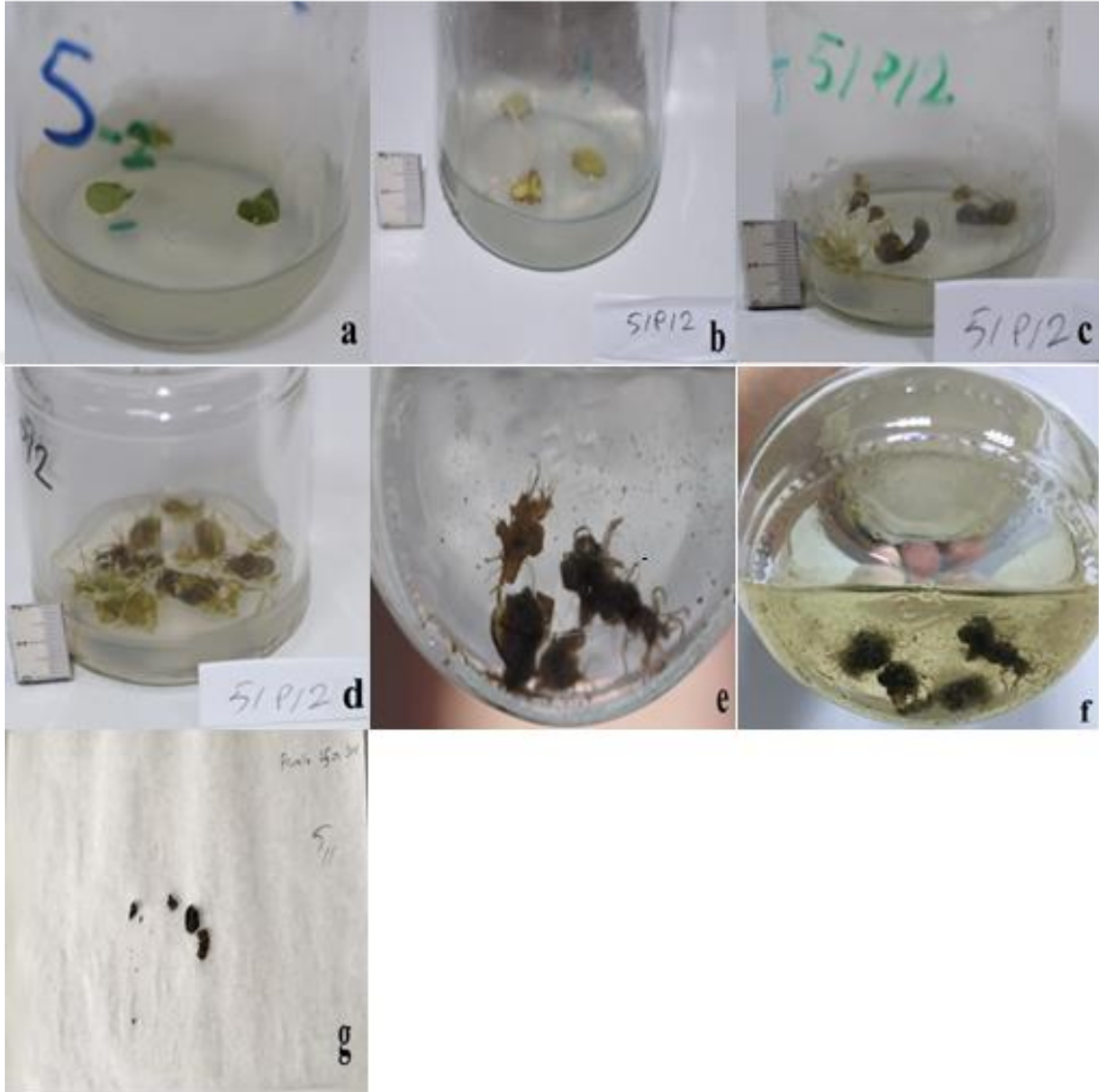
Şekil 4.1. 1 mg/L NAA içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 21 günlük, c) 58 günlük, d) 91 günlük, e) 102 günlük, f) 115 günlük, g) 149 günlük, h) 149 günlük (aktarım), ı) 172.gün kurutulan kök ve kalluslar.



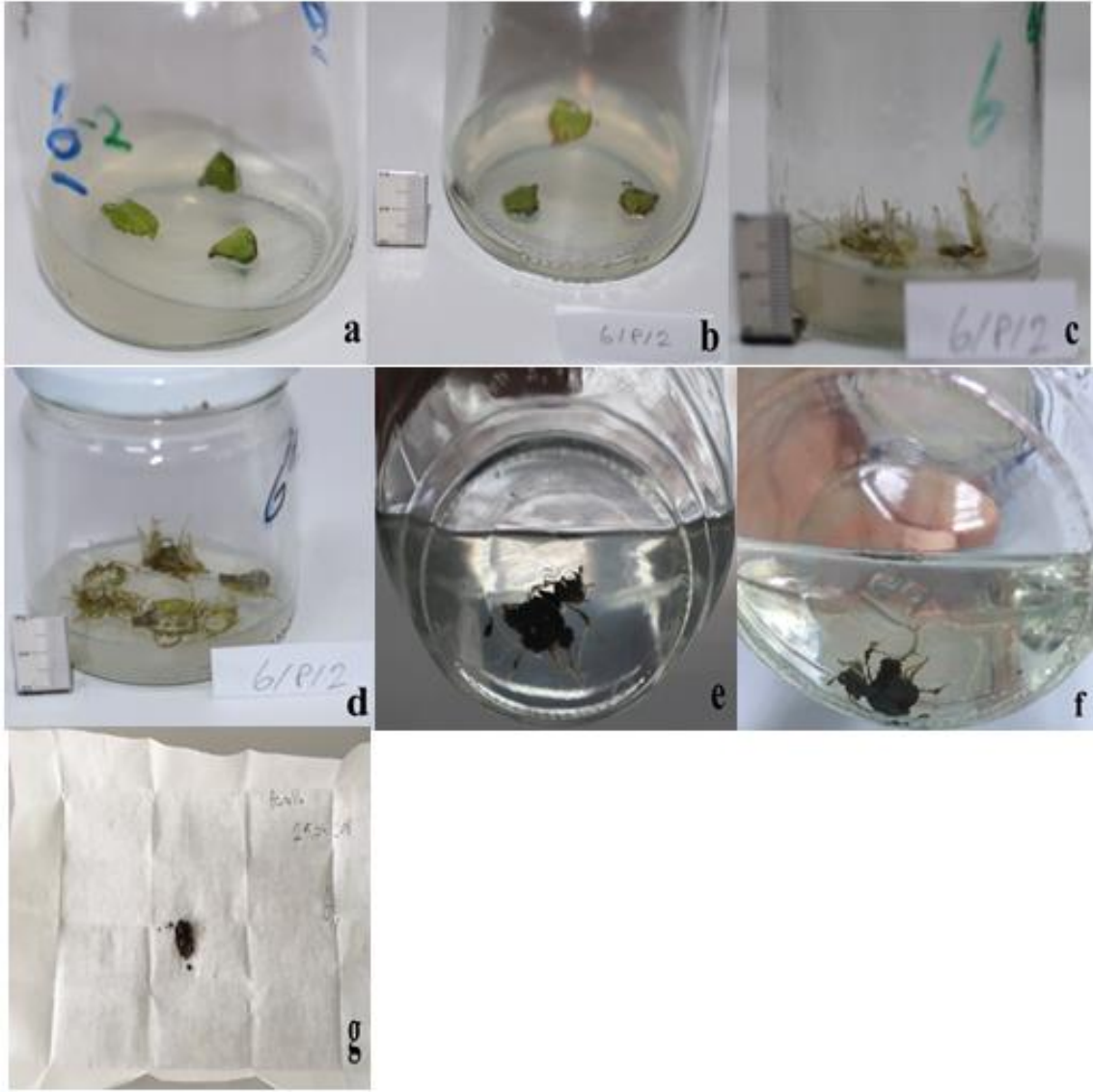
Şekil 4.2. 1 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 21 günlük, c) 58 günlük, d) 91 günlük, e) 102 günlük, f) 115 günlük, g) 149 günlük, h) 149 günlük(aktarım), ı) 172.gün kurutulan kök ve kalluslar.



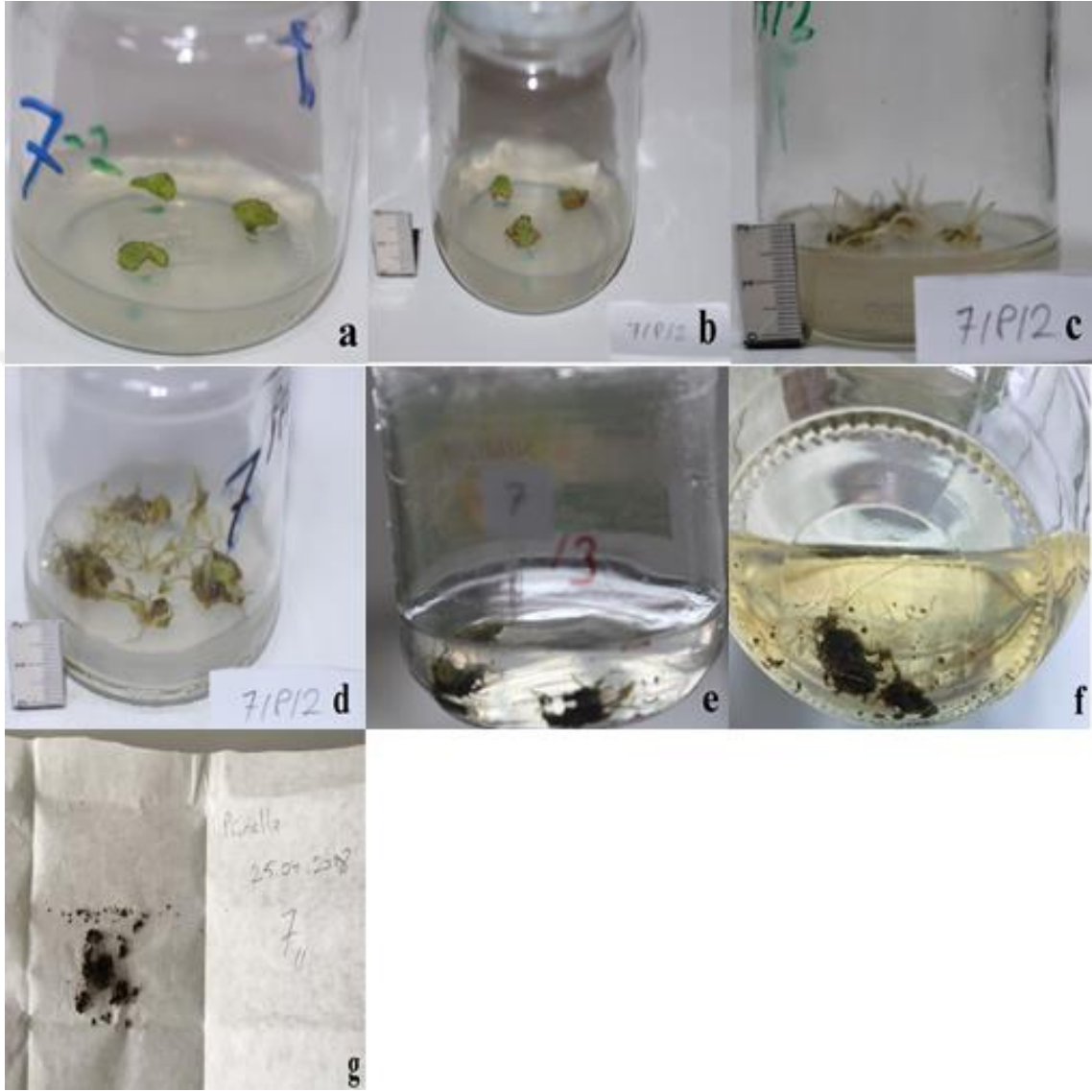
Şekil 4.3. 1 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 21 günlük, c) 58 günlük, d) 91 günlük, e) 102 günlük, f) 115 günlük, g) 149 günlük, h) 149 günlük(aktarım), ı) 172.gün kurutulmuş kök ve kalluslar.



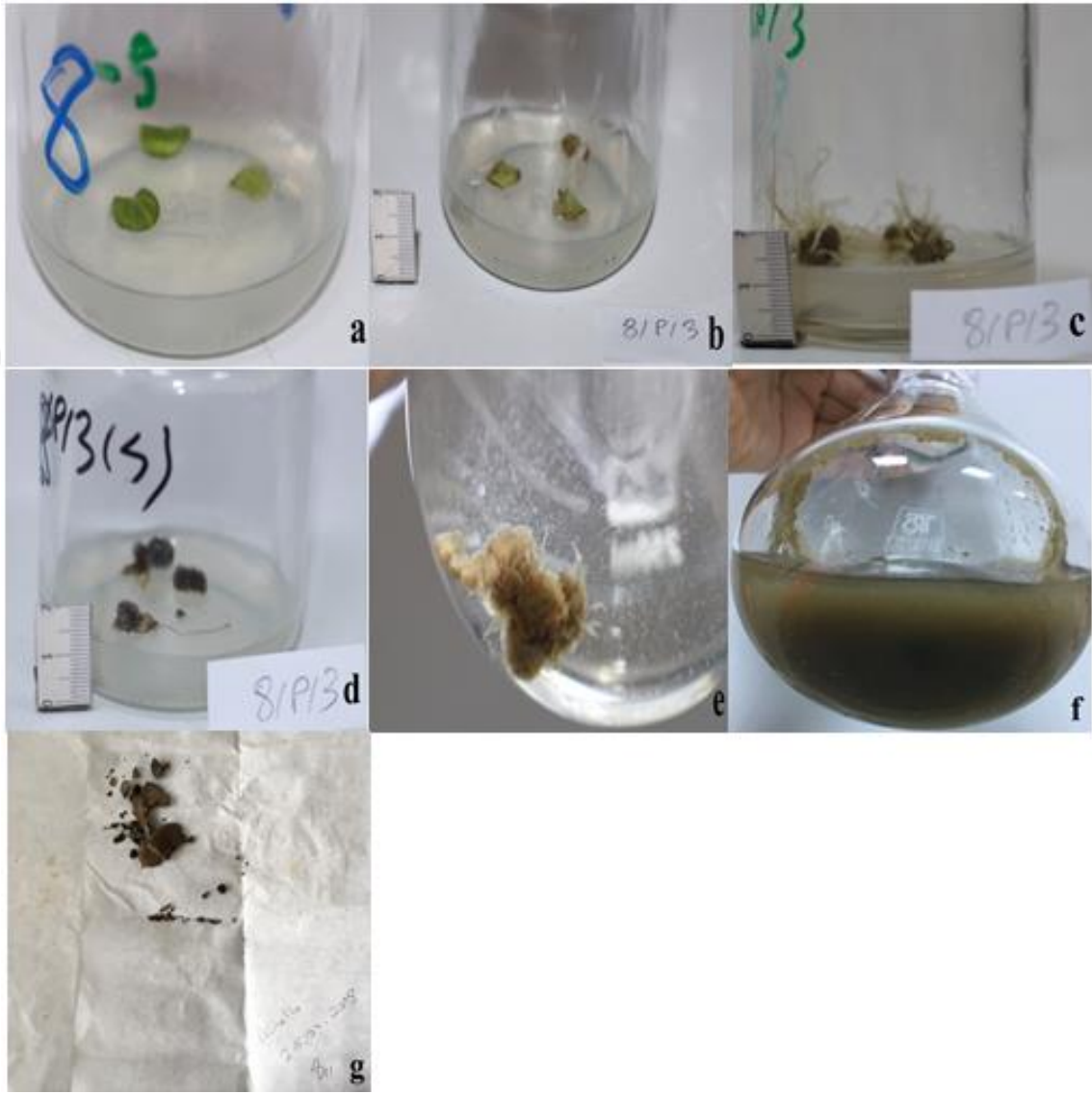
Şekil 4.4. 2 mg/L NAA içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 21 günlük, c) 58 günlük, d) 91 günlük, e) 115 günlük, f) 149 günlük, g) 172. gün kurutulmuş kök ve kalluslar.



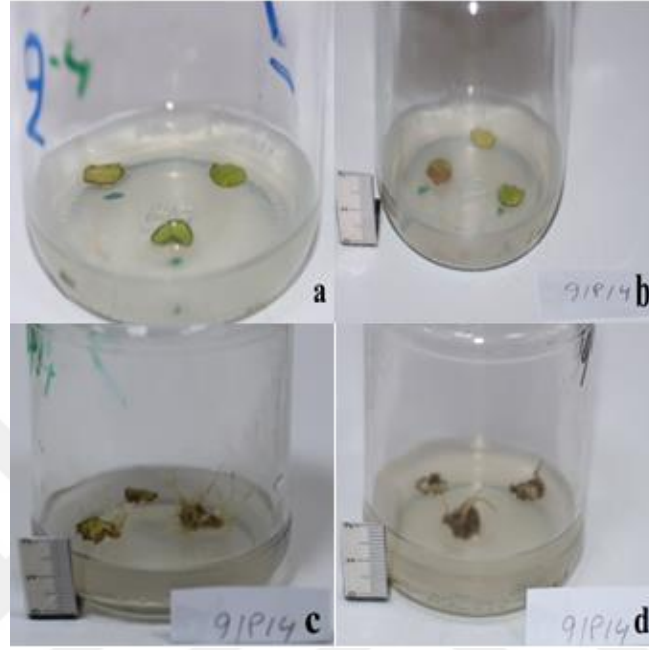
Şekil 4.5. 2 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 21 günlük, c) 58 günlük, d) 91 günlük, e) 115 günlük, f) 149 günlük, g) 172.gün kurutulan kök ve kalluslar.



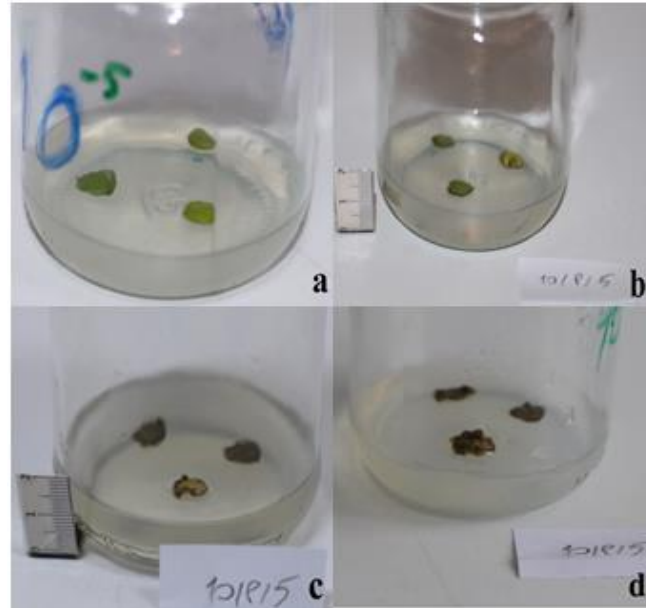
Şekil 4.6. 2 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 21 günlük, c) 58 günlük, d) 91 günlük, e) 115 günlük, f) 149 günlük, g) 172.gün kurutulmuş kök ve kalluslar.



Şekil 4.7. 3 mg/L NAA içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 21 günlük, c) 58 günlük, d) 91 günlük, e) 102 günlük, f) 149 günlük, g) 172. gün kurutulmuş kök ve kalluslar.

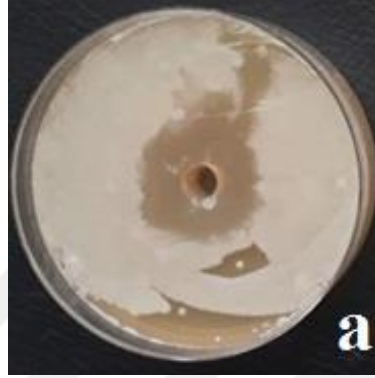


Şekil 4.8. 3 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 21 günlük, c) 58 günlük, d) 91 günlük.



Şekil 4.9. 3 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 21 günlük, c) 58 günlük, d) 91 günlük.

4.1.2. Elde edilen *P. vulgaris* adventif köklerinin ve kalluslarının antimikrobiyal aktivite sonuçları



Şekil 4.10. 3 mg/L NAA içeren MS besin ortamındaki yapraklardan oluşan kallus kültürünün bakterilere karşı oluşturmuş oldukları zonlar.

Çizelge 4.4. *P. vulgaris* 'e ait antimikrobiyal aktivite zon çapları (mm).

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)			Zon Çapı (mm)				
DENEY GRUBU	NAA	BAP	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida krusei</i>
2	1	0	0	15	0	10	0
3	1	0.5	0	14	0	12	0
4	1	1	0	15	0	12	0
5	2	0	0	0	0	0	0
6	2	0.5	0	0	0	0	0
7	2	1	0	0	0	0	0
8	3	0	0	25	0	18	0

“0” olarak yazılanlar tekrarlanan denemelerde istatistiksel olarak anlamsız sonuçlar alınan veya hiç zon çapı görülmeyen olarak değerlendirilmiştir.

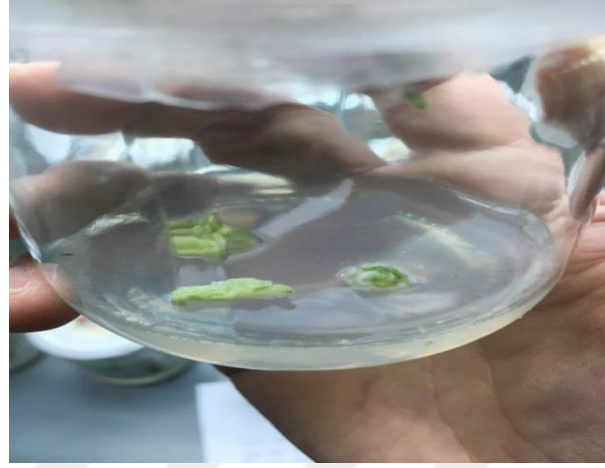
4.2. *Valeriana officinalis* Bitkisi ile Yapılan Çalışmaların Bulguları

4.2.1. *V. officinalis* tohumlarının *in vitro* çimlendirme bulguları

Steril eksplantların elde edilmesi amacıyla *V. officinalis* tohumları 3 dakika etil alkol, 5 dakika çamaşır suyunda (%0.5 NaOCl içerir) bekletilerek yüzey sterilizasyonu işlemlerinden geçirilmiştir. Tohumlar *in vitro* koşullarda başarı ile çimlendirilmiş, herhangi bir kontaminasyon problemi ile karşılaşılmamıştır. Yapılan haftalık gözlemler sonucunda ilk çimlenmelerin 17. günde olduğu belirlenmiştir.

4.2.2. *In vitro* çimlendirilen *V. officinalis* yaprak eksplantlarına bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi

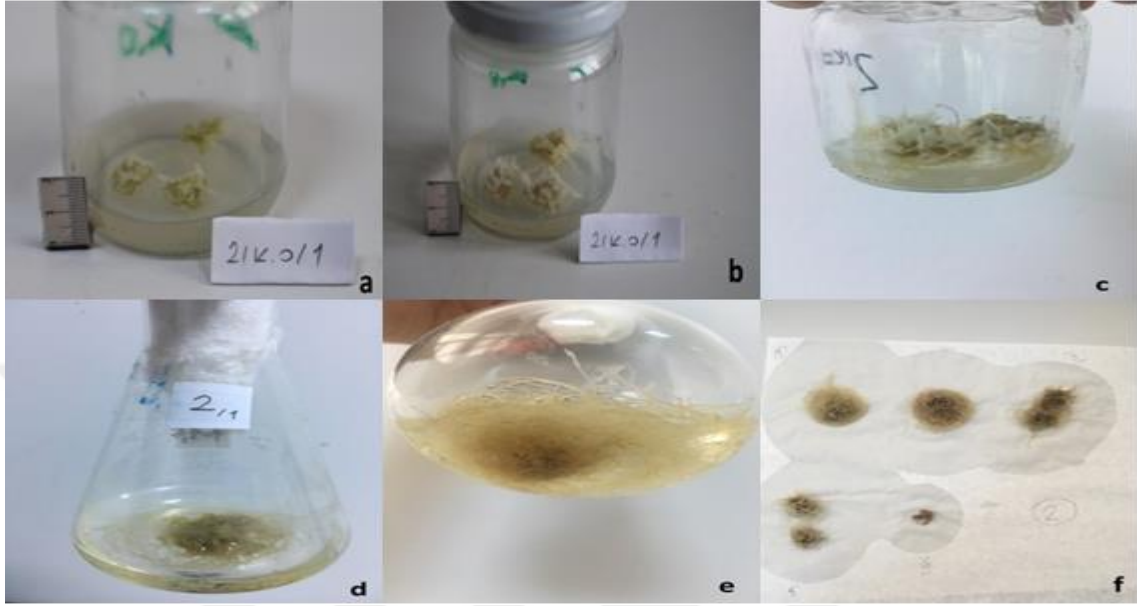
Elde edilen *V. officinalis* bitkiciklerinin yaprakları, 1 cm²' lik eksplantlar halinde kesilerek farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda BAP ve NAA içeren MS besin ortamlarında (Çizelge 3.7) inkübe edilmişlerdir. Eksplantlar 2 defa yarı-katı, 1 defa sıvı olarak alt kültüre alınmış, kültür işlemleri 23 hafta sürmüştür. Sıvı kültüre alınan eksplantlar, yarı-katı kültür ortamında en iyi gelişim gösteren eksplantlardan seçilmiş olup her deney grubundan 6 eksplant seçilmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda ilk olarak 1 mg/L NAA (Deney Grup No:2) içeren MS besin ortamında kök oluşumları belirlenmiştir (Şekil 4.1.). Kontrol grubu hariç tüm deney gruplarında kök oluşumları üçüncü hafta sonunda gözlenmiştir (Çizelge 4.1.) (Şekil 4.2. ; 4.3. ; 4.4. ; 4.5. ; 4.6. ; 4.7. ; 4.8. ; 4.9. ; 4.10.). Yapılan tartım işlemleri sonucunda en yüksek kök ağırlığı 2 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP (Deney Grup No:6) içeren MS besin ortamında elde edilmiştir (Şekil 4.6.). Yapılan kültür işlemleri sonucunda elde edilen kökler antimikrobiyal etki çalışmaları için oda sıcaklığında gölgede kurutulmuşlardır.



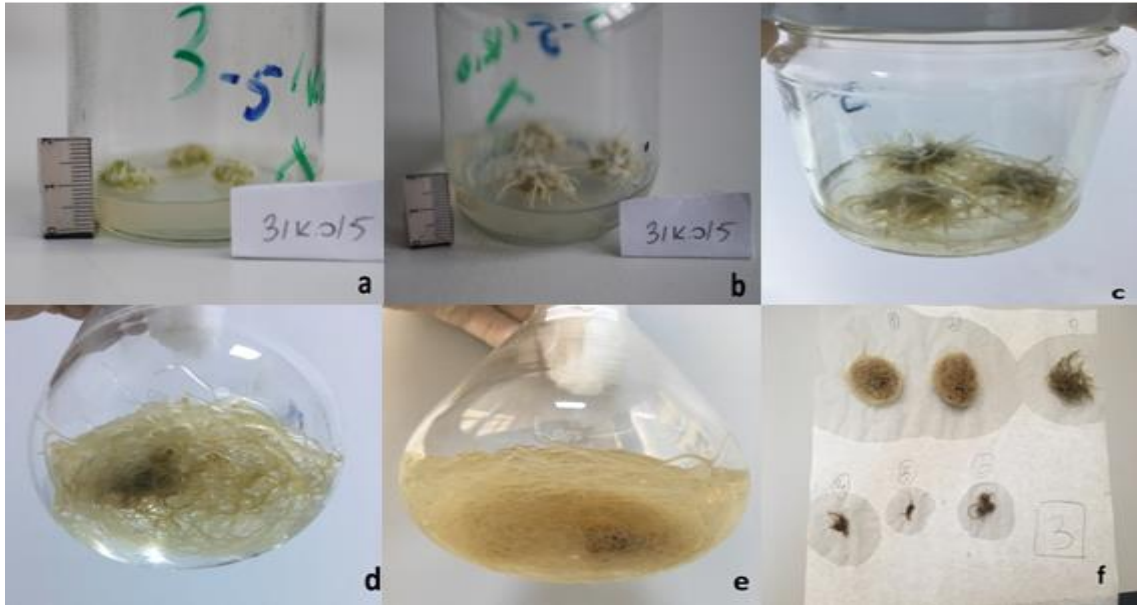
Şekil 4.11. *V. officinalis* yaprak eksplantlarında gözlenen ilk kök oluşumları (1 mg/L NAA + MS).

Çizelge 4.5. *V. officinalis* yaprak eksplantlarında kök oluşturan eksplant sayısı ve kök oluşturma yüzdesi.

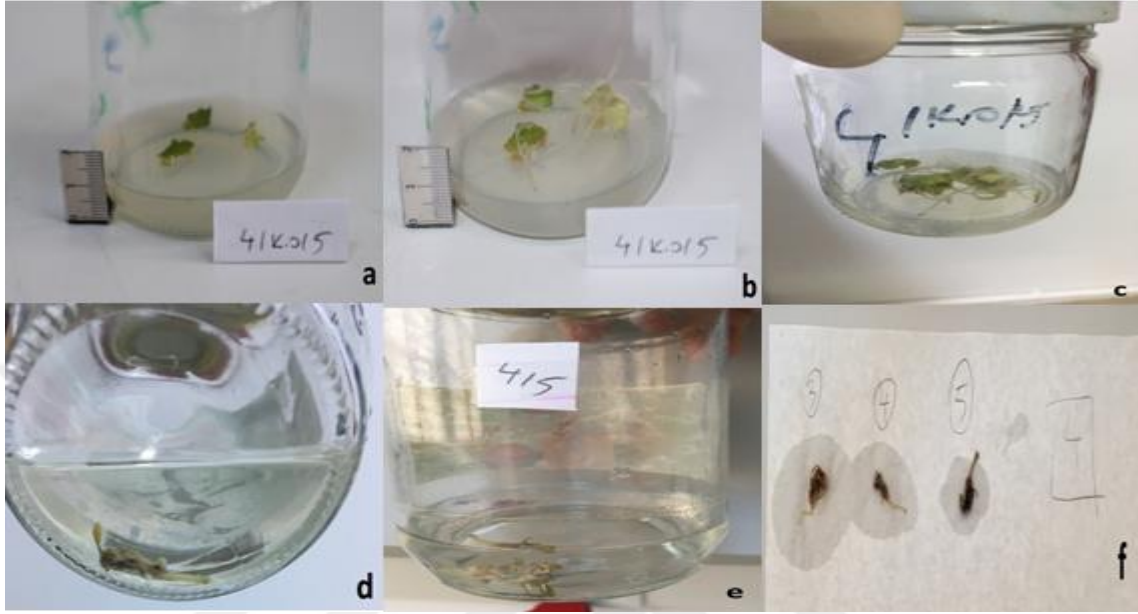
Deney Grup No	Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)		2. hafta gözlemleri			3.hafta gözlemleri		
	NAA	BAP	Eksplant sayısı	Kök oluşturan eksplant sayısı	Kök oluşturma yüzdesi	Eksplant sayısı	Kök oluşturan eksplant sayısı	Kök oluşturma yüzdesi
1	0	0	15	0	0	15	0	0
2	1	0	15	12	80	15	14	93
3	1	0.5	15	15	100	15	15	100
4	1	1	15	7	47	15	14	93
5	2	0	15	4	27	15	15	100
6	2	0.5	15	2	13	15	14	93
7	2	1	15	2	13	15	15	100
8	3	0	15	6	40	15	12	80
9	3	0.5	15	15	100	15	15	100
10	3	1	15	6	40	15	14	93



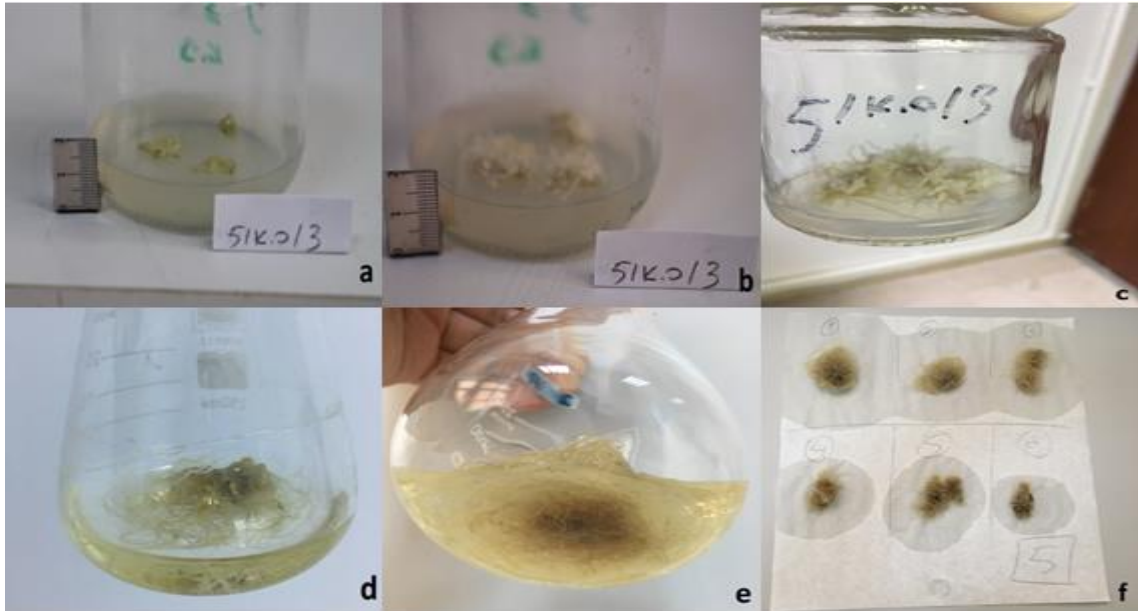
Şekil 4.12. 1 mg/L NAA içeren MS besi ortamlarında oluşan adventif kökler a) 15 günlük, b) 36 günlük, c) 71 günlük, d) 111 günlük, e) 136 günlük, f)Kurutulan kökler.



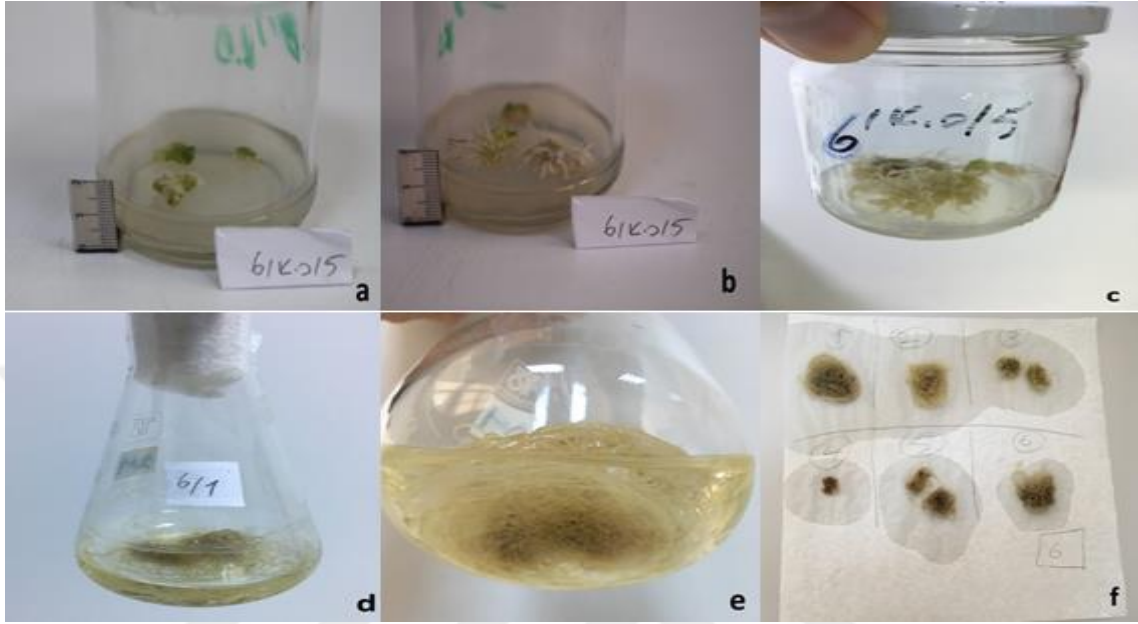
Şekil 4.13. 1 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP içeren MS besi ortamlarında oluşan adventif kökler a) 15 günlük, b) 36 günlük, c) 71 günlük, d) 111 günlük, e) 136 günlük, f)Kurutulan kökler.



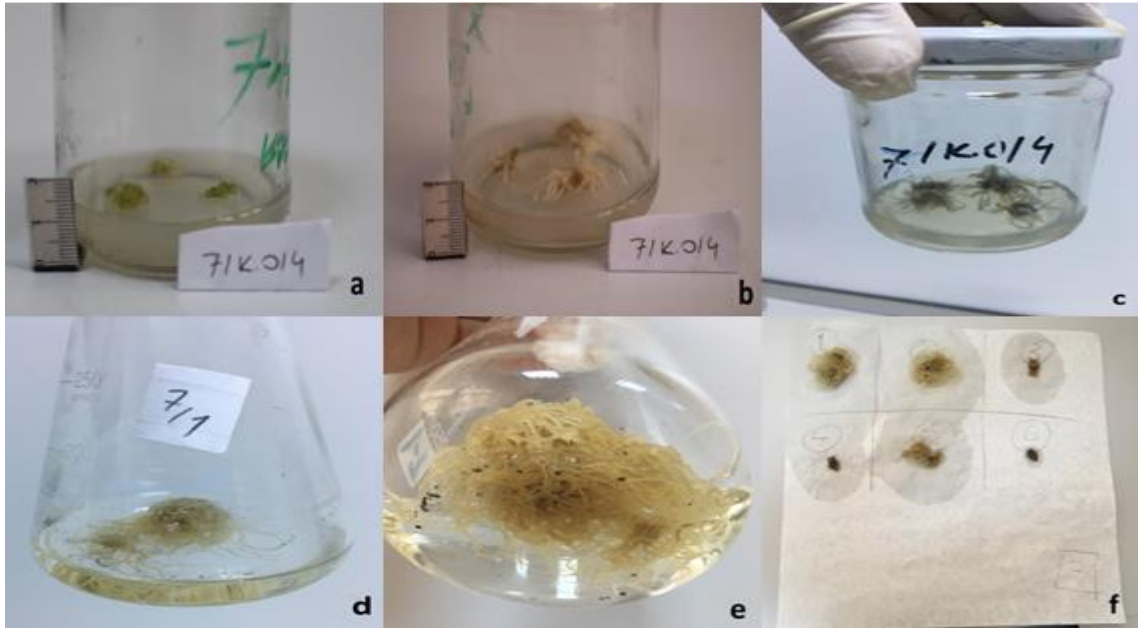
Şekil 4.14. 1 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren MS besi ortamlarında oluşan adventif kökler a) 15 günlük, b) 36 günlük, c) 71 günlük, d) 111 günlük, e) 136 günlük, f)Kurutulan kökler.



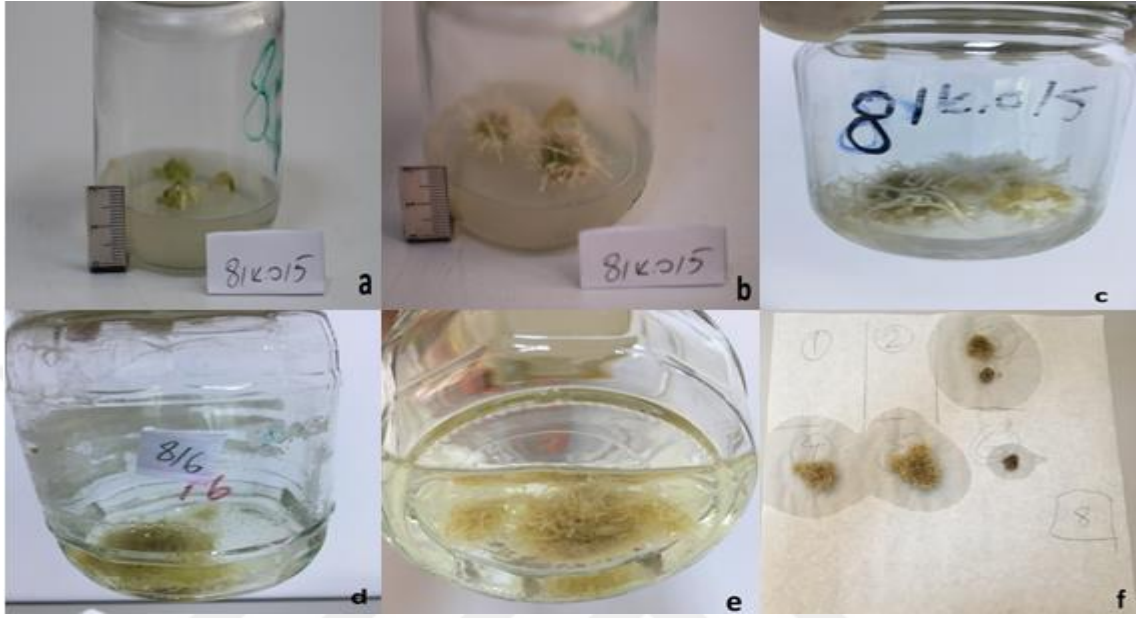
Şekil 4.15. 2 mg/L NAA içeren MS besi ortamlarında oluşan adventif kökler a) 15 günlük, b) 36 günlük, c) 71 günlük, d) 111 günlük, e) 136 günlük, f)Kurutulan kökler.



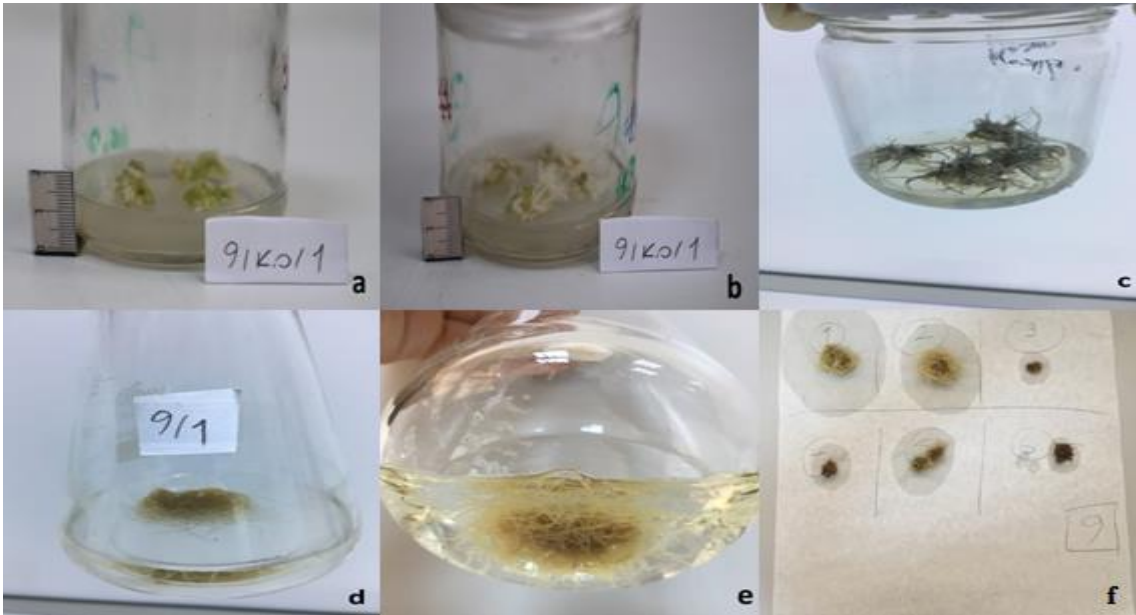
Şekil 4.16. 2 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP içeren MS besi ortamlarında oluşan adventif kökler a) 15 günlük, b) 36 günlük, c) 71 günlük, d) 111 günlük, e) 136 günlük, f)Kurutulan kökler.



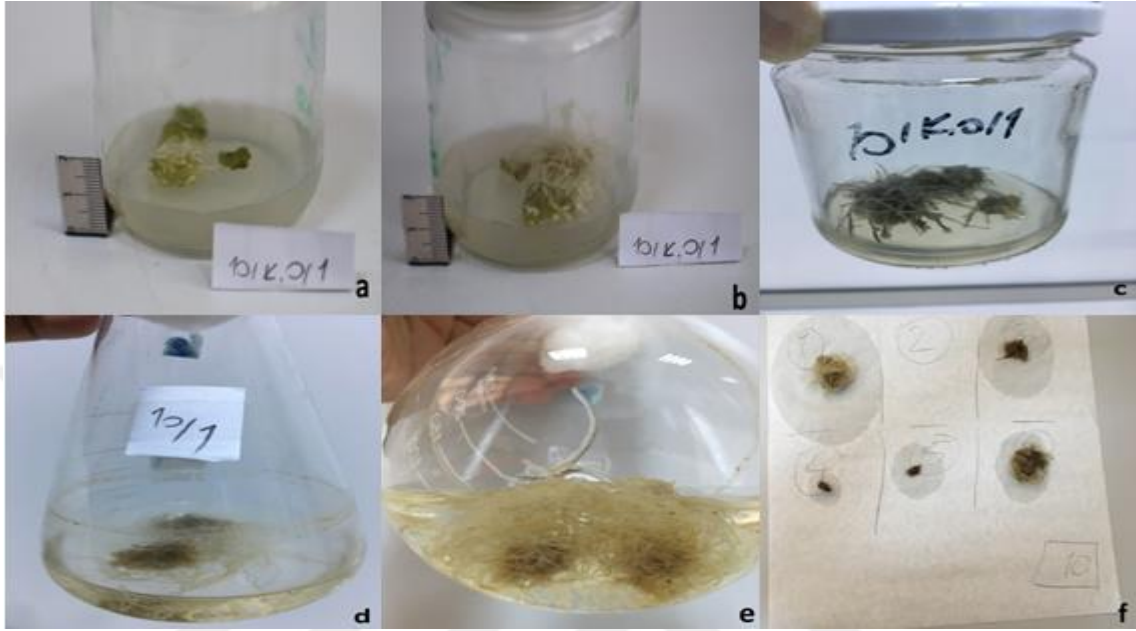
Şekil 4.17. 2 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren MS besi ortamlarında oluşan adventif kökler a) 15 günlük, b) 36 günlük, c) 71 günlük, d) 111 günlük, e) 136 günlük, f)Kurutulan kökler.



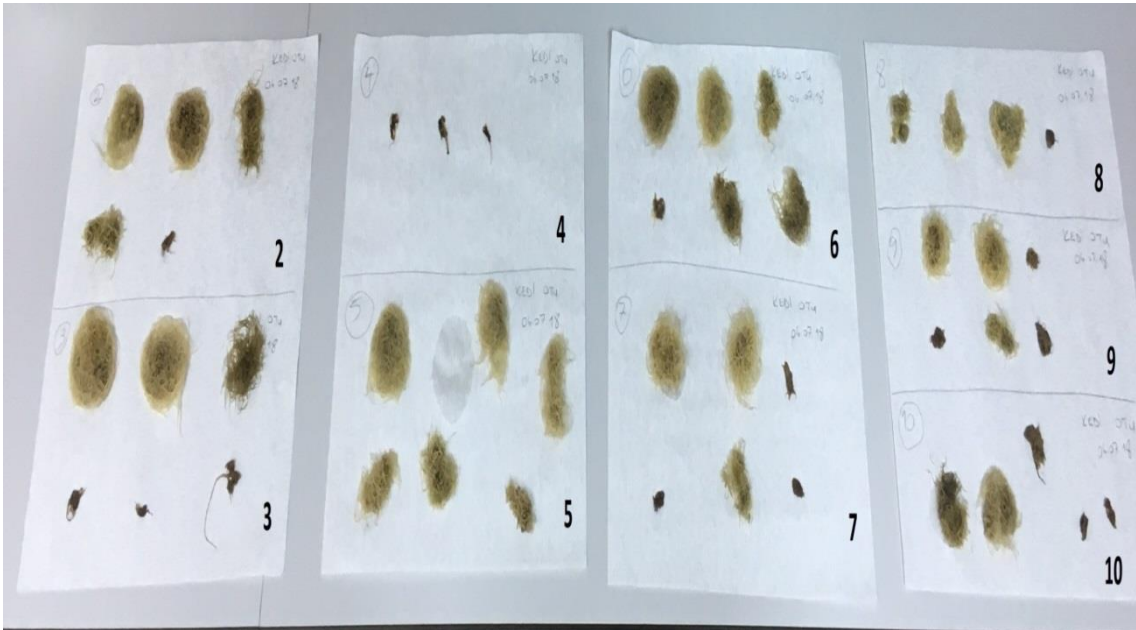
Şekil 4.18. 3 mg/L NAA içeren MS besi ortamlarında oluşan adventif kökler a) 15 günlük, b) 36 günlük, c) 71 günlük, d) 111 günlük, e) 136 günlük, f) Kurutulan kökler.



Şekil 4.19. 3 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP içeren MS besi ortamlarında oluşan adventif kökler a) 15 günlük, b) 36 günlük, c) 71 günlük, d) 111 günlük, e) 136 günlük, f) Kurutulan kökler.



Şekil 4.20. 3 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren MS besi ortamlarında oluşan adventif kökler a) 15 günlük, b) 36 günlük, c) 71 günlük, d) 111 günlük, e) 136 günlük, f) Kurutulan kökler.



Şekil 4.21. Deney gruplarından elde edilen köklerinin bir arada görüntüsü.

İn vitro ortamda çimlendirilmiş ve herhangi bir büyüme düzenleyici eklenmemiş MS besin ortamında yaklaşık 3 ay inkübe edilerek büyümüş olan *V. officinalis* bitkiciği de antimikrobiyal aktivite çalışması için kurutulmuş ve saklanmıştır.



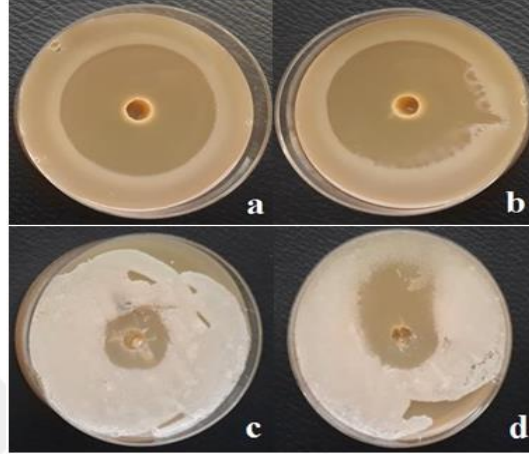
Şekil 4.22. Büyüme düzenleyici eklenmemiş MS besin ortamında yetişen 3 aylık *V. officinalis*.

Yapılan uygulamalar sonucunda elde edilen kökler hasat edilmiş 72 saat oda sıcaklığında, gölgede kurutulmuşlardır. Hassas terazi kullanılarak her bir deney grubu ayrı ayrı tartılmıştır (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.6. Antimikrobiyal aktivite analizi için kurutulan *V. officinalis* kök miktarları (gr).

Deney Grup No	Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)		Elde edilen kök miktarı (gr)
	NAA	BAP	
1	0	0	0.4570 g
2	1	0	2.148 g
3	1	0.5	2.147 g
4	1	1	0.0789 g
5	2	0	2.30 g
6	2	0.5	2.37 g
7	2	1	1.48 g
8	3	0	0.97 g
9	3	0.5	1.19 g
10	3	1	0.97 g

4.2.3. Elde edilen *V. officinalis* adentif köklerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları



Şekil 4.23. *V. officinalis* adentif köklerinin bakterilere karşı oluşturmuş oldukları zonlar a) 2 mg/L NAA+0,5 mg/L BAP, b) 2 mg/L NAA+1 mg/L BAP, c) 3 mg/L NAA, d) Kontrol.

Çizelge 4.7. *V. officinalis*'e ait antimikrobiyal aktivite zon çapları (mm).

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)			Zon Çapı (mm)				
DENEY GRUBU	NAA	BAP	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida krusei</i>
1	0	0	0	0	0	0	30
2	1	0	0	0	0	0	0
3	1	0.5	0	18	0	45	20
4	1	1	0	0	0	0	0
5	2	0	0	20	0	50	26
6	2	0.5	0	24	0	48	20
7	2	1	0	25	0	50	25
8	3	0	0	0	0	12	20
9	3	0.5	0	0	0	0	0
10	3	1	0	0	0	0	0

“0” olarak yazılanlar; tekrarlanan denemelerde istatistiksel olarak anlamsız sonuçlar alınan veya hiç zon çapı görülmeyen olarak değerlendirilmiştir.

4.3. *Taraxacum officinale* Bitkisi ile Yapılan Çalışma Bulguları

4.3.1. *T. officinale* bitki eksplantlarına bitki büyüme düzenleyicilerin etkileri

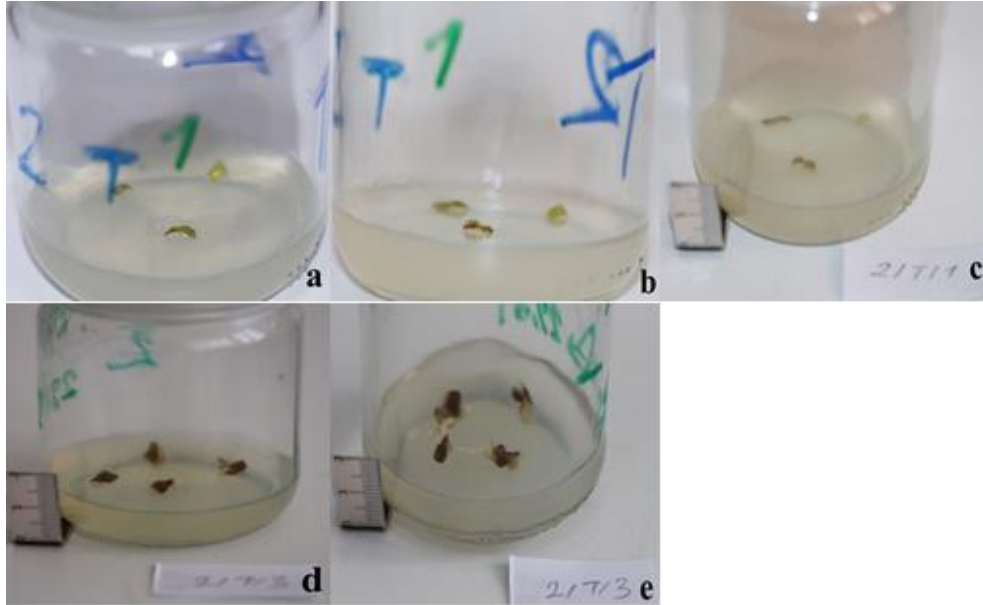
Mikroçoğaltım ile elde edilmiş olan *T. officinale* bitkiciklerinin yaprakları bistüri ucu yardımıyla 1 cm²' lik eksplantlar halinde kesilerek farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda BAP ve NAA içeren MS besin ortamlarında (Çizelge 3.7) inkübe edilmişlerdir. Eksplantlar 2 defa yarı katı kültüre alınmıştır. Kültür çalışmaları yaklaşık 12 hafta sürmüştür.

Yapılan gözlemler sonucunda kültür işlemlerinin 2. haftasından itibaren kallus oluşumları gözlenmiştir. Kültür işlemlerinin 22. gününde yapılan gözlemler sonucunda 1 mg/L NAA+0.5 mg/L BAP (Deney Grup No:2) içeren MS besin ortamı ile 1 mg/L NAA+1 mg/L BAP (Deney Grup No:4) içeren MS besin ortamlarında bulunan eksplantların tümünde kallus oluşumu gözlenmiştir. Kültür işlemlerinin 50. gününde yapılan gözlemlerde ise daha önceki ortamlara ek olarak 2 mg/L NAA+1 mg/L BAP (Deney Grup No:7) içeren MS besin ortamı, 3 mg/L NAA+0.5 mg/L BAP (Deney Grup No:9) içeren MS besin ortamı ve 3 mg/L NAA+1 mg/L BAP içeren (Deney Grup No:10) MS besin ortamlarındaki tüm eksplantlarda da kallus gözlenmiştir. Uygulamaların sonucunda en çok kallus oluşumu 3 mg/L NAA+0.5 mg/L BAP (Deney Grup No:9) içeren MS besin ortamında gerçekleşmiştir. 2 mg/L NAA+1 mg/L BAP (Deney Grup No:7) içeren MS besin ortamı ve 3 mg/L NAA + 1 mg/L BAP (Deney Grubu No:10) içeren MS besin ortamlarındaki kallus oluşumları da en çok kallus oluşturan deney gruplarından.

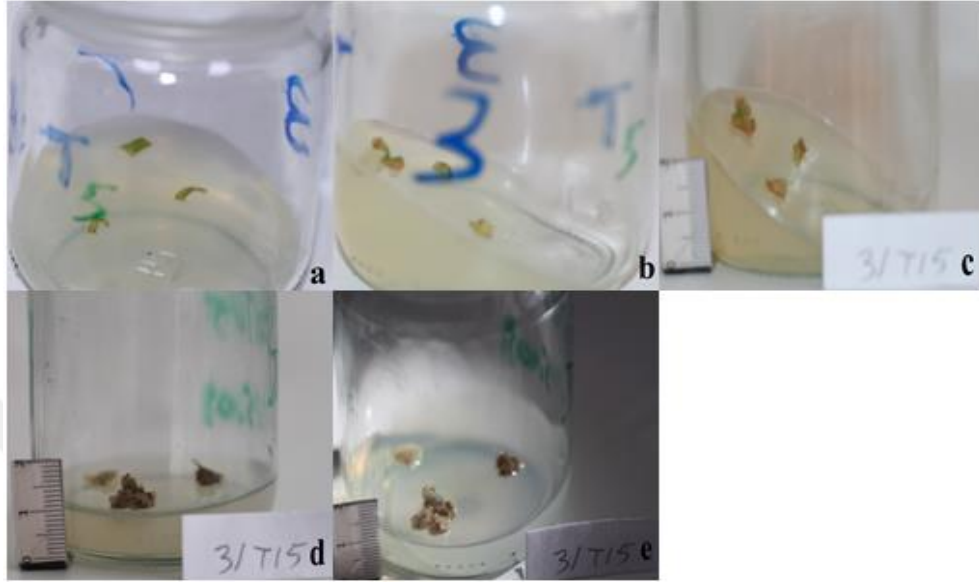
Kültür işlemlerinin 22. gününde yapılan gözlemler sonucunda ilk kök oluşumları 3 mg/L NAA içeren besin ortamında görülmüştür ve eksplantlarda %20 oranında kök oluşumu gözlenmiştir. Kültür işlemlerinin 2. ayında tüm deney gruplarında köklenmeler gözlenmiştir.

Çizelge 4.8. *T. officinale* 'e ait gözlem sonuçlarına göre belirlenen kök ve kallus yüzdeleri.

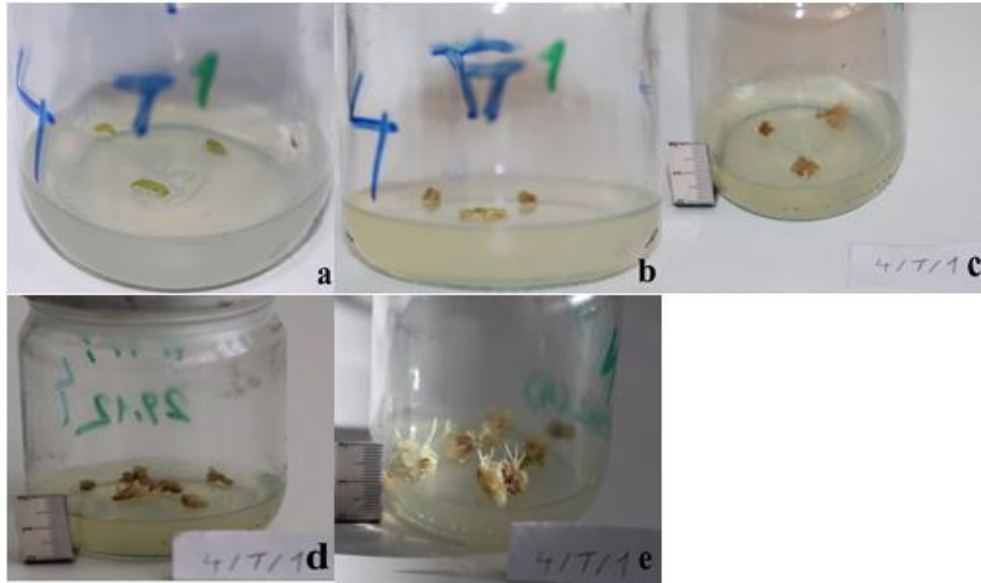
DENEY GRUBU	NAA	BAP	Eksplant sayısı			3. Hafta Gözlem % Kallus	3. Hafta Gözlem % Kök	7. Hafta Gözlem % Kallus	7. Hafta Gözlem % Kök	11. Hafta Gözlem % Kallus	11. Hafta Gözlem % Kök
			1.	2.	3.						
1	0	0	15	15	15	0	0	0	0	0	0
2	1	0	15	15	15	0	0	33	0	60	33
3	1	0.5	3	3	3	100	0	100	0	100	20
4	1	1	15	15	15	100	0	100	0	100	50
5	2	0	9	9	9	13.3	13.3	33.3	20	33.3	20
6	2	0.5	15	15	15	53.3	0	66.6	0	75	25
7	2	1	15	15	15	61.53	0	100	13.3	100	40
8	3	0	13	13	13	40	20	60	20	60	20
9	3	0.5	15	15	15	80	6.6	100	20	100	40
10	3	1	15	15	15	86.6	0	100	20	100	40



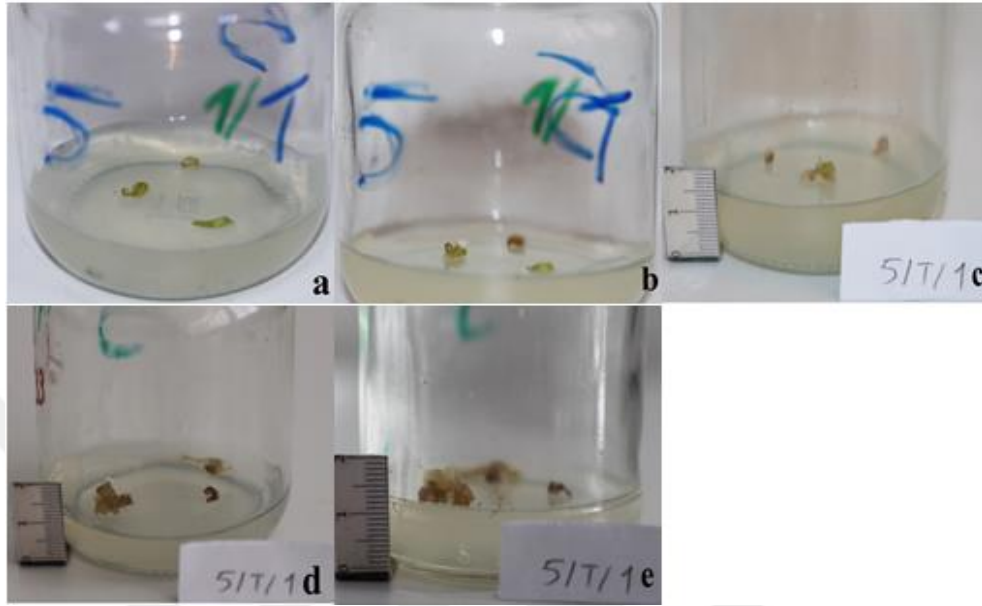
Şekil 4.24. 1 mg/L NAA içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 13 günlük, c) 22 günlük, d) 54 günlük, e) 70 günlük.



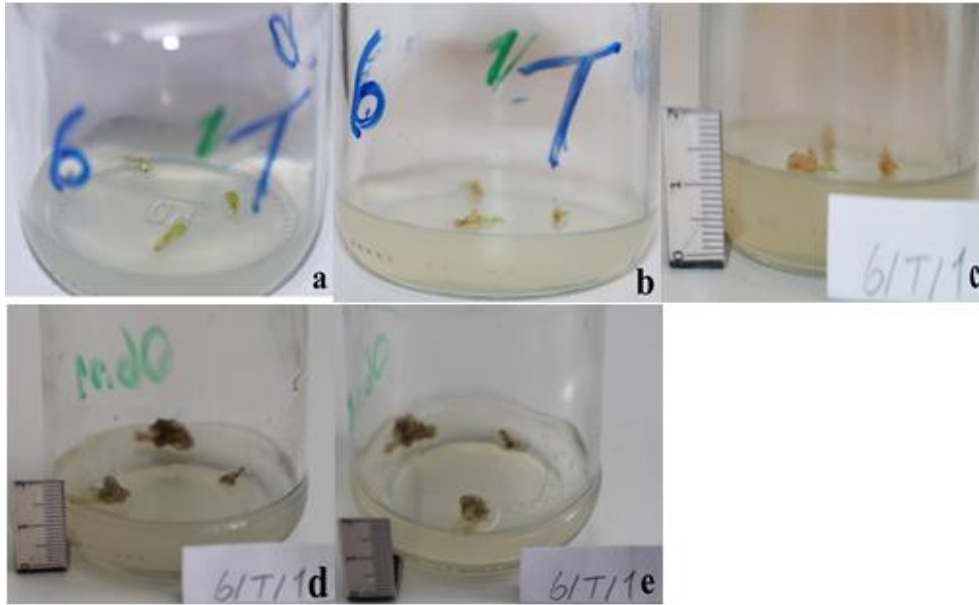
Şekil 4.25. 1 mg/L NAA+0.5 mg/L BAP içeren içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 13 günlük, c) 22 günlük, d) 54 günlük, e) 70 günlük.



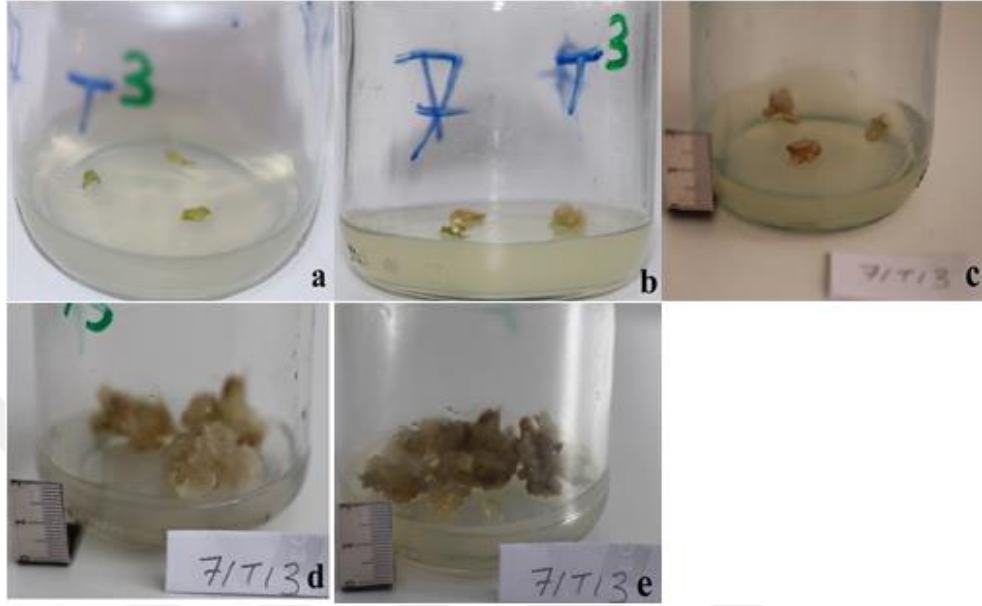
Şekil 4.26. 1 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, 1 günlük, b) 13 günlük, c) 22 günlük, d) 54 günlük, e) 70 günlük.



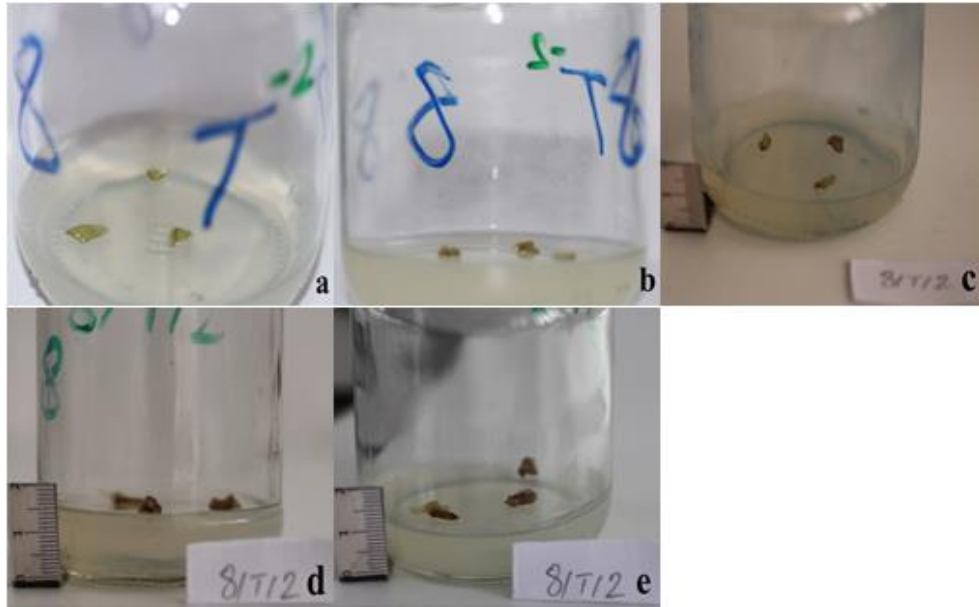
Şekil 4.27. 2 mg/L NAA içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 13 günlük, c) 22 günlük, d) 54 günlük, e) 70 günlük.



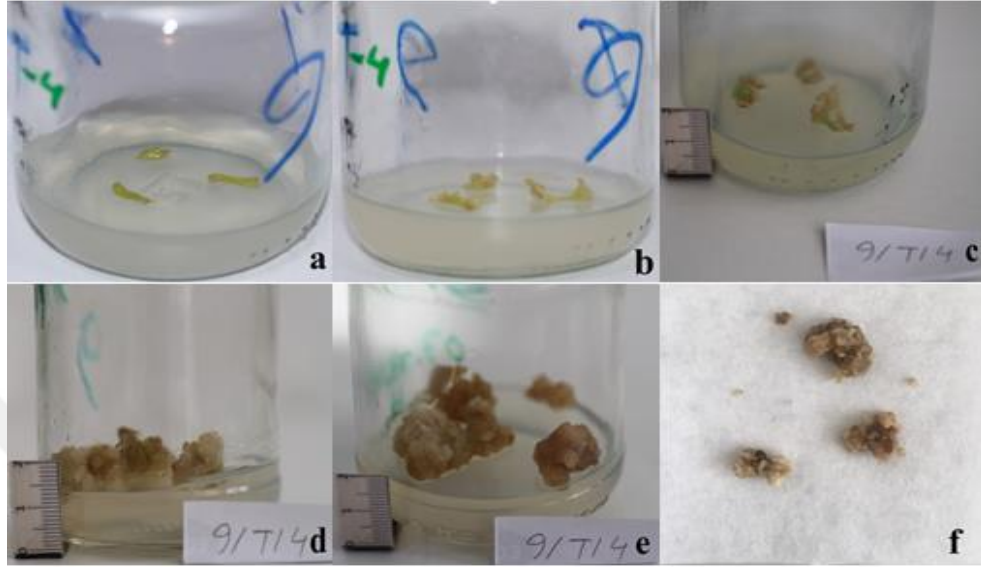
Şekil 4.28. 2 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 13 günlük, c) 22 günlük, d) 54 günlük, e) 70 günlük.



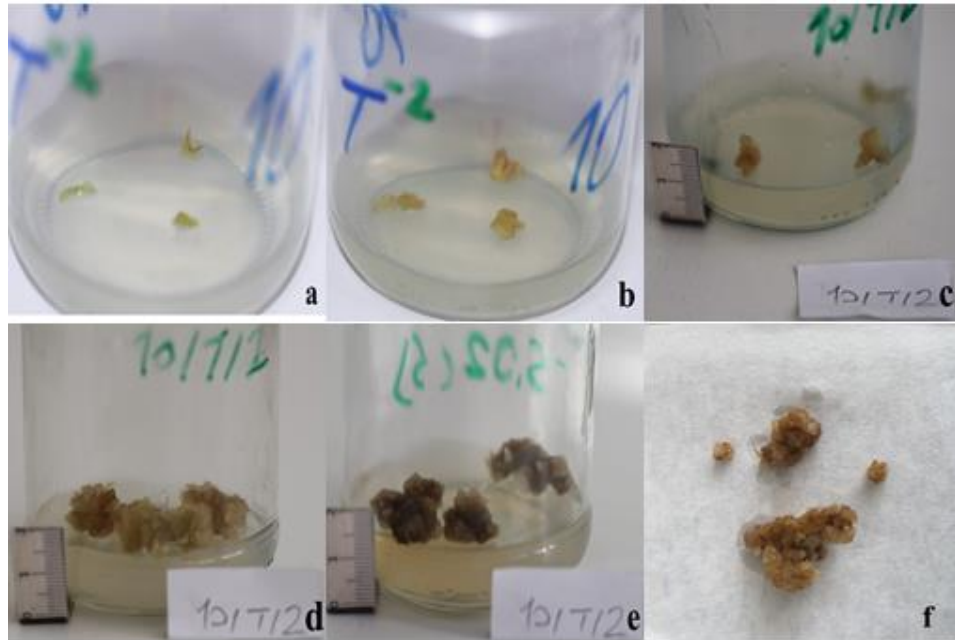
Şekil 4.29. 2 mg/L NAA + 1 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 13 günlük, c) 22 günlük, d) 54 günlük, e) 70 günlük.



Şekil 4.30. 3 mg/L NAA içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 13 günlük, c) 22 günlük, d) 54 günlük, e) 70 günlük.



Şekil 4.31. 3 mg/L NAA+0.5 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 13 günlük, c) 22 günlük, d) 54 günlük, e) 70 günlük, f) 70 günlük.

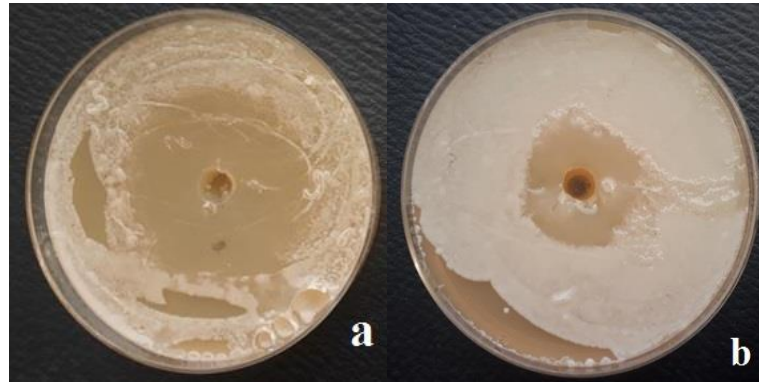


Şekil 4.32. 3 mg/L NAA+1 mg/L BAP içeren MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından oluşan kök ve kalluslar, a) 1 günlük, b) 13 günlük, c) 22 günlük, d) 54 günlük, e) 70 günlük, f) 70 günlük.



Şekil 4.33. Etüv içerisinde kurutulan kalluslar ve kurutulmuş kalluslar.

4.3.2. Elde edilen *T. officinale* kalluslarının antimikrobiyal aktivite sonuçları



Şekil 4.34. *T. officinale* kalluslarının bakterilere karşı oluşturmuş oldukları zonlar; a) 3 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP b) 3 mg/L NAA + 1 mg/L BAP.

Çizelge 4.9. *T. officinale*'e ait antimikrobiyal aktivite zon çapları (mm).

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)			Zon Çapı (mm)				
DENEY GRUBU	NAA	BAP	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida krusei</i>
2	1	0	0	0	0	0	0
3	1	0.5	0	0	0	0	0
4	1	1	0	0	0	0	0
5	2	0	0	0	0	0	0
6	2	0.5	0	0	0	0	0
7	2	1	15	0	0	0	40
8	3	0	0	0	0	0	0
9	3	0.5	16	0	0	0	42
10	3	1	12	0	0	0	28

“0” olarak yazılanlar; tekrarlanan denemelerde istatistiksel olarak anlamsız sonuçlar alınan veya hiç zon çapı görülmeyen olarak değerlendirilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tıbbi öneme sahip bitkiler dünya genelinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Kullanılan tıbbi bitkilerin bir kısmının antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu yapılan fitokimyasal analizlerle belirlenmiştir. Kimyasal ilaçların zararları ve antibiyotik dirençli bakteriler dolayısıyla bitkisel kaynaklı antimikrobiyallere son dönemlerde giderek artan bir ilgi vardır. Bitkiler birincil metabolitlerle birlikte biyoaktif özelliğe sahip "sekonder metabolitler" olarak adlandırılan maddeleri de sentezleyebilirler. Artan ilginin bitki türleri üzerinde olumsuz etkiler yaratmaması için sekonder metabolitlerin biyoteknolojik yöntemlerle üretilmesi hızlı, basit ve güvenilir bir yol olarak görülmektedir. Literatürde bitki doku kültürü yöntemleri kullanılarak sekonder metabolitlerin üretimi üzerine bir çok çalışma bulunmaktadır (Perez-Alonso vd., 2018; Sarkar vd., 2018; Shasmita vd., 2018; Grzegorzcyk-Karolak vd., 2017; Bayraktar vd., 2016).

Çalışmalarda *P. vulgaris*, *V. officinalis*, *T. officinale* yaprak eksplantlarına farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda yalnızca BAP ve BAP ile NAA kombinasyonundan oluşan 9 uygulama ve kontrol için herhangi bir büyüme düzenleyicisi içermeyen 10 MS besin ortamı kullanılmış, elde edilen rejeneratların antimikrobiyal etkinlikleri belirlenmiştir.

Uygulamalarda yaprak eksplantlarının kullanılmasında; bu bitkiler ile yapılan daha önceki çalışmalar ve yaprak eksplantlarının başarılı sonuçlar verdiği birçok literatür yol gösterici olmuştur (Çetin ve Sönmez, 2017; Çetin vd., 2018; Sadık, 2014; Islam ve Alam, 2018; Enyew ve Feyissa, 2019). Yaprak eksplantları, *V. officinalis* de tohumlarının *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi sonucu elde edilen bitkiciklerden, *P. vulgaris* ve *T. officinale* bitkilerinde ise *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımı yapılan bitkilerden elde edilmiştir.

P. vulgaris bitkisinin 22 hafta süren kültür çalışmalarında yaprak eksplantları; 2 defa yarı katı kültüre ardından 2 defa sıvı kültüre alınarak toplamda 4 alt kültür çalışması yapılmıştır. Kök gelişimi yaprak eksplantlarının yaralı bölgelerinde, kallus gelişimi ise köklerin MS ortamına değdikleri yerlerde gözlenmiştir. Kalluslarla birlikte bu bölgelerde tekrar çok sayıda kök gelişimi olmuştur. Dördüncü haftada ilk kök oluşumları 3 mg/L NAA içeren besin ortamında %80, 1 mg/L NAA içeren besin ortamında %53.3 ve 2 mg/L NAA içeren besin ortamında %46.6 oranlarında belirlenmiştir. En iyi kök gelişimleri de 3 mg/L NAA içeren besin ortamında %80 oranında gözlemlenmiştir. Bununla birlikte 9. haftada yapılan gözlemde tüm uygulamalarda kök oluşumları

görülmüştür. Bitki doku kültürü uygulamalarında besin ortamına konulan oksin grubu bitki büyüme düzenleyicilerin kök oluşumları üzerinde olumlu etkisinin olduğunun bildirildiği birçok literatür bulunmaktadır (Yu, vd., 2017; Simão vd., 2016; Enders ve Strader, 2015).

V. officinalis tohumları 3 dakika etil alkol, 5 dakika çamaşır suyunda (%0.5 NaOCl içerir) bekletildikten sonra *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş, kontaminasyon problemi yaşanmadan 3.hafta içerisinde ilk çimlenme gözlemlenmiştir. Farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda BAP ve NAA içeren MS besin ortamlarında 2 defa yarı-katı, 1 defa sıvı alt kültüre alınarak 23 haftada tamamlanmıştır. Kök oluşumları ilk olarak 1mg/L NAA içeren MS besin ortamında 2.hafta sonunda, tüm deney gruplarında ise üçüncü hafta sonunda gözlemlenmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda en iyi kök gelişimlerinin 0.5mg/L BAP+1mg/L NAA içeren besin ortamında olduğu belirlenmiştir. Nikolova vd. (2017) *V. officinalis* köklerinin *in vitro* koşullardaki yapılarını ve biyosentetik kapasitelerini araştırdıkları çalışmada, tez sonuçlarına benzer olarak 0.5mg/L BAP+1mg/L NAA içeren besin ortamında kök oluşumları gözlediklerini bildirmişlerdir.

Kültür çalışmaları yaklaşık 12 hafta süren *T. officinale* bitkiciklerinin yaprak eksplantları 2 defa yarı katı kültüre alınmıştır. Üçüncü haftadan itibaren ekplantlarda hacimsel büyüme ve kesilen kısımlarında kallus oluşumları gözlemlenmiştir. İlk kök oluşumları 4. hafta içerisinde 3 mg/L NAA içeren besin ortamında, 8. haftada ise deney gruplarının tamamında gözlemlenmiştir. Ermayanti vd. (2011) *T. officinale* yaprak eksplantlarına uyguladıkları BAP+NAA kombinasyonu içeren tüm uygulamalarda tez sonuçlarına benzer şekilde kallus oluşumları gözlemişlerdir.

Prunella vulgaris, *Valeriana officinalis* ve *Taraxacum officinale* bitkilerinin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için bitkilere ait kurutulmuş adventif kök ve kalluslardan öncelikle ekstraktlar elde edilmiştir. Testlerde bakteri kültürü olarak *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Enterococcus faecalis*; *Escherichia coli* ve fungus kültürü olarak da *Candida krusei* kullanılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite testi sonuçlarına göre; *P. vulgaris* adventif kökleri ve kallusları *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* bakterileri; *V. officinalis* adventif kökleri *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* bakterileri ve *Candida krusei* fungusu; *T. officinale* kalluslarının ise *Staphylococcus aureus* bakterisi ve *Candida krusei* fungusu üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Yapılan test çalışmaları sonucunda bitki

büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonlarının antimikrobiyal aktivite üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir.

Prunella vulgaris 'in kallus-kök ekstraktının *E. coli* bakterisine karşı etkisinin belirlendiği sonuçlar Çetin ve Kalyoncu (2018) tarafından *in vitro* koşullarda yetişen *Prunella vulgaris* sürgünlerinin *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*, *B.subtilis*, *S. typhimurium*, *P.vulgaris*, *E. faecalis*, *E. cloacae*, *K.rhizophila* bakterilerine karşı etkili olduğunun bildirildiği çalışma ile uyumludur.

Düzgüner ve Erbil (2019) de çalışmalarında *V. officinalis* bitkisinden elde ettikleri ekstraktların tez sonuçlarına benzer olarak *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* bakterilerine karşı etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Farklı olarak *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı da etki gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır.

T. officinale antimikrobiyal aktivite çalışmaları sonucunda *S. aureus* bakterisi ve *Candida kruseii* fungusuna karşı bulunan etki, Sohail vd. (2014) çalışmalarındaki *T. officinale* bitkisinin yaprak ekstraktlarının *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*, karşı etkili olduğunu bildirdikleri araştırma sonuçları ile uyumludur.

Tez çalışması verileri ileride yapılabilecek sekonder metabolit ve antimikrobiyal çalışmalar için yol gösterici niteliktedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmed, J.H. ve Ezer, N. (2008). *Prunella* L. Türlerinin Kimyasal Bileşikleri ve Biyolojik Aktiviteleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 28 (1), 93-113.
- Babaoğlu M., Gürel, E. ve Özcan, S. (2001). *Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kültürü ve Uygulamaları*, S.Ü. Vakfı Yayınları, 374 s.
- Bayraktar, M., Naziri, E., Akgun, I. H., Karabey, F., İlhan, E., Akyol, B., Bedir, E. ve Gürel, A. (2016). Elicitor Induced Stevioside Production, In Vitro Shoot Growth and Biomass Accumulation in Micropropagated *Stevia Rebaudiana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 127(2), 289-300. DOI: 10.1007/S11240-016-1049-7
- Benli, M. ve Yiğit, N. (2005). Ülkemizde Yaygın Kullanımı Olan Kekik (*Thymus vulgaris*) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(8), 1-8.
- Campell, N. A. ve Reece, J.B. (2008). *Biyoloji (2. Baskı)*. Gündüz, E., Demirsoy, A. ve Türkan, İ. (Çeviri Editörleri), Ankara: Palme Yayıncılık, 808.
- Castillo P, Márquez J, Rubluo A, Hernández G ve Lara M. (2010). Plant regeneration from callus and suspension cultures of *Valeriana edulis* ssp. *procera* via simultaneous organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Science*, 151(2), 115-119. DOI:10.1016/s0168-9452(99)00203-4
- Çetin, B., Kalyoncu, F., ve Kurtuluş, B. (2017). Antibacterial activities of *Calendula officinalis* callus extract. *International Journal of Seconder Metabolite*, 4(3), 257-263. DOI:10.21448/ijsm.372108
- Çetin, B. ve Sönmez E. (2017). *Valeriana officinalis* L.'nin Farklı Eksplantlarına Uygulanan Bitki Büyüme Düzenleyicilerin İn Vitro Rejenerasyona Etkileri. Uluslararası Katılımlı 19. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).
- Çetin, B. ve Kalyoncu, F. (2018). Antibacterial Potential of Clonally Propagated *Prunella vulgaris* L. under in vitro Conditions. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 18(2), 1-4. DOI:10.9734/JAMPS/2018/43626
- Çetin, B., Kalyoncu, F. ve Özen, T.E. (2018). Antimicrobial Potential of *Taraxacum Officinale* F.H. Wigg Clonally Propagated via Organogenesis, *International Journal of Green and Herbal Chemistry*, 7(2), 224-230, DOI: 10.24214/IJGHC/HC/7/2/22429.
- Dias, M. I., Sousa, M. J., Alves, R. C. ve Ferreira, I. C. (2016). Exploring Plant Tissue Culture to Improve The Production of Phenolic Compounds: A review. *Industrial Crops and Products*, 82, 9-22. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.12.016
- Düzgüner, V. ve Erbil, N. (2019). Ardahan'da Yetişen Kediotunun (*Valeriana officinalis* L.) Antimikrobiyal Ve Antioksidan Potansiyelinin Belirlenmesi, *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 6(2): 271–275. DOI:10.30910/turkjans.557113

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Enders, T. A. ve Strader, L. C. (2015). Auxin Activity: Past, Present and Future. *American journal of botany*, 102(2), 180-196. DOI: 10.3732/ajb.1400285.
- Enyew, M. ve Feyissa, T. (2019). *In Vitro* Shoot Regeneration From Leaf Explants Of *Echinops Kebericho*: An Endangered Endemic Medicinal Plant. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153(2), 199-204.
- Erkoyuncu, M. T. ve Yorgancılar, M. (2016). Bitki Doku Kültürü Yöntemleri İle Sekonder Metabolitlerin Üretimi. *Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi*, 2(1), 66-76.
- Ermayanti, T.M. ve Martin, A. F. (2011). *In Vitro* Growth Response Of *Taraxacum Officinale* Weber Ex F.H. Wigg Regenerated From Different Type Of Explants. *Annales Bogorienses*, 15(1), 7-13. DOI:10.14203/ann.bogor.2011.v15.n1.7-13
- Faydaoğlu E. ve Sürücüoğlu M.S. (2013). Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Antimikrobiyal, Antioksidan Aktiviteleri ve Kullanım Olanakları. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6-2,233-265.
- Fazal, H., Abbasi, B. H., Ahmad ve N, Ali M. (2016). Elicitation of Medicinally Important Antioxidant Secondary Metabolites with Silver and Gold Nanoparticles in Callus Cultures of *Prunella vulgaris* L. *Appl Biochem Biotechnol*, 180(6), 1076-1092. DOI:10.1007/s12010-016-21531
- Fazal, H., Abbasi, B. H., Ahmad, N, Ali S.S., Akbar, F. ve Kanwal, F. (2016). Correlation of different spectral lights with biomass accumulation and production of antioxidant secondary metabolites in callus cultures of medicinally important *Prunella vulgaris* L., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 159, 1-7. DOI:10.1016/j.jphotobiol.2016.03.008
- Fazal, H., Abbasi, B. H. ve Ahmad, N. (2014). Optimization of Adventitious Root Culture for Production of Biomass and Secondary Metabolites in *Prunella vulgaris* L. *Appl Biochem Biotechnol*, 174, 2086–2095. DOI:10.1007/s12010-014-1190-x
- Furuno, T., Kamiyama, A., Akashi, T., Usui, M., Takahashi, T. ve Ayabe, S. (1993). Triterpenoid Constituents of Tissue Cultures and Regenerated Organs of *Taraxacum officinale*. *Plant Tissue Culture Letters*, 10(3), 275-280. DOI:10.5511/plantbiotechnology1984.10.275.
- Grzegorzczak-Karolak, I., Rytczak, P., Bielecki, S. ve Wysokińska, H. (2017). The Influence of Liquid Systems for Shoot Multiplication, Secondary Metabolite Production and Plant Regeneration of *Scutellaria Alpina*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(2), 479-486.
- Gürel, A., Hayta, Ş., Nartop, P., Bayraktar, M. ve Fedakar, S. (2013). Bitki Hücre, Doku ve Organ Kültürü Uygulamaları. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 48-49.
- Güven, A. ve Gürsul I. (2014). Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Sentezi, *Gıda/The Journal of Food*, 39 (5), 299-306. DOI: 10.15237/gida.GD13060

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

<https://www.tarimorman.gov.tr/>

<http://evyziva.sk/s-valeriana-sa-vyspime-do-ruzova/>

<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:455176-1>

<http://www.paundurlic.com/vlaski.recnik/celarec.php?id=2160>

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:156_Valeriana_officinalis_L.jpg

<https://lucillelucascallery.com/artworks/prunella-vulgaris-self-heal/>

<https://www.frozenseds.com/collections/medicinal-herb-seeds/products/dandelion-seeds-taraxacum-officinale>

<http://www.biologydiscussion.com/plants/plant-tissue-culture/study-notes-on-organogenesis-biotechnology/61330>

Islam A. T. M. R. ve Alam M. F. (2018). In Vitro Callus Induction and Indirect Organogenesis of *Mentha piperita* (L.) - An Aromatic Medicinal Plant, *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 49–60. DOI: 10.30574/gscbps.2018.4.3.0078.

Kocaçalışkan, İ. (2008). Bitki Kùltürleri (Organ, Doku Ve Hücre) Ders Kitabı, DPÜ Fen Edebiyat Fakùltesi, Kùtahya, 136s.

Komal, S., Kazmi, S. A. J., Khan, J. A. ve Gilani, M. M. (2018). Antimicrobial Activity of *Prunella Vulgaris* Extracts Against Multi-drug Resistant *Escherichia Coli* from Patients of Urinary Tract Infection. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 34(3), 616. DOI:10.12669/pjms.343.14982.

Kour, B., Azhar, M., Kaul, S. ve Dhar, K. (2014). In Vitro Regeneration and Mass Multiplication of *Prunella vulgaris* L. *National Academy Science Letters*, 37(1):81-86. DOI: 10.1007/s40009-013-0200-9.

Letchamo, W., Ward, W., Heard, B. ve Heard, D. (2004). Essential Oil of *Valeriana Officinalis* L. Cultivars and Their Antimicrobial Activity As Influenced by Harvesting Time Under Commercial Organic Cultivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3915-3919. DOI:10.1021/jf0353990

Mahboubi, M., Mahboubi, A. ve Kazempour, N. (2015). The Antimicrobial Activity of *Prunella Vulgaris* Extracts. *Herba Polonica*, 61(1), 31-38. DOI: 10.1515/hepo-2015-0008.

Mahesh, B. ve Satish, S. (2008). Antimicrobial Activity of Some Important Medicinal Plant Against Plant and Human Pathogens. *World Journal Of Agricultural Sciences*, 4(5), 839-843. DOI: 10.1556/EuJMI.3.2013.4.6.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Şengül, M., Yıldız, H., Güngör N., Çetin, B. ve Eser, Z., (2008). Ketirhindi (*Acacia catechu*) Bitkisinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi, Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum.

Muhammed, R.A., Hassawi, D.S. ve Ibraheem, N.K. (2018). *In Vitro* Micropropagation of Taraxacum Officinale Medicinal Plant By Direct And Indirect Organogenesis. *Plant Archives*, 18(2),2273-2284.

Neamati, A., Chaman, F., Hosseini, M. ve Boskabady, M. H. (2014). The Effects of *Valeriana Officinalis* L. Hydro-Alcoholic Extract on Depression Like Behavior In Ovalbumin Sensitized Rats. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 6(2), 97. DOI: 10.4103/0975-7406.129174

Nikolova, A., Chunchukova, M., Alipieva K. ve Stanilova M. (2017). Effect of Plant Growth Regulators on The Structure And Biosynthetic Capacity of *In Vitro* Roots of *Valeriana Officinalis* - (Valerianaceae). *Phytologia Balcanica*, 23(3): 391–398.

Noor, A., Bansal, V. S. ve Vijayalakshmi, M. A. (2013). Current Update On Anti-Diabetic Biomolecules From Key Traditional Indian Medicinal Plants. *Current Science*, 721-727.

Perez-Alonso, N., Martin, R., Capote, A., Perez, A., Hernandez-Diaz, E. K., Rojas, L., Jimenez, E., Quiala, E., Angenon, G., Garcia-Gonzales, R. ve Chong-Perez, B. (2018). Efficient Direct Shoot Organogenesis, Genetic Stability And Secondary Metabolite Production Of Micropropagated Digitalis Purpurea L. *Industrial Crops and Products*, 116, 259-266. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.02.067

Pstova, J., Kolar, M., Sousek, J., Svagera, Z., Vicar, J., ve Ulrichova, J. (2003). Biological Activities of *Prunella Vulgaris* Extract. *Phytotherapy Research*, 17(9), 1082-1087. DOI: 10.1002/ptr.1324.

Ramachandra, R. ve Ravishankar, G.A. (2002). Plant Cell Cultures: Chemical Factories of Secondary Metabolites. *Biotechnology Advances*, 2, 101-153. DOI:10.1016/S0734-9750(02)00007-1.

Rasool, R., Ganai, B.A., Akbar, S., Kamili, A.N. ve Masood, A. (2010). Phytochemical Screening of *Prunella vulgaris* L. An Important Medicinal Plant of Kashmir, Pakistan J Pharm Sci, 23, 399-402.

Rasool, R., Kamili, A.N., Ganai, B.A. ve Akbar, S. (2008). Effect of BAP and NAA on Shoot Regeneration in *Prunella Vulgaris*. *Journal of Natural Sciences and Mathematics, Qassim University*, 3,(1), 21-26.

Sadık, H. (2014). Yara Otu (*Prunella vulgaris* L.) Bitkisinde *In Vitro* Koşullarda Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Sürgün Ucu Kültürüne Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya, 47s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sahu, N., Singh, A., Kumar, B. ve Arya K. R. (2017). Effect of Plant Growth Regulators on *in vitro* Biosynthesis of Antioxidative Compounds in Callus Culture and Regenerated Plantlets Derived from *Taraxacum officinale*, *International Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 11(9), 89.

Sahu, N., Singh, A., Kumar, B. ve Arya K. R. (2018). Bioactive Polyphenols and Coumarins from Leaf Derived Callus and *In Vitro* Regenerated Plants of *Taraxacum officinale* Weber, *International Journal of Green and Herbal Chemistry*, 7(2), 166-179. DOI: 10.24214/IJGHC/HC/7/2/16679.

Sarkar, T., Mogili, T., Doss, S. G. ve Sivaprasad, V. (2018). Tissue Culture in Mulberry (*Morus* spp.) Intending Genetic Improvement, Micropropagation and Secondary Metabolite Production: A Review on Current Status and Future Prospects. *In Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants*, 467-487. Springer, Singapore.

Shasmita, Rai, M.K. ve Naik, S. K. (2018). Exploring Plant Tissue Culture in *Withania Somnifera* (L.) Dunal: *In Vitro* Propagation and Secondary Metabolite Production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(6), 836-850. DOI: 10.1080/07388551.2017.1416453.

Simão, M. J., Fonseca, E., Garcia, R., Mansur, E. ve Pacheco, G. (2016). Effects of Auxins and Different Culture Systems on The Adventitious Root Development of *Passiflora pohlii* Mast. and Their Ability to Produce Antioxidant Compounds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), 124(2), 419-430. DOI:10.1007/s11240-015-0904-2.

Sohail, Z., Iqbal, M. A., Aftab, A., Inayat, U. R., Salma, S., Bilal, A., Naveed A., Kalsoom, Q. ve Afsana, B. (2014). *In Vitro* Antibacterial Study of *Taraxacum Officinale* Leaves Extracts Against Different Bacterial Pathogenic Strains. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(2), 15-17.

Temel, M., Tınmaz, A.B., Öztürk, M. ve Gündüz, O. (2018). Dünyada ve Türkiye'de Tıbbi-Aromatik Bitkilerin Üretimi ve Ticareti. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, 21(Özel Sayı), 198-214. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.473036.

Tousi, S.E., Radjabian, T., Ebrahimzadeh, H. ve Niknam, V. (2010). Enhanced Production of Valerenic Acids and Valpotriates by *In Vitro* Cultures of *Valeriana officinalis* L. *International Journal of Plant Production*, 4(3), 1735-6814. DOI: 10.22069/IJPP.2012.697.

Turker, A.U., Yucesan, B. ve Gurel, E. (2010). Effect of Phytohormones on Micropropagation of Self-Heal (*Prunella vulgaris* L.). *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 15, 293-302. DOI: 10.1080/10496470903507809.

www.tubives.com

Yu, J., Liu, W., Liu, J., Qin, P. ve Xu, L. (2017). Auxin Control of Root Organogenesis From Callus in Tissue Culture. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1385. DOI: 10.3389/fpls.2017.01385.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zamini, A., Mokhtari, A., Tansaz, M. ve Zarei M. (2016). Callus Induction and Plant Regeneration of *Valeriana Officinalis* Are Affected by Different Leaf Explants and Various Concentrations of Plant Growth Regulators. *Biotechnologia*, 4(4), 261-269. DOI: 10.5114/bta.2016.64543.

Zayova, E., Vassilevska-Ivanova, R., Petrova, M. ve Nedev, T. (2010). Micropropagation of *Valeriana Officinalis* Through Tissue Culture. *Comptes Rendus de l Academie Bulgare Des Sciences*, 63(12), 1749-1756.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı: Halit Özkan İÇİGEN

Doğum tarihi ve yeri: 07.01.1989 Kütahya

e-mail: ozkan.icigen@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora		
Yüksek lisans	Biyoloji	-
Lisans	Biyoloji	2012
Lise	Anadolu Öğretmen Lisesi	2007

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012-2014	Kütahya Anadolu Hastanesi	Biyolog
2015-2015	Kamrusepa Samyoung	Mikrobiyoloji Analisti
2016-2017	Vilsan Veteriner İlaçları	Mikrobiyoloji Uzman Yardımcısı
2017 -2017	Türk İlaç ve Serum Sanayi A.Ş	Mikrobiyoloji Uzmanı
2018-2019	İdeal Akademi OSGB	C Sınıfı İş Güvenliği Uzmanı
2019 -	Albila Serum Biyolojik Ürünler	Kalite Kontrol Sorumlusu