

YARA OTU (*Prunella vulgaris* L.) BİTKİSİNDE *In Vitro* KOŞULLARDA BİTKİ BÜYÜME  
DÜZENLEYİCİLERİNİN SÜRGÜN UCU KÜLTÜRÜNE ETKİLERİ

Hakan SADIK

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Eylül-2014

YARA OTU (*Prunella vulgaris* L.) BİTKİSİNDE *In Vitro* KOŞULLARDA BİTKİ BÜYÜME  
DÜZENLEYİCİLERİNİN SÜRGÜN UCU KÜLTÜRÜNE ETKİLERİ

Hakan SADIK

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

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Burcu ÇETİN

Eylül - 2014

**KABUL VE ONAY SAYFASI**

Hakan SADIK'ın Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı "YARA OTU (*Prunella vulgaris* L.) BİTKİSİNDE In Vitro KOŞULLARDA BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN SÜRGÜN UCU KÜLTÜRÜNE ETKİLERİ" başlıklı bu çalışma, jürimizce Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

23 / 09 /2014

Üye: Yrd. Doç. Dr. Burcu ÇETİN ( Danışman)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Nüket A. BİNGÖL

Üye: Yrd. Doç. Dr. Meltem BAYRAKTAR

Fen Bilimleri Enstitüsünün Yönetim Kurulu'nun ..../2014 gün ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan GÖÇMEZ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# YARA OTU (*Prunella vulgaris* L.) BİTKİSİNDE *In Vitro* KOŞULLARDA BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN SÜRGÜN UCU KÜLTÜRÜNE ETKİLERİ

Hakan SADIK

Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisan Tezi, 2014

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Burcu ÇETİN

## ÖZET

*Prunella vulgaris* (yara otu) Lamiaceae familyasına ait yarı endemik, aromatik ve tıbbi bir bitkidir. Yara otu antiviral, antibakteriyel ve antioksidan özelliklere sahip sekonder metabolitler içerir. Bu nedenle ilaç, gıda ve kozmetik sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tez çalışmasında, *P. vulgaris in vitro* sürgün ucu kültürüne bitki büyüme düzenleyicilerin etkisi araştırılmıştır. Sürgün ucu eksplantları *in vitro* steril olarak çimlendirilmiş tohumlardan elde edilmiştir. Sürgün ucu kültürleri farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda sitokin (BAP, Kin) ve oksin (IAA, IBA, NAA) içeren Murashige ve Skoog (MS) besin ortamlarında kurulmuştur. Sürgün uzunluğu için en iyi sonuç 3 mg/l Kin ve 0,5 mg/l IBA içeren MS ortamında, en yüksek sayıda yaprak oluşumu 3 mg/l BAP / 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamında ve en geniş yaprak ayası ise 3 mg/l BAP / 1 mg/l IBA içeren MS besin ortamlarında elde edilmiştir. Elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için kullanılan 0,5 mg/l IBA, 1 mg/l IBA, 0,5 mg/l NAA veya 1 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarında kök oluşumları görülürken, ½ MS ortamında kök oluşumu meydana gelmemiştir. Köklenen sürgünler başarıyla toprağa aktarılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Doku kültürü, *P. vulgaris*, Tıbbi bitki, Sürgün ucu kültürü, Bitki büyüme düzenleyicileri.

## **THE EFFECTS OF PLANT GROWTH REGULATORS ON SHOOT TIP CULTURE OF SELF-HEAL PLANT (*Prunella vulgaris* L.) AT IN VITRO CONDITIONS**

Hakan SADIK

Department Of Biology, M. S. Thesis, 2014

Thesis Supervisor: Assist. Prof. Burcu ÇETİN

### **SUMMARY**

*Prunella vulgaris* L. (self-heal plant) is a semi-endemic, aromatic and medicinal herb, belonging to Lamiaceae family. The Self-heal herb contains secondary metabolites having antiviral, antibacterial and antioxidant properties. Therefore, it is widely used in medicine, food and cosmetic industries. In this thesis study, the effects of Plant Growth Regulators on *in vitro* shoot-tip culture of *P. vulgaris* were investigated. Shoot-tip explants are obtained from *in vitro* germinated sterile seeds. Shoot-tip cultures were established on Murashige and Skoog (MS) media containing different combinations and concentrations of cytokinins (BAP, Kin) and auxins (IAA, IBA, NAA). The best result for shoot length was observed in the MS media containing 3 mg/l Kin and 0,5 mg/l IBA, the highest amount of leaf formation was observed in MS medium containing 3 mg/l BAP / 0,5 mg/l NAA and the largest leaf lamina was observed in MS medium containing 3 mg/l BAP / 1 mg/l IBA. The shoots were rooted on MS media supplemented with 0,5 mg/l IBA, 1 mg/l IBA, 0,5 mg/l NAA or 1 mg/l NAA. Root formation was not observed in ½ MS media. The rooted plantlets were successfully transferred to soil.

**Keywords:** Tissue culture, *P. vulgaris*, Medicinal plant, Shoot-tip culture, Plant growth Regulators.

## TEŐEKKÖRLER

Tüm yaşamım boyunca maddi ve manevi yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Canım Aileme, üniversite yaşantımda tanıştığım ve her daim birlikte olacağım Sevgili Elif KURT' a, lisans ve yüksek lisans süresince ilgi ve bilgileriyle yanımda olan Danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Burcu ÇETİN ve Yrd. Doç. Dr. Sema LEBLEBİCİ' ye, tez çalışması sırasında gerekli tüm laboratuvar ekipmanlarının kullanımı ve istatistiksel programlarda yardımcı olan hocalarım Yrd. Doç. Dr. Nüket BİNGÖL ve Arş. Gör. Dr. Betül AKIN' a, laboratuvar çalışmalarında deneyimlerini bizden esirgemeyen değerli arkadaşım Yasin ŐENYÖZ' e, *P. vulgaris* tohumlarını temin eden Kütahya Belediyesi Hekim Sinan Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi çalışanlarından Uzman Biyolog Halil İ. TANRIKULU ve Tıbbi Bitkiler Sorumlusu Nazım TANRIKULU' na teőekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	iv
SUMMARY .....	v
TEŞEKKÜRLER .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1.GİRİŞ .....	1
1.1. Türkiye Florası Ve Endemizm .....	1
1.2. Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler.....	3
1.3. Bitki Doku Kültürü .....	5
1.4. <i>P. vulgaris</i> ' in Taksonomisi Ve Bitki Hakkında Genel Bilgiler.....	6
1.5. <i>P. vulgaris</i> İle İlgili Yapılan Çalışmalar .....	8
1.5.1. <i>P. vulgaris</i> ' le yapılan doku kültürü çalışması.....	8
1.5.2. <i>P. vulgaris</i> ' le yapılan diğer çalışmalar.....	8
2. MATERYAL VE METOD .....	11
2.1. Bitki Materyali .....	11
2.2. Kullanılan Kimyasallar Ve Cihazlar .....	11
2.3. Stok Solüsyonların Ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması .....	14
2.4. Çimlendirme İçin Gerekli MS Ortamının Hazırlanması .....	14
2.5. Sterilizasyon İşlemleri.....	14
2.5.1. Alet ve cihazların sterilizasyonu .....	14
2.5.2. Besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu .....	15
2.5.3. Tohumların sterilizasyonu.....	15
2.6. <i>In Vitro</i> Ortamda <i>P. vulgaris</i> Tohumlarının Çimlendirilmesi.....	15
2.7. <i>In Vitro</i> Ortamda Çimlendirilen Tohumlardan Sürgün Elde Edilmesi.....	16
2.8. <i>In Vitro</i> Ortamda Sürgünlerin Alt Kültüre Alınması .....	17
2.9. <i>In Vitro</i> Ortamda Elde Edilen Sürgünlerin Kök Ortamına Alınması .....	17

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.10. Bitkilerin Toprağa Alınması Ve Dış Ortama Adaptasyonu .....	18
3. SONUÇLAR .....	19
3.1. Tohum Çimlendirme Sonuçları.....	19
3.2. <i>In Vitro</i> Koşullarda Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Sürgün Ucu Kültürü Yöntemi ile <i>P. vulgaris</i> ' in Mikroçoğaltımı Üzerine Etkileri.....	19
3.3. <i>In Vitro</i> Ortamda Elde Edilen Bitkicikleri Köklendirme Sonuçları .....	26
4. TARTIŞMA .....	30
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	33

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>P. vulgaris</i> L.....	6
1.2. Taksonun ülkemizdeki dağılımı.....	7
2.1. <i>P. vulgaris</i> tohumları.....	11
2.2. a. <i>P. vulgaris</i> tohumlarının sterilizasyonu b. Sterilizasyon sonrası <i>P. vulgaris</i> tohumları c. <i>P. vulgaris</i> tohumlarının besin ortamına aktarımı .....	16
3.1. MS besin ortamında çimlenen <i>P. vulgaris</i> tohumları.....	19
3.2. Farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda ikinci hafta sonunda gelişen sürgünler (a) 3 mg/l Kin-0,5 mg/l IBA içeren MS ortamı (b) 3 mg/l BAP-0,5 mg/l IBA içeren MS ortamı (c) 3 mg/l BAP - 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamı.....	20
3.3 Farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda dördüncü hafta sonunda gelişen sürgünler (a) 3 mg/l Kin-0,5 mg/l IBA içeren MS ortamı (b) 3 mg/l BAP -0,5 mg/l IBA içeren MS ortamı (c) 3 mg/l BAP-0,5 mg/l NAA içeren MS ortamı .....	20
3.4. Hormon ortamlarının sürgün uzunluklarına etkisi. ....	21
3.5. <i>P. vulgaris</i> yaprak ayasının üstten görünüşü.....	23
3.6. Bitki büyüme düzenleyicilerinin yaprak sayısı üzerine etkisi.....	23
3.7. Bitki büyüme düzenleyicilerinin yaprak ayasının genişliğine etkisi.....	25
3.8. Kök ortamına aktarılan <i>P. vulgaris</i> sürgünleri (a)1 mg/l IBA içeren MS ortamı (b) 1 mg/l NAA içeren MS ortamı .....	26
3.9. NAA hormonu içeren MS besin ortamlarındaki kök oluşumları (a) 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamı (b) 1 mg/l NAA içeren MS ortamı .....	26
3.10. IBA hormonu içeren MS besin ortamlarındaki kök oluşumları (a) 0,5 mg/l IBA içeren MS ortamı (b) 1 mg/l IBA içeren MS ortamı.....	27
3.11. <i>P. vulgaris</i> ' te adventif kök oluşumu .....	28
3.12. Dış ortama adapte olan <i>P. vulgaris</i> ' te kök gelişimi (a) MS besin ortamından arındırılmış bitkicikler (b) Toprağa aktarılmış bitkicikler (c) Toprağa alınmış bitkide köklenme.....	28
3.13. Dış ortama adaptasyonu sağlanmış <i>P. vulgaris</i> .....	29

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u><b>Çizelge</b></u>	<u><b>Sayfa</b></u>
1.1. Türkiye florasındaki bazı önemli familyaların takson sayısı ve endemiklik durumu. ....	2
1.2. Türkiye’de doğal olarak yetişen Lamiaceae familyasına ait bazı cinslerin endemikliği.....	2
1.3. Ülkemizde bulunan bazı tıbbi aromatik bitkiler .....	4
1.4. <i>P. vulgaris</i> ’in taksonomik hiyerarşisi .....	7
2.1. MS besin ortamının içerdiği maddeler ve miktarları.....	12
2.2. Kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri.....	13
2.3. Araştırmada kullanılan alet ve cihazlar.....	13
2.4. Kullanılan sürgün ortamlarının içeriği .....	17
2.5. Kök ortamlarının içeriği.....	18
3.1. Hormon uygulamalarının istatistiksel değerlendirilmesi .....	21
3.2. Sürgün uzunluklarına etki eden hormonların Tukey-HSD sonuçları (Q=3,52; p<0,05).....	22
3.3. Yaprak sayısına etki eden hormonların Tukey-HSD sonuçları (Q=3,52; p<0,05).....	24
3.4. Yaprak ayası genişliğine etki eden hormonların Tukey-HSD sonuçları (Q=3,52; p<0,05). 25	25
3.5. Bitki büyüme düzenleyicilerinin kök oluşumuna etkisi.....	27

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
2,4-D	2,4 Diklorofenoksi Asetik Asit
atm	Atmosfer
cm	Santimetre
dk	Dakika
BA	Benzil adenin
BAP	6-Benzil amino pürin
HCl	Hidrojen Klorür
HSV	Herpes simplex virüs
IAA	Indol-3-Asetik Asit
IBA	Indol-3-Butirik Asit
K <sub>1</sub> n	6-Furfuril Amino Pürin
KNO <sub>3</sub>	Potasyum Nitrat
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MS	Murashige ve Skoog Besin ortamı
NAA	Naftalen Asetik Asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
pH	Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
UV	Ultraviyole

## 1.GİRİŞ

### 1.1. Türkiye Florası Ve Endemizm

Türkiye, üç fitocoğrafi bölgenin (İran-Turan, Akdeniz ve Avrupa-Sibirya) kesişim noktasında yer alan, Anadolu'nun en eski yerleşim merkezlerinden olup, "Flora of Turkey and The East Aegean Islands" göre, 174 familyaya ait 1251 cins ve 12.000'den fazla tür, alt tür ve varyete ile oldukça zengin bir floraya sahiptir (Özçelik ve Yıldırım, 2011; Davis, 1985; Güner vd., 2000).

Birçok bitki taksonu tıbbi, aromatik, ilaç ham maddesi, boya, çiçekçilik vs. ekonomik amaçlarla kullanılmaktadır (Özçelik ve Yıldırım, 2011). Son yıllarda bazı tarımsal faaliyetler, şehirleşme, endüstrileşme, kirlilik, iklim değişikliği, istilacı yabancı türler, yol ve baraj yapımları, doğadan aşırı bitki toplama ve sökümü, aşırı orman kesimi ve orman yangınları ile turizm sektöründeki hızlı gelişmeler nedeniyle bir çok bitki türü yok olma tehlikesi ile karşı karşıyadır (Şehirali vd., 2005). Dünya üzerindeki tüm bitki türlerinin 1/3'üne karşılık gelen yaklaşık 100.000 bitki türünün doğada çoktan kaybolduğu veya kaybolma tehlikesi taşıdığı tahmin edilmektedir (Tan, 1996).

Endemik, Yunanca endomos (indigenous) kelimesinden gelen, sınırları belirli, dar bir alanda yayılış gösteren, o bölgeye özgü bitki ve hayvan türlerine verilen addır, bu olay ise "endemizm" olarak adlandırılır (Avcı, 2005; Kaya ve Aksakal, 2005). Türkiye, Avrupa ve Asya kıtaları arasında köprü görevi gören benzersiz yerleşimi ve ekolojik faktörlerin çok kısa mesafelerde bile oldukça büyük farklılıklar gösterebildiği topografik ve iklim özelliklerine sahiptir. Bu özelliklere bağlı olarak pek çok cins ve sekiyonun orijin ve farklılaşım merkezinin Anadolu' da oluşu, ekolojik ve fitocoğrafik farklılaşmanın sonucu olarak tür endemizminin yüksek olmasını sağlamıştır (Tan, 1996; Dağcı vd., 2002). Ülkemiz dışındaki tüm Avrupa ülkelerindeki toplam endemik takson sayısı yaklaşık 2750 iken ülkemizdeki endemik tür sayısı 2891'dir. Bu sayıya endemik olan 497 alt türü ve 390 varyeteyi dâhil ettiğimizde toplam endemik takson sayısı 3750'den fazladır (Güner vd., 2000).

**Çizelge 1.1.** Türkiye florasındaki bazı önemli familyaların takson sayısı ve endemiklik durumu (Seçmen, 1996).

Familya	Cins	Endemik cins sayısı	Doğal tür	Endemik tür	Endemiklik yüzdesi
Asteraceae	126	40	1132	430	38
Fabaceae	60	28	958	375	39,1
Scrophulariaceae	30	8	463	241	52,1
<b>Lamiaceae</b>	<b>43</b>	<b>19</b>	<b>543</b>	<b>240</b>	<b>44,3</b>
Brassicaceae	85	27	509	194	38,1
Caryophyllaceae	32	15	465	187	40,2
Liliaceae	31	14	388	118	30,4
Apiaceae	96	36	416	117	28,1
Boraginaceae	32	14	301	108	35
Rubiaceae	9	5	169	74	43,8
Campanulaceae	6	5	133	66	49,6
Rosaceae	31	9	245	46	18,8
Ranunculaceae	17	5	196	43	21,9
Iridaceae	6	3	84	36	42,9
Dipsacaceae	7	5	86	31	26
Guttiferae	1	1	77	30	39
Crassulaceae	6	4	75	25	33,5
Illecebraceae	5	2	42	23	54,8
Plumbaginaceae	6	4	51	21	41,2

**Çizelge 1.2.** Türkiye’de doğal olarak yetişen Lamiaceae familyasına ait bazı cinslerin endemikliği (Dönmez, 2001).

Cins	Tür Sayısı	Endemik Tür Sayısı	Endemiklik Oranı %	Alt Tür Varyete Sayısı	Hibrit Sayısı	Toplam Takson
<i>Salvia</i>	94	45	47,8	8	1	99
<i>Stachys</i>	82	37	45,1	45	2	109
<i>Sideritis</i>	45	36	80	14	0	56
<i>Thymus</i>	41	17	41,4	10	0	45
<i>Phlomis</i>	34	20	58,8	9	11	51
<i>Nepeta</i>	34	14	41,1	11	0	40
<i>Lamium</i>	30	15	50	23	0	46
<i>Teucrium</i>	32	10	32	20	0	45
<i>Origanum</i>	22	13	46,1	5	5	30
<i>Marrubium</i>	19	9	72,7	8	1	24
<i>Scutellaria</i>	16	3	44,4	26	0	39
<b><i>Prunella</i></b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>

## **1.2. Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler**

Günümüzde “tıbbi” ve “aromatik” bitkiler terimi genellikle birlikte kullanılmaktadır. Tıbbi bitkiler hastalıkları önlemek, sağlıklı olarak hayatı sürdürmek veya hastalıkları iyileştirmek için ilaç olarak kullanılan bitkilerdir. Aromatik bitkiler ise, daha çok beslenme, kozmetik, güzel koku ve tat vermeleri için kullanılmaktadır. Tüm aromatik bitkiler tıbbi amaçlar için kullanılırken, tüm tıbbi bitkiler ise aromatik amaçlı olarak kullanılamaz. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre yaklaşık 20.000 bitki alternatif tedavilerde kullanılmaktadır. Ülkemiz coğrafi konumu, iklim ve bitki çeşitliliği, tarımsal potansiyeli, geniş yüzölçümü sayesinde tıbbi amaçla tüketilen bir çok bitki türünü bulundurması sayesinde Dünya’ da tıbbi ve aromatik bitkiler ticaretinde önde gelen ülkelerden biridir (Bayram vd., 2010).

**Çizelge 1.3.** Ülkemizde bulunan bazı tıbbi ve aromatik bitkiler (<http://www.titck.gov.tr>).

Bitki Adı	Yaygın İsmi
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Biberiye, Kuşdili, Beyaz Püren (Adana), Hasaban, Lacivert Gül
<i>Vitex agnus-castus</i>	Hayıt, Hayıd, Acı Ayıt, Ayıt, Beşparmak Otu, Namus Ağacı, Keşiş Biberi
<i>Lavandula</i> spp.	Lavanta, Karabaş Otu, Keşiş Otu, Gargan (Muğla), Yalancı Lavanta Çiçeği
<i>Melissa officinalis</i>	Oğul Otu, Kovan Otu, Limon Nanesi), Limon Otu, Melisa Otu, Tatrambe, Temre Otu
<i>Crataegus monogyna-Crataegus oxocantha</i>	Aluç, Alış, Aloş, Beyaz Diken, Edran, Eksi Muşmula, Eloç, Geviş, Geyik Dikeni–Halıç, Haluç, Kızlar Yemişi– Yemişen
<i>Echinacea</i> spp.	Ekinezya, Mor Koni Çiçeği, Koni Çiçeği, Amerikan Koni Çiçeği, Kirpibaşı, Erguvani Kirpibaşı, Kirpiotu
<i>Borago officinalis</i>	Hodan Otu, Sığır Dili, Zembil Çiçeği, Hıyar Otu, Neşe Otu, Turşu Otu
<i>Momordica charantia</i>	Kudret Narı, Papara, Acayip Elma, Balsam Elması, Balsam Armudu, Acı Kavun, Acı Kabak, Afrika Hıyarı
<i>Urtica</i> sp.	Acı Isırgan Otu, Agdalak, Cimcar, Cızlağan, Cızlak, Cincar, Daladiken, Dalağan, Dalgan, Dancakotu, Dızlağan, Dolayan Diken, Gezgez, Geznik, Gidişken Otu, Sırgan Otu
<i>Salvia</i> spp.	Adaçayı , Dişotu ve Meryemiye, Çalba, Şalba, Tülüce
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Fesleğen, Fesliyen, Peslan, Reyhanotu, İrihan
<i>Thymus</i> spp.	Kekik, Zahter, Anzer Çayı, Sater, Keklik Otu
<i>Mentha</i> spp.	Nane
<i>Sideritis</i> spp.	Acem Arpası, Altınbaş, Boz Kekik, Bozlan Çayı, Düğümlü Çay, Eldiven Çayı, Eşek Çayı, Kandil Çayı, Kazdağı Çayı, Kedi Kuyruğu Çayı, Sarıkız Çayı, Sivri Çay, Tosbağa Çayı,
<i>Laurus nobilis</i>	Defne, Dulaptal Otu, Develik, Havaza, Kirkat, Mezeryon, Göğçe, Gökçe, Yaygıç, Yazkış Gökçek, Kurtbağı, Sırımbağı, Tavuk Çiçeği
<i>Tilia platyphyllos</i>	İhlamur, Fambur, Felenbur, Filanbur, İlamur, İllamur, Sügnük, Sügüllük, Sügünük, Süngülük, Süülük, Süynük
<b><i>P. vulgaris</i></b>	<b>Yara Otu</b>
<i>Myrtus communis</i> L.	Mersin, Murt, Hambeles, Adi Mersin, Asmar, Sıçankulağı Otu, Bahar Ağacı
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Papatya, Adi Papatya, Babunç, Tıbbi Papatya, Kelkız, Akbaba, Akbulaç
<i>Crocus sativus</i> L.	Safran, Zaferan
<i>Zingiber officinale</i>	Zencefil, Zencebil
<i>Aloe vera</i>	Sarısabır, Ağu, Sabırlık

### 1.3. Bitki Doku Kültürü

Gerek ülke içinde ve gerekse dünyada tıbbi ve kokulu bitkilere karşı talebin artması; buna karşılık bu talebin yıllardır doğadan toplanarak karşılanmaya çalışılması bazı türlerin kaybolma sınırına gelmesine neden olmuş ve kültüre alınmaları zorunlu hale gelmiştir. Bu nedenle Türkiye’de doğal olarak yetişen tıbbi ve aromatik bitkilerin belirlenmesine, doğada bulunan ve kaybolma sınırına gelen türlerin korunmasına, ekonomik önemi olanların da kültüre alınmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Kızıllı ve Ertekin, 2003).

Bitkilerin, kendi ekosistemleri dışında büyümeleri zordur. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyete oluşturmak, kaybolmakta olan türlerin korunmasını sağlamak, hastalıklardan arındırılmış bitkisel materyal elde etmek, çoğalması zor olan ve nesli tükenmekte olan türleri üretmek amacıyla, bitkilerin doku kültürü yoluyla çoğaltılması yoluna gidilmiştir (Bourgand vd., 2001).

Bitki doku kültürü yöntemleri ile aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, hücre, doku veya organ gibi çeşitli bitki kısımlarından, kontrollü sıcaklık ve ışık şartlarında yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin eldesi amaçlanmaktadır (Thorpe, 2007).

Türkiye’de biyoteknoloji çalışmaları 1970’li yılların ikinci yarısında başlamış ve ilk yıllarda ağırlıklı olarak doku kültürü çalışmalarına yer verilmiştir. Bu çalışmalar son yıllarda, moleküler biyoloji ve moleküler genetik teknikleri ile bütünleşmeye başlamıştır (Babaoğlu vd., 2001; Ellialtıoğlu vd 2001).

Bitki doku kültürü ile yapılmış çalışmalar aşağıdaki gibi sıralanmıştır:

1. Türler arası melezlemelerden sonra embriyo kültürü
2. Haploid bitki üretiminde anter (polen) ve yumurtalık (ovül) kültürü
3. Somaklonal varyasyon
4. *In vitro* seleksiyon
5. *In vitro* dölleme
6. *In vitro* germlazm muhafazası
7. Somatik hücre melezlemesi (protoplast füzyonu)
8. Gen transferi
9. Hastalısız bitki elde edilmesinde meristem kültürü

10. Mikroçoğaltım
11. Sentetik tohum üretimi (somatik embriyolar)
12. Sekonder metabolit üretimi (kallus-hücre süspansiyonları)
13. Kimeralar (Babaoğlu vd., 2001).

Dünya’da *in vitro* doku kültürü teknikleri alanında yaşanan gelişmeler, ticari öneme sahip birçok süs bitkisi, tıbbi bitki ve meyve türlerinin mikro çoğaltımına olanak sağlamıştır. Doku kültürü ile üretim dünyanın birçok ülkesinde yapılmakta ve yılda yaklaşık olarak 600 milyon bitki üretimi gerçekleştirilmektedir (Altman ve Loberant, 2000).

#### 1.4. *P. vulgaris*’ in Taksonomisi Ve Bitki Hakkında Genel Bilgiler

Lamiaceae ailesine mensup olan *P. vulgaris* (Davis, P., 1982 ), halk arasında yara otu olarak da bilinmektedir (Kim vd., 2007). Kökeni Avrupa ve Asya’ya dayanan yara otu (Grieve, M., 1982) genellikle ılıman bölgeler ve tropikal dağlarda yayılış gösterirken (Gu vd., 2013), temel ve nötr topraklar olan sokak kenarlarında, nemli bölgelerde, otlaklarda, orman kenarlarında , nemli tortularda ve dere kenarlarında da yetişebilir (Davis, P., 1982).

*Prunella* L. cinsinin; *P. vulgaris* L., *P. orientalis* L., *P. laciniata* L., *P. grandiflora* L., *P. asiatica* L., *P. hyssopifolia* Linn., *P. hispida* Benth., *P. webbiana* Hort. ve *P. spica* olmak üzere dünyada 9 türü bulunmaktadır. Bu türlerden *P. vulgaris* L., *P. orientalis* L. ve *P. laciniata* L. Türkiye’de de yetişmektedir (Ahmed ve Ezer, 2008).

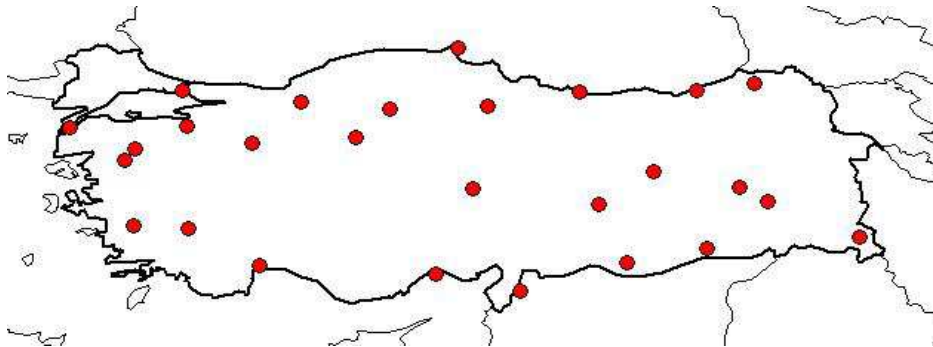


Şekil 1.1. *P. vulgaris* L. (Koyuncu vd., 2010).

**Çizelge 1.4.** *P. vulgaris*'in taksonomik hiyerarşisi ([www.tubives.com](http://www.tubives.com)).

Kingdom	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Class	Magnoliopsida
Subclass	Asteridae
Order	Lamiales
Family	Lamiaceae
Genus	<i>Prunella</i>
Species	<i>P. vulgaris</i> L.

*P. vulgaris* Türkiye’ de Osmaniye, Bolu, İstanbul, Hakkari, Mardin, Çankırı, Bitlis, Amasya, Ankara, Antalya, Artvin, Aydın, Balıkesir, Bursa, Çanakkale, Denizli, Eskişehir, Giresun, İçel, Kayseri, Malatya, Muş, Ordu, Rize, Sinop, Tunceli ve Karaman’ da doğal olarak yayılış gösterir (Şekil 1.2).



**Şekil 1.2.** Taksonun ülkemizdeki dağılımı ( [www.tubives.com](http://www.tubives.com)).

*P. vulgaris* çeşitli farmakolojik aktif bileşenin (triterpenler, fenolik asitler ve flavonoidler) botanik kaynağıdır. Yapılan araştırmalarda *P. vulgaris*' in yapısında oleanolik asit, betulinik asit, ursolik asit, rosmarinik asit, p-kumarik asit, kafeik asit, kuersetin, rutin, amirin, kuersetin-3-O -\_- D-galaktosit, spinasterol, stigmasterol, sitosterol ve daucosterol' ün varlığı tespit edilmiştir (Gu vd., 2013; Psotova vd., 2006).

*P. vulgaris* L.' nin yapraklarından elde edilen ekstraktların deri üzerine sarılarak mevcut yaraları iyileştirme amaçlı olarak kullanıldığı bilinmektedir (Koyuncu vd., 2010). Avrupa’da özellikle Almanya’da kendi kendine tedavi edici “self-heal” olarak çok iyi bilinen *P. vulgaris*' in çiçeklerinden hazırlanan infüzyonun gargara halinde orta çağda bile askeri kamplarda askerlerin ağız ülserlerine karşı kullanıldığı bildirilmiştir (Ahmed ve Ezer, 2008). Ateşli

hastalıklarda, ishalde, boğaz ağrısında, iç kanamada, ödemde, böbrek iltahabında, sıraca hastalığında, guatrda, karaciğer sorunlarının tedavisinde ayrıca gaz ve hazımsızlığı gidermede etkilidir (Grieve, 1982; Chevallier, 1996). Ayrıca tansiyon tedavi edici, iltihap kurutucu, anti bakteriyel, anti viral ve anti tümör özelliklerine sahip olduğu geleneksel Çin tıbbında uzun süre kullanılarak doğrulanmıştır (Gu vd., 2013).

### 1.5. *P. vulgaris* İle İlgili Yapılan Çalışmalar

#### 1.5.1. *P. vulgaris*' le yapılan doku kültürü çalışması

Antiviral aktivitesi güçlü tıbbi bir bitki olan *P. vulgaris*' in sürgün ucu yöntemi kullanılarak, farklı hormon tip ve konsantrasyonları içeren MS besin ortamlarında mikroçoğaltımı yapılmıştır. En yüksek miktarda çoklu sürgün rejenerasyonu  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  BA ile  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  IAA .içeren ortamlardan elde edilmiştir. Petiol, internod ve kök eksplantlarıyla yapılan rejenerasyon işlemlerinde başarı sağlanamamıştır (Turker vd., 2013).

#### 1.5.2. *P. vulgaris*' le yapılan diğer çalışmalar

*P. vulgaris*' ten elde edilen polisakkarit parçasının vero hücrelerinde bulunan *HSV1* ve *HSV2* antijenlerinin ifadelerinin üzerine etkisi, Flow Sitometri yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Enfekte olan hücrelerde *HSV* antijeni zamana bağlı olarak artış gösterirken *P. vulgaris* ise *HSV* antijenlerinin ekspresyonunu azaltmıştır (Chiu vd., 2004).

Bazı bitkilerden elde edilen ekstratların antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. *P. vulgaris*, kullanılan tüm bakteriler üzerinde (*Bacillus megaterium* DMS 32, *Pseudomonas aeruginosa* DMS 50071 SCOTTA, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* FMC 5, *Proteus vulgaris* FMC 1, *Staphylococcus aureus* COWAN 1 FMC 16, *Candida albicans* FMC 17, *Candida glabrata* ATCC 66032 *Candida tropicalis* ATCC 13803) antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Kırbağ vd., 2009).

Tampon düzenleyicileri ilave edilmiş kılcal bölge elektroforezi ile *P. vulgaris*' te bulunan teriterpenler, flavonoidler ve fenolik bileşenlerin gelişmiş analizi yapılmıştır. *P. vulgaris*'ten sadece izomerik bileşenler ve rosmarinik asidi tespit edilebilmiştir. Bunun dışındaki bileşenler ya düşük konsantrasyonları nedeniyle ya da rosmarinik asit varlığında kendilerini gösterememesi sebebiyle tespit edilememiştir (Cheung ve Zang, 2008).

*P. vulgaris* L.' nin flavonoidlerinin ultrasonik-yardımlı özütlenmesi ve *in vitro* ortamda antioksidan aktivitesi incelenmiştir. *P. vulgaris* L.' nin flavonoidlerinin ultrasonik yardımlı olarak çıkarılmasını optimize etmek için, The Box –Benchen tasarımı ile tepki yüzey

yönteminin kombinasyonu kullanılmıştır. Sonuçlar en yüksek flavonoid ekstraksiyonunun ultrasonik yardımcı çıkarım ile 30.5 dakika süreyle sıcaklığın 79 °C' de sabit tutulması ve çözücü olarak %41' lik etanol kullanımı sonucu %3,62 oranında elde edilebileceğini göstermiştir (Zhang vd., 2011).

ISSR ve SRAP markerleri kullanılarak 25 yabancı *P. vulgaris* ile bir ekili popülasyon arasındaki moleküler genetik çeşitlilik ve ilişki analiz edilmiştir. Kullanılan 17 adet SRAP primerden 134' ü polimorfik olan 154 tane amplifikasyon bant, 20 ISSR primer kullanılarak 219 banttan 195 adet polimorfik bant tespit edilmiştir. Veriler, 26 çeşit *P. vulgaris* popülasyonun da yüksek derecede genetik çeşitliliğe sahip olduğunu belirlerken, ISSR ve SRAP markerlarının *P. vulgaris*'in genetik çeşitliliğini analiz etmek için etkili ve güvenilir olduğunu göstermiştir (Liao vd., 2012).

Eksplant kaynağı olarak kullanılan *P. vulgaris* ile endometriosisin bitkisel tedavisi incelenmiştir. Yapılan deneyde 12 adet dişi fareye yalnızca su 12 adet dişi fareye ise *P. vulgaris* çayı verilmiştir. Bu iki grup karşılaştırıldığında çay verilen grupta eskiye göre önemli ölçüde daha az oranda ve daha az genişlikte endometriotik doku görülmüştür. Çay tedavisi yapılan bireylerde bu tedavinin doğurganlık döngüsüne olumsuz bir etkisi gözlemlenmemiştir (Collins vd., 2006).

*P. vulgaris*'in ana fenolik bileşeni olan rosmanirik asitin insan keratinosit hücre zincirindeki UVA indükte değişimlerine karşı etkisi değerlendirilmiştir. UV' ye maruz bırakılan insan keratinositleri *P. vulgaris* ya da rosmanirik asit ekstratlarıyla 4 saat süreyle tedavi edilmiştir. Bunun sonucunda *P. vulgaris* veya rosmanirik asitin UV ışınlarının neden olduğu hücre canlılığındaki azalmayı düşürücü etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Psotova vd., 2006).

Doxorubicin ile tedavi edilen şıcan kardiyometrisinde, *P. vulgaris*' in hücre koruyucu etkisi incelenmiştir. *P. vulgaris*' in *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda antioksidan potansiyeli tespit edilmiştir. Bu etkinin muhtemelen fenolik asitin yapıtaşlarından olan rosmanirik asitten kaynaklandığı belirtilmiştir (Psotova vd., 2005).

*P. vulgaris*' ten elde edilen sulu ekstraktlar ile Pma' nın tümör hücrelerinin istilasına ve yayılmasına baskısı incelenmiştir. *P. vulgaris*'ten elde edilen sulu ekstratın anti-metastatik etkisinin EMPP9 (Matrix metalloproteinase-9 )' un ekspresyonunun baskılanmasında aracı olduğu görülmüştür (Choi vd., 2010).

Pasif kaçınma, Y labirenti ve Morris Su labirenti kullanılarak *P. vulgaris var.* çiçeğinin etanolik ekstratının, farelerdeki ilaca bağlı öğrenme ve hafıza zayıflamalarına karşı etkisi incelenmiştir. Bu araştırmalar sonucunda *P. vulgaris var.*' ın bilişsel bozuklukları tedavi etmek için faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır (Park vd., 2010).

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Bitki Materyali

*P. vulgaris* tohumları Kütahya Belediyesi Hekim Sinan Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi' nden temin edilmiştir.



Şekil 2.1. *P. vulgaris* tohumları.

### 2.2. Kullanılan Kimyasallar Ve Cihazlar

Araştırmada mineral maddeler, vitaminler, bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamı kullanılmıştır.

**Çizelge 2.1.** MS besin ortamının içerdiği maddeler ve miktarları (Babaoğlu vd., 2001).

<b>Maddeler</b>	<b>MS Besin Ortamındaki Miktarlar (mg/l)</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
KI	0,83
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
Myo-Inositol	100
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8
Nikotinic asit	0,5
Pridoksin-HCl	0,5
Tiamin-HCl	0,1
Glisin	2

Kullanılan MS besin ortamı, Çizelge 2.1' de belirtilen maddeler haricinde şeker ve ortamın katılaştırılması amacıyla mikrobiyolojik agar içermektedir.

**Çizelge 2.2.** Kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri (Babaoğlu vd., 2001).

Ad	Kısa Ad	Molekül Ağırlığı	Erime Durumu	Toz Halde Saklama Sıcaklığı (°C)	Stok Solüsyon Saklama Sıcaklığı (°C)	Otoklav (O)-Filtre (F) ile Sterilizasyon
2,4-Diklorofenoksi asetik asit	2,4-D	221	EtOH	Oda sıcaklığı	0-5	O
Indol-3-asetik asit	IAA	175,2	EtOH	-0	-0	O/F
Indol-3-butirik asit	IBA	203,2	EtOH	0-5	-0	O/F
Naftalen asetik asit	NAA	186,2	NaOH	Oda sıcaklığı	0-5	O
6-Benzil amino pürin	BAP	225,3	NaOH	Oda sıcaklığı	0-5	O
Kinetin	Kin	215,2	NaOH	-0	-0	O/F

*P. vulgaris* tohumlarının çimlendirilmesi, toz halindeki bitki büyüme düzenleyicilerinin çözünmesi ve gerekli ekipmanların sterilizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla etil alkol ve sodyum hipoklorit kullanımı gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 2.3.** Araştırmada kullanılan alet ve cihazlar.

Ürün	Marka
pH metre	Metteler Toledo
Isıtıcıli manyetik karıştırıcı	WiseStire MSH-20A
Otoklav	Hıclave HG-80
Saf su cihazı	Thermo Scientific
Buzdolabı	Profilo BD 4303 Anfe
Mikropipet	Thermo Scientific
Derin dondurucu	Sanyo Ultra Low
Laminar flow kabin	Bilser
Hassas terazi	And
Beher	Lamtek
Erlen	Lamtek
Otoklav bandı	VP Medical
Pens	Hony
Bistüri	Stanles

Çizelge 2.3' te belirtilen cihaz ve aletler dışında, bitki tohumlarının çimlendirilmesinden dış ortama adaptasyonuna kadar geçen süre zarfında bitki büyütme odası kullanılmıştır.

### **2.3. Stok Solüsyonların Ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması**

MS besin ortamlarının hazırlanması için gerekli olan maddeler (Çizelge 2.1), birbirleriyle tepkime vermeyecek şekilde gruplandırılarak saf su içerisinde çözündürülüp hacimleri 100 ml (mililitre)' ye tamamlanmıştır. Cam şişelere aktarılan stok solüsyonlar buzdolabında +4°C' de muhafaza edilmiştir.

Araştırmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri (Çizelge 2.2) uygun kimyasallar içerisinde çözündürülmüş ve hacimleri saf su ile 100 ml' ye tamamlanmıştır. Mikropipetler aracılığıyla eppendorflara aktarılan bitki büyüme düzenleyicileri -80°C' de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

### **2.4. Çimlendirme İçin Gerekli MS Ortamının Hazırlanması**

Önceden hazırlanılmış stok solüsyonlardan serolojik pipetler ve pipet tabancası yardımıyla 5'er ml çekilerek beher içerisine aktarılmıştır. Solüsyonlara ilave olarak beher içerisine 30 gram şeker, 0,1 gram myo-inositol ve 1,9 gram KNO<sub>3</sub> ( potasyum nitrat ) eklenmiştir. Saf su ile hacmi 1000 ml' ye tamamlanan karışımın manyetik karıştırıcı yardımıyla homojen bir şekilde çözülüp dağılması sağlanmıştır.

NaOH ( sodyum hidroksit ) ve HCl ( hidrojen klorür ) solüsyonları kullanılarak pH metre aracılığıyla çözeltinin pH (hidrojenin gücü )' ı 5,7 olarak ayarlanıp, pH ölçümünden sonra çözelti içerisine 7 gram agar ilavesi yapılmıştır. Isıtıcılı manyetik karıştırıcıda kaynatılan çözelti 150 ml hacimli cam kavanozlar içerisine 30' ar ml hacminde aktarılmıştır.

### **2.5. Sterilizasyon İşlemleri**

#### **2.5.1. Alet ve cihazların sterilizasyonu**

Tohumların çimlendirilmesi sonucu elde edilen bitkilerin sürgün ve kök ortamlarına aktarılması sırasında kullanılan pens, bisturi, süzgeç gibi aletler alkolle silindikten sonra alüminyum folyoya sarılıp, sıcaklıktan etkilenmeyecek poşetler içerisine konularak 1 atm (atmosfer) basınç altında 20 dk (dakika) süre ile 121°C sıcaklıkta otoklavlanarak sterilize edilmişlerdir. Aletlerin sterillik durumu otoklav bandı kullanılarak tespit edilmiştir.

Laminar Flow Kabin kullanılmadan önce etil alkolle silinmiştir. Çalışmada kullanılacak otoklavlanmış ekipmanlar alkolle temizlenip kabin içerisine yerleştirilmiş 10-20 dk boyunca UV ışığa maruz bırakılmışlardır.

### **2.5.2. Besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu**

Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS besin ortamlarının sterilizasyonu 20 dakika süre boyunca 1atm basınç ve 121°C sıcaklıkta otoklavlanılarak yapılmıştır.

### **2.5.3. Tohumların sterilizasyonu**

Sterilizasyonun ilk aşamasında tohumlar sabunlu suyla yıkanıp kurutulmuştur. Sterilizasyonun ikinci kısmında tohumlar Laminar Flow Kabin içerisinde yerleştirilen kavanozlarda bulunan %70' lik etil alkolle 3dk muamele edilmiştir. Alkol muamelesinden sonra tohumlar 4 dk süresince %10' luk sodyum hipoklorit uygulamasına bırakılmıştır. Alkol ve sodyum hipokloritten arındırmak amacı ile tohumlar 3 dk süre boyunca saf suda 3 kez durulanmıştır.

### **2.6. In Vitro Ortamda *P. vulgaris* Tohumlarının Çimlendirilmesi**

Laminar Flow Kabin içererisinde yüzey sterilizasyonu yapılan *P. vulgaris* tohumları steril pensler kullanılarak önceden hazırlanan MS besin ortamlarının bulunduğu cam kavanozlar içerisine transfer edilmiştir. Kavanozların ağız kısımları kontaminasyon riskini önlemek amacıyla parafilm ile sarılmıştır.

Kültür kaplarına aktarılan tohumlar, 16 saat süreyle ışıklı 8 saat karanlık fotoperiyot, 4000 lux ışık şiddeti, 24°C ±1 °C sıcaklık ve %60 nem koşullarına sahip bitki büyütme odasında çimlendirilmeye bırakılarak 4 haftalık süre sonundaki çimlenme oranı belirlenmiştir.



**Şekil 2.2.** a. *P. vulgaris* tohumlarının sterilizasyonu b. Steril edilmiş *P. vulgaris* tohumları c. *P. vulgaris* tohumlarının besin ortamına aktarımı.

### 2.7. *In Vitro* Ortamda Çimlendirilen Tohumlardan Sürgün Elde Edilmesi

İki ve dört haftalık çimlenme süresi sonunda elde edilen bitkiciklerin apikal kısmından 2 mm uzunluğunda eksplantlar kesilmiştir. Eksplantlar, içerisinde çeşitli tip ve konsantrasyonlarda IBA (Indol-3-Butirik Asit), NAA (Naftalen Asetik Asit), BAP (6-Benzil amino pürin) ve Kin (6-Furfuril Amino Pürin) hormonları içeren (Çizelge 2.4) MS besin ortamlarına 4 tekerrür ve her tekerrürde 4 adet eksplant kullanılarak aktarılmışlardır. İki haftalık süre boyunca meydana gelen sürgün gelişimleri gözlenmiştir.

**Çizelge 2.4.** Kullanılan sürgün ortamlarının içeriği.

Ortam No	Besin Ortamlarının İçeriği (mg/l)
1	MS + 3 Kin + 0,1 IBA
2	MS + 3 Kin + 0,5 IBA
3	MS + 3 Kin + 1 IBA
4	MS + 3 Kin + 0,1 NAA
5	MS + 3 Kin + 0,5 NAA
6	MS + 3 Kin + 1 NAA
7	MS + 3 BAP + 0,1 IBA
8	MS + 3 BAP + 0,5 IBA
9	MS + 3 BAP + 1 IBA
10	MS + 3 BAP + 0,1 NAA
11	MS + 3 BAP + 0,5 NAA
12	MS + 3 BAP + 1 NAA
13	MS + 3 Kin + 0,1 IAA
14	MS + 3 Kin + 0,5 IAA
15	MS + 3 Kin + 1 IAA
16	MS + 3 BAP + 0,1 IAA
17	MS + 3 BAP + 0,5 IAA
18	MS + 3 BAP + 1 IAA

### 2.8. *In Vitro* Ortamda Sürgünlerin Alt Kültüre Alınması

Sürgün ortamında bulunan eksplantlar, 2 haftalık süre sonunda olası besin yetersizliğini engellemek, kararmaları önlemek ve daha iyi bir sürgün gelişimi sağlamak amacıyla buldukları ortamla aynı içeriğe sahip taze besin ortamlarına aktararak alt kültüre alınmışlardır. İki haftalık süre zarfında meydana gelen değişiklikler gözlemlenerek tespit edilmiştir.

### 2.9. *In Vitro* Ortamda Elde Edilen Sürgünlerin Kök Ortamına Alınması

Dört hafta sonunda elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi farklı konsantrasyonda oksin (IBA, NAA) içeren (Çizelge2.5) besin ortamlarında 8 tekerrür ve her tekerrürde 2 eksplant bulundurulmuş yapılmıştır. Köklendirme çalışmaları 4 hafta sürmüştür.

**Çizelge 2.5.** Kök ortamlarının içeriği.

No	Besin Ortamlarının İçeriği ( mg/l)
1	MS +0,5 NAA
2	MS +1 NAA
3	MS +0,5 IBA
4	MS +1 IBA
5	½MS

### 2.10. Bitkilerin Toprağa Alınması Ve Dış Ortama Adaptasyonu

Sürgünlerin köklendirilmesinin ardından meydana gelen tam bitkileri toprağa aktarmak ve dış ortama adaptasyonunu sağlamak amacıyla ilk olarak bitkilerin ekimi yapılacak toprak 1 atm basın 121°C' de 20 dakika boyunca otoklavlanılarak steril hale getirilmiştir.

Besin ortamlarından çıkarılan bitkiler hızlı ve dikkatli bir şekilde yıkanarak üzerlerindeki agardan arındırılmıştır. Yıkanan bitkiler hızlı nem kaybının engellemek amacıyla kapaklı plastik şişeler içerisindeki steril toprağa dikilmişlerdir. Plastik şişelerin kapakları ilk hafta birkaç saat, ikinci haftadan itibaren giderek artan sürelerde açılarak bitkiciklerin dış ortama adapte olmaları sağlanmıştır.

### 3. SONUÇLAR

#### 3.1. Tohum Çimlendirme Sonuçları

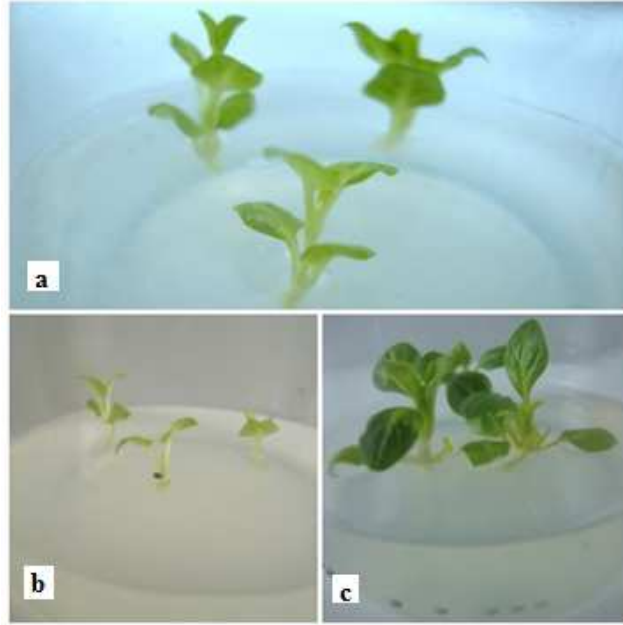
Laminar Flow Kabin içerisinde yüzey sterilizasyonu yapılan 400 adet *P. vulgaris* tohumunun, MS besin ortamı bulunan 50 adet kavanoza 8' erli gruplar halinde ekimi gerçekleştirilmiştir. Bitki büyütme odasında çimlenmeye alınan tohumlarda ilk çimlenmeler beşinci günden itibaren görülmüştür. Onbeşinci gün sonunda çimlenme oranı %80 olarak belirlenmiştir. Dört haftalık çimlenme süresi sonunda bitki boylarının 2-4 cm' ye ulaştığı görülmüştür.



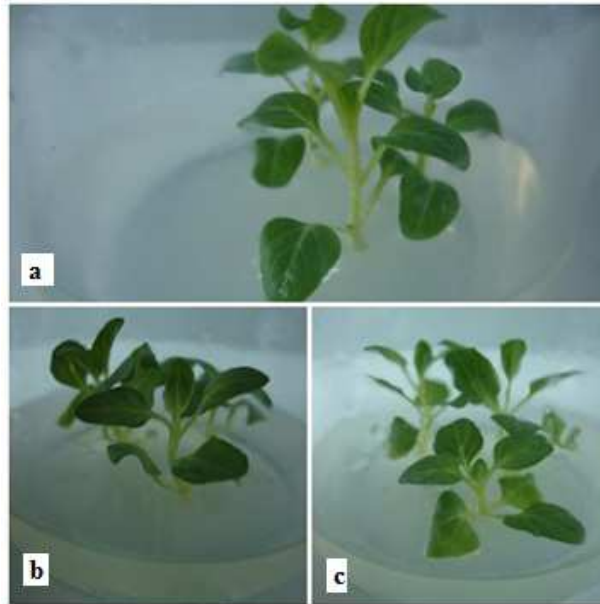
Şekil 3.1. MS besin ortamında çimlenen *P. vulgaris* tohumları.

#### 3.2. *In Vitro* Koşullarda Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Sürgün Ucu Kültürü Yöntemi ile *P. vulgaris*' in Mikroçoğaltımı Üzerine Etkileri

Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumların steril ortamda çimlendirilmesi sonucu elde edilen bitkiciklerin sürgün uçları 2 mm uzunluğunda kesilerek, Kin (3 mg/l), BAP (3 mg/l), IBA (0,1/ 0,5/ 1 mg/l), NAA (0,1/ 0,5/ 1 mg/l), IAA (0,1/ 0,5/ 1 mg/l) bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonlarını içeren MS besin ortamlarına aktarılmıştır. Dört haftalık süre sonunda bitkilerin ulaştıkları sürgün uzunlukları, yaprak sayıları ve yaprak ayası genişlikleri ölçülmüştür.



**Şekil 3.2.** Farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda ikinci hafta sonunda gelişen sürgünler (a) 3 mg/l Kin-0,5 mg/l IBA içeren MS ortamı (b) 3 mg/l BAP-0,5 mg/l IBA içeren MS ortamı (c) 3 mg/l BAP-0,5 mg/l NAA içeren MS ortamı.



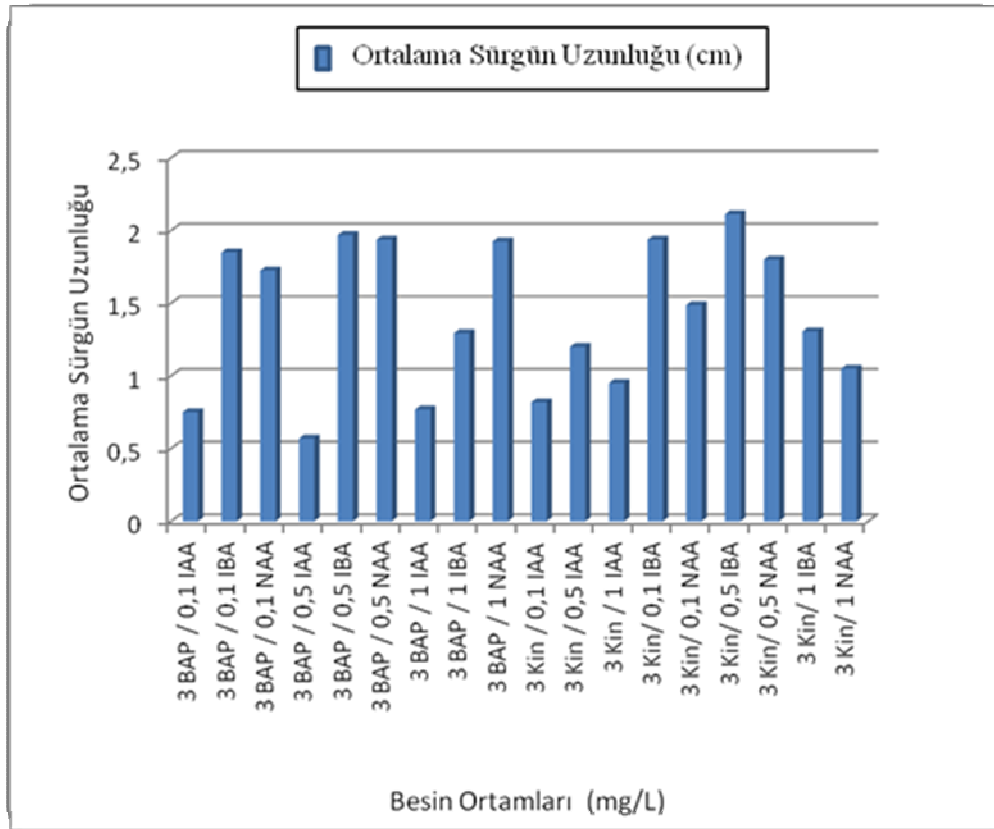
**Şekil 3.3.** Farklı hormon ortamlarında dördüncü hafta sonunda gelişen sürgünler (a) 3 mg/l Kin-0,5 mg/l IBA içeren MS ortamı (b) 3 mg/l BAP-0,5 mg/l IBA içeren MS ortamı (c) 3 mg/l BAP-0,5 mg/l NAA içeren MS ortamı.

ANOVA analizlerinden elde edilen sonuçlara göre, farklı hormon uygulamaları ile *P. vulgaris* sürgün uzunluğu, yaprak sayısı ve yaprak ayası genişliği arasında istatistiksel açıdan önemli bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.1). Hormon uygulamaları ile sürgün uzunluğu arasındaki ilişkiyi belirlemek için elde edilen verilere TUKEY-HSD analizi yapılmış ve 3 mg/l Kin- 0,5 mg/l IBA (2,11cm  $\pm$  0,06 cm), 3 mg/l BAP - 0,5 mg/l IBA (1,97 cm  $\pm$  0,04 cm), 3 mg/l BAP - 0,5 mg/l NAA (1,94 cm  $\pm$  0,06 cm), 3 mg/l Kin- 0,1 mg/l IBA (1,94 cm  $\pm$  0,05 cm) ve 3 mg/l BAP - 1 mg/l NAA (1,93 cm  $\pm$  0,11 cm) hormon uygulamalarında yetiştirilen *P. vulgaris* bitkiciklerinin en uzun sürgünlere sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.4 ve Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.1.** Hormon uygulamalarının istatistiksel değerlendirilmesi.

KAYNAK	DF	F DEĞERİ	p DEĞERİ
Sürgün uzunluğu	17	34,58	0,0001*
Yaprak sayısı	17	18,02	0,0001*
Yaprak ayası genişliği	17	41,98	0,0001*

\* p<0,05 seviyesinde önemli



**Şekil 3.4.** Bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün uzunluklarına etkisi.

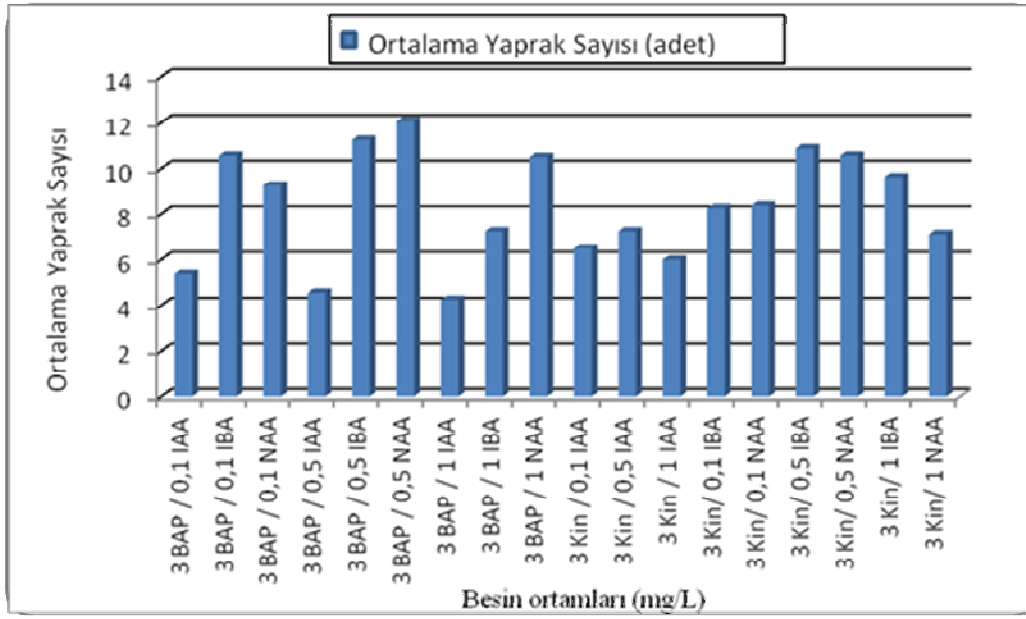
**Çizelge 3.2.** Sürgün uzunluklarına etki eden hormonların Tukey-HSD sonuçları (Q=3,52; p< 0,05).

Hormon Ortamları ( mg/l)	Sürgün Uzunluğunun Derecelendirilmesi								Ortalama Sürgün Uzunlukları (cm)	Standart Hata
3 Kin / 0,5 IBA	A								2,11	0,06
3 BAP / 0,5 IBA	A								1,97	0,09
3 BAP / 0,5 NAA	A								1,94	0,06
3 Kin / 0,1 IBA	A								1,94	0,06
3 BAP / 1 NAA	A								1,93	0,11
3 BAP / 0,1 IBA	A	B							1,85	0,1
3 Kin / 0,5 NAA	A	B							1,8	0,08
3 BAP / 0,1 NAA	A	B	C						1,73	0,09
3 Kin / 0,1 NAA		B	C	D					1,49	0,08
3 Kin / 1 IBA			C	D	E				1,31	0,05
3 BAP / 1 IBA				D	E				1,29	0,06
3 Kin / 0,5 IAA				D	E	F			1,2	0,06
3 Kin / 1 NAA					E	F	G		1,05	0,09
3 Kin / 1 IAA					E	F	G	H	0,95	0,09
3 Kin / 0,1 IAA						F	G	H	0,82	0,10
3 BAP / 1 IAA							G	H	0,77	0,06
3 BAP / 0,1 IAA							G	H	0,75	0,05
3 BAP / 0,5 IAA								H	0,57	0,04

Hormon uygulamaları ile yaprak sayısı arasındaki ilişkiyi belirlemek için elde edilen verilere, TUKEY-HSD analizi yapılmış ve 3 mg/l BAP - 0,5 mg/l NAA (12,06 adet  $\pm$  0,60) ve 3 mg/l BAP - 0,5 mg/l IBA (11,25 adet  $\pm$  0,68 ) hormon uygulamalarında yetiştirilen *P. vulgaris* bitkiciklerinin en yüksek miktarda yaprak sayısına sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3. 6 ve Çizelge 3. 3).



Şekil 3.5. *P. vulgaris* yaprak ayasının üstten görünüşü.

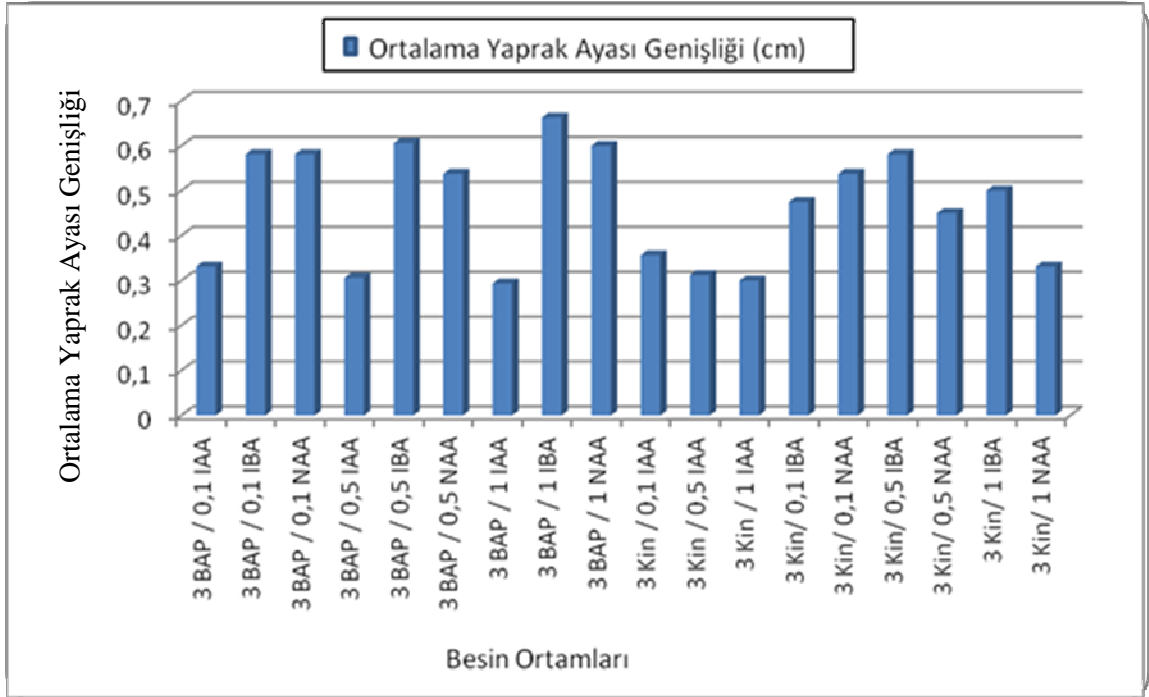


Şekil 3.6. Bitki büyüme düzenleyicilerinin yaprak sayısı üzerine etkisi.

**Çizelge 3.3.** Yaprak sayısına etki eden hormonların Tukey-HSD sonuçları (Q=3,52; p<0,05).

Hormon ortamları(mg/l)	Yaprak Sayısının Derecelendirilmesi						Ortalama Yaprak Sayısı(adet)	Standart Hata
3 BAP / 0,5 NAA	A						12,06	0,6
3 BAP / 0,5 IBA	A						11,25	0,7
3 Kin / 0,5 IBA	A	B					10,88	0,52
3 BAP / 0,1 IBA	A	B					10,56	0,56
3 Kin / 0,5 NAA	A	B					10,56	0,68
3 BAP / 1 NAA	A	B					10,5	0,69
3 Kin / 1 IBA	A	B	C				9,63	0,58
3 BAP / 0,1 NAA	A	B	C	D			9,25	0,49
3 Kin / 0,1 NAA		B	C	D	E		8,38	0,7
3 Kin / 0,1 IBA		B	C	D	E		8,25	0,41
3 BAP / 1 IBA			C	D	E	F	7,25	0,6
3 Kin / 0,5 IAA			C	D	E	F	7,25	0,69
3 Kin / 1 NAA			C	D	E	F	7,13	0,33
3 Kin / 0,1 IAA				D	E	F	G	6,5
3 Kin / 1 IAA					E	F	G	6
3 BAP / 0,1 IAA						F	G	5,38
3 BAP / 0,5 IAA						F	G	4,56
3 BAP / 1 IAA							G	4,25

Hormon uygulamaları ile yaprak ayası genişliği arasındaki ilişkiyi belirlemek için elde edilen verilere, TUKEY-HSD analizi yapılmış ve 3 mg/l BAP - 1 mg/l IBA (0,66 cm  $\pm$  0,02 cm) hormon uygulamasında yetiştirilen *P. vulgaris* bitkiciklerinin en geniş yaprak ayasına sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3. 7 ve Çizelge 3.4).



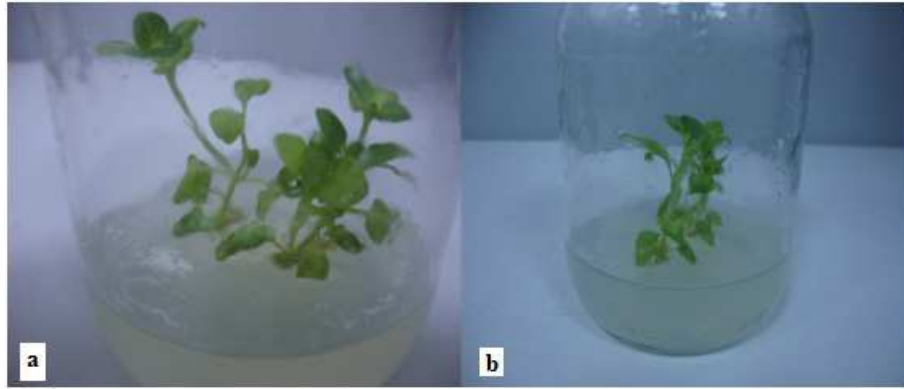
Şekil 3.7. Bitki büyüme düzenleyicilerinin yaprak ayasının genişliğine etkisi.

**Çizelge 3.4.** Yaprak ayası genişliğine etki eden hormonların Tukey-HSD sonuçları (Q=3,52; p<0,05).

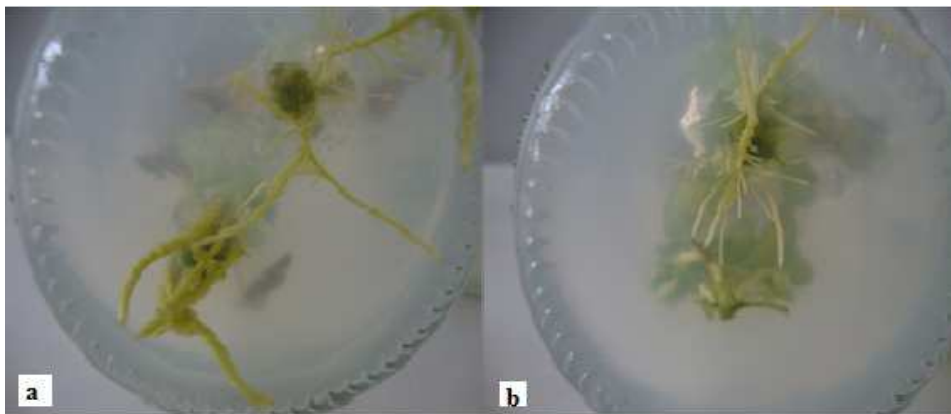
Hormon Ortamları (mg/l)	Yaprak Ayası Genişliğinin Derecelendirilmesi					Ortalama Yaprak Ayası Genişliği (cm)	Standart Hata
3 BAP / 1 IBA	A					0,66	0,02
3 BAP / 0,5 IBA	A	B				0,61	0,02
3 BAP / 1 NAA	A	B				0,60	0,03
3 BAP / 0,1 IBA	A	B	C			0,58	0,01
3 BAP / 0,1 NAA	A	B	C			0,58	0,02
3 Kin / 0,5 IBA	A	B	C			0,58	0,01
3 BAP / 0,5 NAA		B	C	D		0,54	0,02
3Kin / 0,1 NAA		B	C	D		0,54	0,02
3Kin / 1 IBA			C	D		0,50	0,02
3 Kin / 0,1 IBA				D		0,46	0,02
3Kin / 0,5 NAA				D	E	0,45	0,02
3 Kin / 0,1 IAA					E	F	0,36
3Kin / 1 NAA						F	0,33
3 BAP / 0,1 IAA						F	0,33
3 Kin / 0,5 IAA						F	0,31
3 BAP / 0,5 IAA						F	0,31
3 Kin / 1 IAA						F	0,30
3 BAP / 1 IAA						F	0,29

### 3.3. *In Vitro* Ortamda Elde Edilen Bitkicikleri Köklendirme Sonuçları

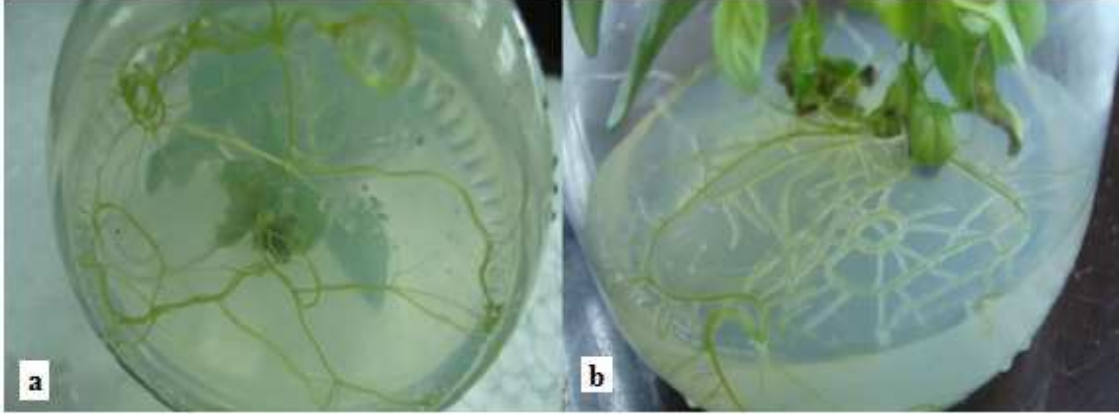
Sürgün çalışmaları sonucu elde edilen bitkiciklerin köklendirilmesi IBA (0,5-1 mg/l) ve NAA (0,5-1 mg/l ) hormonlarını içeren besin ortamları ile ½ MS besin ortamlarında yapılmıştır (Şekil 3.9, Şekil 3.10). En iyi kök oluşumları (%85) 0,5 mg/l IBA ve 1 mg/l IBA hormonlarını içeren MS besin ortamlarında kültüre alınan bitkiciklerde elde edilmiştir. 0,5 mg/l NAA ve 1 mg/l NAA konsantrasyonları içeren MS besin ortamlarında 4 haftalık süre sonunda % 80 oranında kök oluşumu sağlanırken, ½ MS besin ortamına bırakılan sürgünlerde köklenme görülmemiştir.



**Şekil 3.8.** Kök ortamına aktarılan *P. vulgaris* sürgünleri (a) 1 mg/l IBA içeren MS ortamı (b) 1 mg/l NAA içeren MS ortamı.



**Şekil 3.9.** NAA hormonu içeren MS besin ortamlarındaki kök oluşumları (a) 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamı (b) 1 mg/l NAA içeren MS ortamı.



**Şekil 3.10.** IBA hormonu içeren MS besin ortamlarındaki kök oluşumları (a) 0,5 mg/l IBA içeren MS ortamı (b) 1 mg/l IBA içeren MS ortamı.

IBA ve NAA hormonunu farklı konsantrasyonlarda içeren kök ortamlarına alınan sürgünlerde, 4 haftalık kültür süresinin aşılması durumunda adventif kök oluşumları görülmüştür.

**Çizelge 3.5.** Bitki büyüme düzenleyicilerinin kök oluşumuna etkisi.

Hormon Ortamı	Kök Tipi	% Kök Oluşumu	Ortalama Kök Uzunluğu(cm)	Adventif Kök Oluşumu
MS+ 0,5mg/l IBA	Uzun/ Seyrek	85	17	Var
MS+ 1mg/l IBA	Uzun/ Seyrek	85	17	Var
MS +0,5mg/l NAA	Kısa/ Sık	80	4	Var
MS + 1 mg/l NAA	Kısa/ Sık	80	4	Var
½ MS	-	-	-	-

Kök oluşumu meydana gelen *P. vulgaris* sürgünlerinin dış ortama adaptasyonu % 100 oranında gerçekleştirilmiştir(Şekil 3.12, Şekil 3.13).



**Şekil 3.11.** *P. vulgaris*' te adventif kök oluşumu.



**Şekil 3.12.** Dış ortama adapte olan *P. vulgaris*' te kök gelişimi (a) MS besin ortamından arındırılmış bitkicikler (b) Toprağa aktarılmış bitkicikler (c) Toprağa alınmış bitkide köklenme.



**Şekil 3.13.** Dış ortama adaptasyonu sağlanmış *P. vulgaris*.

#### 4. TARTIŞMA

Doku kültürü teknikleri, çok küçük bitki parçalarının (eksplant), özel olarak hazırlanmış steril besin ortamlarında ve steril koşullarda yetiştirilerek yeni bir bitki elde edilmesi ve çoğaltılması şeklinde gerçekleştiren yöntemler bütünü olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde, pek çok bitkinin virüs ve benzeri etmenlerden arındırılması, ıslah edilmesi, hızlı üretimi ve uzun süreli muhafazası amacıyla doku kültürü tekniklerinden yararlanılması konusundaki çalışmalar hız kazanmıştır (Çetin vd., 2007).

Geleneksel yöntemlerle gerçekleştirilen *in vivo* çoğaltım hem zaman alan zahmetli bir işlem olması hem de ekonomik öneme sahip tıbbi bitkiler için önemli bir parametre olan toplam biyo-kütlelerin düşük miktarlarda oluşu yönüyle yetersiz kalmaktadır (Sudha vd., 2005). Bitki doku kültürü yöntemleri ile biyo-kütle miktarlarının artırılması, daha yüksek miktarlarda sekonder metabolit eldesi yönünde yapılan çalışmalar hız kazanmıştır.

Bu tez kapsamında, tıbbi ve aromatik bir bitki olan *P. vulgaris*' in sürgün ucu eksplantlarına farklı tip ve konsantrasyondaki bitki büyüme düzenleyicilerin etkisi çalışılmış, en yüksek gövde uzunluğu, yaprak sayısı ve yaprak aya genişliğinin elde edilmesi için en uygun bitki büyüme düzenleyiciler belirlenmiştir.

Bitki doku kültürü uygulamalarında kültürü başlatmak ve kültürdeki bitki hücrelerini uzun süre korumak için veya kültüre edilmiş hücrelerden tam bitkileri rejenere etmek için gereken koşullar her bitki türü için farklılık göstermektedir. Bir türün her varyetesi için de bireysel olarak belirlenmiş kültürel gereksinimler farklı olmaktadır. Çalışma temel tuz ve mineralleri içeren MS besin ortamı kullanılarak, 16 saat ışık 8 saat karanlık fotoperiyot, 4000 lux ışık şiddeti,  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklık ve %60 nem koşullarının sağlandığı bitki büyütme odasında yapılmıştır.

Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılan besin ortamları bakteri ve fungusların üremesi için çok uygundur, bu nedenle bitki materyallerinden bu etmenlerin uzaklaştırılması gerekir. Bitki materyallerinin sterilizasyonu için kimyasal maddelerden en yaygın olarak kullanılanları; etanol (EtOH), tween, sodyum hipoklorit (NaOCl), civa klorit ( $\text{HgCl}_2$ ) tir. Çalışmada *P. vulgaris* tohumlarına 3 dk (%70) etanol, 4dk ticari çamaşır suyu (%5 NaCl) ile sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Yapılan gözlemler sonucu 15. gün sonunda çimlenme oranı % 80 olarak belirlenmiş, herhangi bir kontaminasyon problemi ile karşılaşılmamıştır.

Bitki doku kültürü uygulamalarında kullanılan, bitki büyüme düzenleyicileri bir bitkideki fizyolojik olayları kontrol veya modifiye eden, doğal ya da sentetik organik bileşiklerdir. Bazı hormonlar, fizyolojik tepkiler oluşturacağı bir dokuda üretilip diğerlerine transfer edilirken, bazıları ise aynı dokuda üretilip orada fonksiyon gösterirler. Bir kısım hormonlar bitkilerde teşvik edici etkiye sahipken, diğer bir kısmı ise engelleyici etkide bulunurlar. Oksinler bitkide apikal dominanside, yaprak ve meyve dökülmesinin önlenmesinde, etilen sentezinin uyarılması gibi olaylarda etkili olmasının yanı sıra, doku kültüründe kök oluşumunu teşvik ederler. Sitokininler özellikle hücre bölünmesini teşvik ederler. Böylece bitkinin büyüüp gelişmesini sağlarlar. Sitokininlerin bitki dokularında yaşlanmayı geciktirdiği, dolayısıyla katabolizmayı durdurucu veya yavaşlatıcı etkileri olduğu ayrıca doku kültüründe sürgün oluşumunu teşvik ettiği bilinmektedir (Zengin ve Munzuroğlu, 2004; Kumlay ve Eryiğit, 2011). Sitokininlerden Kinetin (Kin) ve Benzil Amino pürin (BAP); oksinlerden Naftalen Asetil Asit (NAA), Indol Bütirik Asit (IBA) ve Indol Asetik Asit (IAA) hormonlarının kullanıldığı araştırmamızda en uzun sürgünler 3 mg/l Kin-0,5 mg/l IBA, 3 mg/l BAP-0,5 mg/l IBA, 3 mg/l BAP-0,5 mg/l NAA, 3 mg/l Kin-0,1 mg/l IBA ve 3 mg/l BAP-1 mg/l NAA bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda tespit edilmiştir.

Sabit Kin ve BAP (3 mg/l) konsantrasyonlarıyla kombine edilen IBA, NAA ve IAA miktarları arttıkça, sürgün uzunluklarında giderek azalmanın meydana geldiği görülmüştür. IBA, NAA ve IAA arasında ortalama olarak en uzun sürgünleri Kin (3 mg/l) ve BAP (3 mg/l) ile kombinasyonları yapılan IBA (0,5 mg/l) uygulamalarında gözlenmiştir. Bitki büyüme düzenleyicileri ile yaprak sayısı arasındaki ilişkiyi belirlemek için yapılan çalışmalarda 3 mg/l BAP-0,5 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP-0,5 mg/l IBA içeren MS besin ortamlarında en fazla sayıda yaprağa sahip bitkicikler elde edilmiştir.

Yaprak ayası genişliği ile bitki büyüme düzenleyicileri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde en geniş yaprak ayasına sahip bitkiciklerin 3 mg/l BAP - 1 mg/l IBA hormonlarıyla desteklenmiş MS besin ortamlarında geliştiği tespit edilmiştir. Yapılan değerlendirmede sabit Kin (3 mg/l) ve BAP (3 mg/l) ile kombinasyonları yapılan IAA uygulamalarının, IBA ve NAA hormon uygulamalarına göre daha düşük değerlerde yaprak genişliğine yol açtığı tespit edilmiştir.

Yapılan literatür araştırmasında *P. vulgaris*' in gövde uzunluğu, yaprak sayısı ve yaprak ayası genişliğiyle ilgili bir çalışma bulunamazken, Turker ve arkadaşları *P. vulgaris*' in mikroçoğaltımı ile ilgili yaptıkları çalışmada en yüksek miktarda çoklu sürgün

rejenerasyonunu 3.0 mg/l BA ile 0.1 mg/l IAA içeren ortamlardan elde etmişlerdir. Petiol, internod ve kök eksplantlarıyla yapılan rejenerasyon işlemlerinden sonuç alamamışlardır.

Tam bir bitki eldesi için elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi gerekmektedir. Kök oluşumlarında oksin bitki büyüme düzenleyicileri rol oynamaktadır, bu nedenle kök oluşturmak amacı ile elde edilen *P. vulgaris* sürgünleri 0,5 mg/l IBA, 1 mg/l IBA, 0,5 mg/l NAA ve 1mg/l NAA içeren MS besin ortamları ile ½ MS besin ortamına aktarılmışlardır. Yapılan gözlemler sonucu 0,5 mg/l IBA ve 1 mg/l IBA konsantrasyonlarında 4. hafta sonunda, % 85 oranında ve ortalama 17 cm uzunluğunda kök oluşumları tespit edilmiştir. Diğer oksin uygulaması olan 0,5 mg/l NAA ve 1 mg/l NAA içeren ortamlarda, % 80 oranında köklenme gözlenirken, kök uzunluklarının ortalama 4 cm olarak meydana geldiği belirlenmiştir. Kök oluşumlarının IBA içeren ortamlarda uzun ve az sayıda, NAA içeren ortamlarda kısa ve çok sayıda olduğu gözlenmiştir. ½ MS besin ortamında bulunan sürgünlerde kök gelişimi meydana gelmemiştir.

Köklendirilen bitkiler, dış ortama adaptasyon sağlamak ve hızlı nem kaybını engellenmek amacıyla kapaklı plastik şişeler içerisindeki steril toprağa dikilmişlerdir. Plastik şişelerin kapakları ilk günlerde kısa, ilerleyen günlerde daha da uzun sürelerle açılarak bitkilerin havalandırılması ve su ihtiyaçları karşılanmıştır. 15 günlük süre sonunda bitkilerin dış ortama adaptasyonu % 100 oranında sağlanmıştır.

Tez çalışmasında *P. vulgaris* bitkisinin sürgün ucuna etki eden bitki büyüme düzenleyicilerinden sitokinin (BAP, Kin) ve oksinlerin (NAA, IAA, IBA) farklı tip kombinasyon ve konsantrasyon uygulamaları çalışılmıştır. En iyi gövde uzunluğu, yaprak sayısı ve yaprak ayası genişliği elde edilmesini sağlayacak bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyon ve konsantrasyonları tespit edilerek, tıbbi öneme sahip olan *P. vulgaris* bitkisinden yüksek miktarda biyo-kütle eldesi için uygulanacak protokol belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmed, J.H., Ezer, N., (2008), *Prunella L.* Türlerinin Kimyasal Bileşikleri ve Biyolojik Aktiviteleri, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi, 28 (1), s. 93-113.
- Altman, A., Loberant, B., (2000), Micropropagation of plants, principles and practices. In: Spier, (R. E.; Griffiths, B. And Scragg, A.H., Eds.), The Encyclopaedia of Cell Technology. ISBN: 0-471-16123-3, John Wiley and Sons, Inc., s. 916-929, New York.
- Avcı, M., (2005), Çeşitlilik ve endemizm açısından Türkiye'nin bitki örtüsü. Coğrafya Dergisi, 13: s. 27-55.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., (2001), Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kültürü ve Uygulamaları, S.Ü. Vakfı Yayınları, 8, s. 262-281.
- Bayram, E., Kırıcı, E., Tansi, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S., Telci, İ., (2010), Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretimine Arttırılması Olanakları, Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, Bildiriler Kitabı-1, 11-15 Ocak, Ankara, s. 437-457.
- Bourgand, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., (2001), Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, Plant Science, 161, s. 839-851.
- Cheung, H.Y., Zhang, Q.F., (2008), Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in *Prunella vulgaris L.* by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers. Journal of Chromatography A, 1213, s. 231-238.
- Chevallier, A., (1996), The Encyclopedia of Medicinal Plants. Dorling Kindersley Limited, s.336, London.
- Chiu, L.C., Zhu, W., Ooi, V.E.A., (2004), Polysaccharide fraction from medicinal herb *Prunella vulgaris* downregulates the expression of herpes simplex virus antigen in Vero cells. J Ethnopharmacol, 93 (1), s. 63-8.
- Choi, J.H., Han, E.H., Hwang, Y.P., Choi, J.M., Choi, C.Y., Chung, C.Y., Seo, J.K., Jeong, H.G., (2010), Suppression of PMA-induced tumor cell invasion and metastasis by aqueous extract isolated from *Prunella vulgaris* via the inhibition of NF- $\kappa$ B-dependent MMP-9 expression. Food and Chemical Toxicology 48, s. 564-571.
- Collins, N.H., Lessey, E. C., Fowler, L., Palomino, W. A., Houwing, A. M., Lessey, B. A., (2006), Herbal therapy for endometriosis: *Prunella vulgaris* (self heal) reduces the size and number endometriotic xenografts in immunodeficient RAG-2/gamma(c) knockout mice. Fertility and Sterility, 86(3) Supp, s. 1, 274.
- Çetin, E.S., Kazaz, S., Baydar, N.G., (2007), Farklı Besin Ortamlarının Karanfil (*Dianthus caryophyllus L.*) Sürgün Ucu Kültürü Üzerine Etkileri. Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi, 24 (2): 1-8 ISSN 1300-3496.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Dağcı, E.K., İzmirli, M., Dığrak, M., (2002), Kahramanmaraş İlinde Yetişen Bazı Ağağ Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. KSU Fen ve Mühendislik Dergisi 5,1, s. 38-46.

Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K.,(1982), Flora of Turkey and The East Aegen Islands. Edinburgh University Press, Sayı 7, Edinburgh.

Davis, P.H., (1985), Flora of Turkey and East Aegean Islands. Edinburgh University Pres. Edinburgh, s. 1-9.

Dönmez, A. A., (2001), A new species of *Salvia* (Lamiaceae). Bot J Linn Soc. 137, s. 413- 416.

Ellialtıoğlu, ř., Sarı, N., Abak, K., (2001), Haploid bitki üretimi (İn: Bitki Biyoteknolojisi \_ Doku Kültürü Ve Uygulamaları-; Editörler; Mehmet Babaoğlu, Ekrem Gürel, Sebahattin Özcan), 374, s. (137-189).

Grieve, M., (1982), A Modern Herbal. Dover Publications, s.731, New York.

Gu, X., Li, Y., Mu, J., Zhang, Y., (2013), Chemical constituents of *Prunella vulgaris*. Journal of Environmental Sciences, 25(Suppl.), s. 161–163.

Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. ve Baser, K.H.C., (2000), Flora of Turkey and East Aegean Islands, Supplement II. Edinburgh Univ. Press., Sayı 11, Edinburg, s. 618-619.

<http://www.titck.gov.tr/DisplayDynamicModule.aspx?mld=1noktNpqyfA=>

[http://tubives.com/index.php?sayfa=1&tax\\_id=7859](http://tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=7859)

Kaya Y., Aksakal, Ö., (2005), Endemik bitkilerin Dünya ve Türkiye'deki dağılımı. Erzincan Eğitim Fakültesi Dergisi, 7, 1, s. 85-99.

Kırbağ, S., Zengin, F., Kürşat, M., (2009), Antimicrobial Activities Of Extracts Of Some Plants. Pak. J. Bot., 41 (4), s. 2067-2070.

KIZIL, S. ve ERTEKİN, A. S. (2003), Diyarbakır Ve Çevresinde Yayılış Gösteren Bazı Tıbbi Bitkiler. Türkiye 5. Tarla Bitkileri Kongresi, 13-17 Ekim 2003, Diyarbakır, s. 292-297.

Kim, S. Y., Shin, H. Y., Lim, J. P., Chae, B. S., Park, J. S., Hong, S. G., et al. , (2007), Effects of *Prunella vulgaris* on mast cell-mediated allergic reaction and inflammatory cytokine production. Experimental Biology and Medicine, 232, s. 921–926.

Koyuncu, O., Yaylacı, O.K., Öztürk, D., Potoğlu Erkara, İ., Savaroğlu, F., Akçoşkun, Ö., Ardıç, M., (2010), Risk categories and ethnobotanical features of the *Lamiaceae* taxa growing naturally in Osmaneli ( Bilecik / Turkey ) and environs. Biological Diversity and Conservation, 3/3, s. 31-45.

Kumlay, A.M., Eryiğit, T., (2011), Bitkilerde Büyüme ve Gelişmeyi Düzenleyici Maddeler: Bitki Hormonları. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 1(2), s. 47-56.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liao, L. Guo, Q. S., Wang, Z.Y., Liu, L., Zhu, Z. B., (2012), Genetic diversity analysis of *Prunella vulgaris* in China using ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 45,s. 209–217.
- Murashige, T., and Skoog, F., (1962), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15, s. 473-497.
- Özçelik, H., Yıldırım, B., (2011), Türkiye çövenlerinin (*Gypsophila* L. ve *Ankyropetalum* Fenzl spp.) ekonomik önemi, kullanım olanakları ve korunması üzerine düşünceler. *SDÜ Orman Fakültesi Dergisi*, 12, s.57-61.
- Park, S.J., Kim, D.Y., Lee, I. K., Jung, W. Y., Park, D. Y., Kim, J. M., Lee, K. R., Lee, K. T., Shin, C. Y., Cheong, J. H., Ko, K. H., Ryu, J.H., (2010), The ameliorating effect of the extract of the flower of *Prunella vulgaris* var. *Lilacina* on drug-induced memory impairments in mice. *Food and Chemical Toxicology* 48, s. 1671–1676.
- Psotova, J., Chlopčikova, S., Miketova, P., Simanek, V., (2005), Cytoprotectivity of *Prunella vulgaris* on doxorubicin-treated rat cardiomyocytes. *Fitoterapia* 76, s. 556–561.
- Psotova, J., Svobodova, A., Kolarova, H., Walterova, D., (2006), Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 84, s. 167–174.
- Seçmen, Ö., (1996), Türkiye Florası. Ege Üniv. Fen Fakültesi Teksirler serisi, No: 120.
- Sudha, C.G., Krishnan, P.N., Pushpangadan, P., and Seeni, S., (2005), In Vitro Propagation of *Decalepis arayalpathra*, A Critically Endangered Ethnomedicinal Plant, *Invitro Plant*, 41(5), s. 648-654.
- Şehirali, S., Özgen, M., Karagöz, A., Sürek, M., Adak, S., Güvenç, Ğ., Tan, A., Burak, M. ve Kaymak, H., Ç., (2005), Bitki Genetik Kaynaklarının Korunma ve Kullanımı, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası VI. Teknik Kongresi, Ankara, 1, 253-273.
- Tan, A., (1996), Turkey; Country report to the FAO international technical conference on plant genetic resource. s. 5-45.
- Thorpe, T. A., (2007), History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37, s. 69-80.
- Turker, A.U., Yucesan, B., Gurel, E., (2013), Effect of Phytohormones on Micropropagation of Self-Heal (*Prunella vulgaris* L.). *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 15 (4), s. 293-302.
- Woo, H.J., Jun, D.Y., Lee, J.Y., Woo, M.H., Yang, C.H., Kim, Y.H., (2011), Apoptogenic activity of 2\_,3\_-dihydroxyurs-12-ene-28-oic acid from *Prunella vulgaris* var. *lilacina* is mediated via mitochondria-dependent activation of caspase cascade regulated by Bcl-2 in human acute leukemia Jurkat T cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 135, s. 626–635.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

Zengin, F.K., Munzuroğlu, Ö., (2004), Fasulye Fidelerindeki (*Phaseolus vulgaris* cv. Strike) Sitokinin İçeriği Üzerine Ağır Metallerin ( $Hg^{++}$ ,  $Cd^{++}$ ,  $Cu^{++}$  ve  $Pb^{++}$ ) Etkileri, Doğu Anadolu Araştırmaları (Research of Eastern Anatolia Region), 2 (2), s. 48-54.

Zhang, G., He, L., Hu, M., (2011), Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities in vitro. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, s. 18–25.

Zhang, Y., But, P. P., Ooi, V.E., Xu, H.X., Delaney, G.D., Lee, S.H., Lee, S. F., (2007), Chemical properties, mode of action, and in vivo anti-herpes activities of a lignin-carbohydrate complex from *Prunella vulgaris*. *Antiviral Research* 75 , s. 242–249.