



T.C.

**BATMAN ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

*Ajuga xylorrhiza* KİT TAN'IN *IN VITRO*  
MİKROÇOĞALTILMASINA SİTOKİNİN ve  
OKSİN KOMBİNASYONLARININ ETKİSİ

**Murat YILMAZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Ağustos-2021**  
**BATMAN**  
**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ KABUL VE ONAYI

**Murat YILMAZ** tarafından hazırlanan “*Ajuga xylorrhiza* KIT TAN’IN *IN VITRO* MİKROÇOĞALTILMASINA SİTOKİNİN ve OKSİN KOMBİNASYONLARININ ETKİSİ” adlı tez çalışması 05/08/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **BİYOLOJİ** Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

### İmza

#### Başkan

Unvanı Adı SOYADI

.....

#### Danışman

Unvanı Adı SOYADI

.....

#### Üye

Unvanı Adı SOYADI

.....

#### Üye

Unvanı Adı SOYADI

.....

#### Üye

Unvanı Adı SOYADI

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Doç. Dr. Ömer Faruk ERTUĞRUL  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## **DECLARATION PAGE**

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

MURAT YILMAZ

05.08.2021

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### *Ajuga xylorrhiza* KİT TAN'IN *IN VITRO* MİKROÇOĞALTILMASINA SİTOKİNİN ve OKSİN KOMBİNASYONLARININ ETKİSİ

Murat YILMAZ

Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Filiz AKBAŞ

2021, 63 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Çiğdem IŞIKALAN

Prof. Dr. Filiz AKBAŞ

Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Selçuk KURU

*Ajuga xylorrhiza* Kit Tan yaşam alanı belli bir bölgeyle sınırlı (Diyarbakır'ın Çermik ilçesi), nesli tükenme tehlikesi altında olan, nadir ve hassas bir bitki türüdür. Bitki doku kültürleri yöntemleri kullanılarak endemik bitki türlerinin genetik çeşitliliğinin korunması ve sürdürülebilirliği sağlanabilir. Bu nedenle tez çalışmada, koruma altında olan *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan'nın genetik çeşitliliğinin korunması ve sürdürülebilirliğinin sağlanabilmesi amacıyla, *in vitro* ortamda mikroçoğaltılmasında sitokin ve oksin kombinasyonlarının etkisi araştırıldı. Çalışmamızın birinci aşamasında; mikroçoğaltımda kullanılacak eksplantların temini için olgun tohumlar hormonsuz 1/4 MS besi ortamında çimlendirildi. 1.0-2.0 cm boyundaki *in vitro* sürgünler, kinetin'in farklı konsantrasyonları (0.125-0.25-0.5-1.0 mgL<sup>-1</sup>) ile (IAA ve NAA)'nın 3 farklı konsantrasyonunun (0.1-0.2-0.5 mgL<sup>-1</sup>) kombinasyonlarını içeren MS besi ortamında kültüre alındı. Tüm kültürlerde sürgün çoğaltımının meydana geldiği ve IAA konsantrasyonlarının NAA konsantrasyonlarından daha iyi sonuç verdiği belirlendi. Besi ortamında sitokin yanında oksin ilave edilmesinin, sürgün çoğaltımını olumlu teşvik ettiği tespit edildi. Sonuç olarak tüm uygulama grupları arasında en fazla yeni sürgün oluşumu, eksplant başına 10.91 adet sürgün ile 0.125 mgL<sup>-1</sup> Kin+ 0,1 mgL<sup>-1</sup> IAA içeren besi ortamından elde edilirken, en düşük sürgün oluşumu da eksplant başına 2.80 adet sürgün ile 0.5 mgL<sup>-1</sup> Kin+ 0.5 mgL<sup>-1</sup> NAA içeren besi ortamından elde edildi. Sürgün boyu bakımından ise en iyi sonuç 3.10 cm ile 0.5 mgL<sup>-1</sup> Kin içeren besi ortamında kültüre alınan sürgünlerden elde edildi.

*In vitro* koşullarda elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için (IAA-NAA)'nın farklı konsantrasyonlarının (0.25 – 0.5 – 1.0 – 1.5 mgL<sup>-1</sup>) bulunduğu 1/1 MS besi ortamı kullanıldı. Kontrol grubu ve 0.25 mgL<sup>-1</sup> IAA uygulama grubunda kültüre alınan eksplantlarda kök oluşumu meydana gelmediği, diğer gruplar da ise konsantrasyona bağlı olarak farklılıklar göstermekle birlikte kök oluştuğu gözlemlendi. Kullanılan NAA konsantrasyonlarının IAA konsantrasyonlarından daha iyi sonuç verdiği belirlendi. Hem kök boyu hem de kök sayısı bakımından en iyi sonuçlar sürgün başına ortalama 26,50 adet kök ve 1,51 cm ile 1,5 mgL<sup>-1</sup> NAA ile desteklenmiş besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edildi. Ayrıca, kontrol grubu dâhil olmak üzere tüm uygulama gruplarında kültüre alınan eksplantların yeni sürgünler oluşturduğu ve sağlıklı bir şekilde gelişimine devam ettiği gözlemlendi. Köklendirilen fideler, perlit-torf karışımı (1:2) bulunan saksılara aktararak toprağa adaptasyonları başarılı (%100) bir şekilde gerçekleştirildi.

**Anahtar Kelimeler:** *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan, *in vitro*, köklendirme, mikroçoğaltma, sitokin, oksin

## ABSTRACT

## MS THESIS

### EFFECT OF CYTOKININ AND AUXIN COMBINATION ON *IN VITRO* MIKROPROPAGATION OF *Ajuga xylorrhiza* KİT TAN

Murat YILMAZ

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES  
OF BATMAN UNIVERSITY  
THE DEGREE MASTER OF SCIENCE IN BIOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Filiz AKBAŞ

2021, 63 Pages

Jury

Assoc. Prof. Dr. Çiğdem İŞIKALAN

Prof. Dr. Filiz AKBAŞ

Advisor Asst. Prof. Dr. İbrahim Selçuk KURU

*Ajuga xylorrhiza* Kit Tan is a rare and sensitive plant species under the threat of extinction, whose habitat is limited to a certain region, Çermik, a district of Diyarbakır. Conservation and sustainability of the genetic diversity of endemic plant species can be achieved by using plant tissue culture methods. Thus, the present study investigates the effect of cytokinin and auxin combinations on micropropagation *in vitro* to protect and ensure the genetic diversity and sustainability of *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan, which is under protection. For this, 1.0-2.0 cm *in vitro* shoots germinated in hormone-free 1/4 MS medium from mature seeds, 4 different kinetin concentrations (0.125-0.25-0.5-1.0 mgL<sup>-1</sup>) and 2 different auxin (IAA and NAA) varieties were cultured in MS medium containing separate combinations of 3 different concentrations (0.1-0.2-0.5 mgL<sup>-1</sup>). The study revealed that shoot growth occurred in all treatments, and IAA concentrations gave better results than NAA concentrations. As a result, the most new shoot formation among all treatment groups was obtained from the medium containing 0.125 mgL<sup>-1</sup> Kin+ 0.1 mgL<sup>-1</sup> IAA with 10.91 shoots per explant and the lowest shoot formation was obtained from the medium containing 0.5 mgL<sup>-1</sup> Kin + 0.5 mgL<sup>-1</sup> NAA with 2.80 shoots per explant. The best results were obtained from 3.10 cm shoots cultured in a medium containing 0.5 mgL<sup>-1</sup> Kin in terms of shoot length.

1/1 MS medium with different concentrations of two different auxins (IAA-NAA) (0.25 – 0.5 – 1.0 – 1.5 mgL<sup>-1</sup>) was used for rooting the shoots obtained *in vitro*. It was observed that root formation did not occur in the cultured explants in the control group and 0.25 mgL<sup>-1</sup> IAA application group, but in other application groups, although there were differences depending on the concentration, root formation was observed. It was determined that NAA concentrations gave better results than IAA concentrations among the auxin varieties used. The best results in terms of both root length and root number were obtained from the explants cultured in medium supplemented with an average of 26.50 roots per shoot and 1.51 cm with 1.5 mgL<sup>-1</sup> NAA. In addition, it was observed that the explants cultured in all treatment groups, including the control group, formed new shoots and continued to develop healthily. Rooted seedlings were transferred to pots with a perlite-peat mixture (1:2), and their adaptation to the soil was successfully (100%).

**Keywords:** *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan, auxin, cytokinin, *in vitro*, micropropagation, rooting

## ÖNSÖZ

Lisansüstü çalışmalarımın ilk adımlarını attığım bu çalışma boyunca değerli bilgileriyle beni yönlendiren, her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen, öğrencisi olmaktan büyük onur ve gurur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Filiz AKBAŞ'a ayırdığı değerli vakti ve gösterdiği sabır için sonsuz şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile birçok yönden gelişimime katkıda bulunan tüm hocalarıma çok teşekkür ederim

Laboratuvar aşamalarında ve tezin hazırlanmasında, deneyimleri ile her daim yanımda olan ve desteğini her zaman hissettiğim sayın Dr. Öğr. Üyesi Pınar ORCAN hocama ve laboratuvar arkadaşım Şerife AYDINARIĞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince bilgi, deneyim ve yardımlarını esirgemeyen sevgili dostlarım İnan AY, Ferit ŞAHİN ve Mesut KİNEŞ'e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü desteği sunan, her daim yanımda olan sevgili aileme annem, babam ve kardeşlerime tüm kalbimle teşekkür ediyorum.

Özellikle o olmadan yazılamayacak olan bu tez için; hayatımın her zor aşamasında yanımda olan, var gücüyle beni her koşulda destekleyen ve güç veren, bütün olumsuz şartlarda bile beni teşvik edip cesaretlendiren, ilham kaynağım sevgili eşim Emine YILMAZ'a ayrıca huzur ve neşe kaynağım biricik kızım Gülcem'e en kalbi teşekkürlerimi sunarım.

Murat YILMAZ  
BATMAN-2021

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	viii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>6</b>
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>14</b>
3.1. Bitki Materyali .....	14
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1. <i>In vitro</i> kültür koşulları.....	16
3.2.1.1. Cam malzeme, filtre kâğıdı ve saf suyun sterilizasyonu.....	16
3.2.1.2. Metal malzemelerin sterilizasyonu.....	16
3.2.1.3. Sterilize edilmiş materyallerin korunması.....	16
3.2.1.4. Doku kültürü ve röpikaj odalarının dezenfeksiyon ve sterilizasyonu...	17
3.2.1.5. Besi ortamlarının hazırlanması ve sterilizasyonu.....	17
3.2.1.6. MS (Murashige ve Skoog) besi ortamının hazırlanması.....	19
3.3. Deneysel Çalışmaların Başlatılması .....	19
3.4. Mikroçoğaltma Çalışmaları.....	20
3.4.1. Sürgün çoğaltımı Üzerine sitokin ve oksinlerin kombine etkisi.....	20
3.5. Köklendirme Çalışmaları.....	22
3.6. Toprağa Adaptasyon.....	22
3.7. İstatistiksel Analiz.....	23
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>24</b>
4.1. ARAŞTIRMA BULGULARI	
4.1.1. Sürgün çoğaltımı üzerine 0.125 mgL <sup>-1</sup> Kin + oksinlerin etkisi.....	24
4.1.2. Sürgün çoğaltımı üzerine 0.25 mgL <sup>-1</sup> Kin + oksinlerin etkisi.....	28
4.1.3. Sürgün çoğaltımı üzerine 0.5 mgL <sup>-1</sup> Kin + oksinlerin etkisi.....	31
4.1.4. Sürgün çoğaltımı üzerine 1.0 mgL <sup>-1</sup> Kin + oksinlerin etkisi.....	34
4.1.5. Sürgünlerin köklendirilmesine farklı oksin konsantrasyonlarının etkisi...	37
4.1.6. Bitkilerin toprağa adaptasyonu (Aklimatizasyon).....	39
4.2. TARTIŞMA.....	41
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>45</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>47</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

AgNO <sub>3</sub>	:	Gümüş nitrat
BA	:	6-Benziladenin
°C	:	Derece santigrat
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	:	Kalsiyum klorür dihidrat
CaCl <sub>2</sub>	:	Kalsiyum klorür
Ca (OCl) <sub>2</sub>	:	Kalsiyum hipoklorit
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	:	Kobalt klorür hegzahidrat
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	:	Bakır sülfat pentahidrat
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	:	Demir sülfat heptahidrat
GA <sub>3</sub>	:	Giberellik asit
GA7	:	Magenta kabı
HCl	:	Hidroklorik asit
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	:	Borik asit
HgCl <sub>2</sub>	:	Civa (II) klorür
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Hidrojen peroksit
KI	:	Potasyum iyodür
KNO <sub>3</sub>	:	Potasyum nitrat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	:	Potasyum dihidrojen fosfat
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	:	Magnezium sülfat tetrahidrat
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	:	Magnezyum sülfat heptahidrat
Na <sub>2</sub> EDTA	:	Sodyum etilen daimin tetra asetik asit
NaOCl	:	Sodyum hipoklorit
NaOH	:	Sodyum hidroksit
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	:	Amonyum nitrat
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	:	Sodyum molibdat dihidrat
N6	:	Nutrient medium
pH	:	Asitlik derecesi
ppm	:	Milyonda bir birim
v/v	:	Hacim/Hacim
w/v	:	Ağırlık/Hacim
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	:	Çinko sülfat heptahidrat
2-IP	:	Dimetil allil aminopurin
2,4-D	:	2,4-diklorofenoksi asetik asit
%	:	Yüzde
°	:	Derece

### Kısaltmalar

Atm	:	Atmosfer
BAP	:	Benzil amino pürin
B5	:	Bazal 5 besi ortamı
BBD	:	Bitki büyüme düzenleyicisi
cm	:	Santimetre
da	:	Dekar
Dk	:	Dakika
GC-MS	:	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
HPLC-DAD	:	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
20-HE	:	20 hidroksekdison

IAA	:	Indol asetik asit
IBA	:	Indol-3-butirik Asit
Kin	:	Kinetin
Kg	:	Kilogram
g	:	Gram
L	:	Litre
LED	:	Light emitting diode
LS	:	Linsmainer ve Skoog Besi Ortamı
MS	:	Murashige & Skoog
mm	:	Milimetre
mM	:	Milimolar
ml	:	Mililitre
mg	:	Miligram
M	:	Molarite
nm	:	Nanometre
$\mu$ m	:	Mikrometre
NAA	:	Naftalen asetik asit
SA	:	Salisilik Asit
SOD	:	Süperoksit dismutaz
POD	:	Peroksidaz aktivitesini
TDZ	:	Thidiazuron
WFL	:	Beyaz floresan ışık
W	:	Watt

## 1. GİRİŞ

İnsanlığın var oluşundan bu yana bitkiler hayatın vazgeçilmez temel kaynaklarından biri olmuştur. İlk çağlardan bu yana insanlar bitkileri farklı amaçlarla kullanmış ve içeriğini anlamaya çalışmışlardır. İnsanların bitkileri tıbbi amaçlarla kullanımı milattan önce 3000'li yıllara kadar uzanan bir geçmişe sahiptir. Anadolu coğrafyasında yetişen tıbbi bitkiler ile ilgili bilgilerimizin kökenleri Hititler dönemine, bitkilerin tıbbi alanda ve şifahanelerde kullanılması ise Selçuklu dönemine kadar uzanır. Bitkisel kaynaklı droglar çok eski çağlardan beri hastalıkların tedavisinde kullanılırken, içeriğindeki etkin bileşikler ve etkileri XIX. yüzyılın ortalarında araştırılmaya başlanmıştır (Erdoğan, 2014).

Türkiye coğrafik konumu gereği üç flora bölgesinin karakteristik özelliğini göstermektedir. Bu bölgeler ülkenin kuzey bölgesinde bulunan Avrupa Sibiryası, doğusunda bulunan İran-Turan, güney ve batı kısmında yer alan Akdeniz flora bölgeleri olarak listelenebilir. Bu coğrafik konumundan dolayı ülkemiz, 11.707 civarında çiçekli bitki türü ile Avrupa, Kuzey Afrika ve Orta Doğu'daki ülkelerin çoğundan daha zengin bitki çeşitliliğine ev sahipliği yaparak bu alanda dünyanın önde gelen ülkeleri arasındadır (Davis 1982, Davis ve ark., 1988; Akman, 1993; Güner ve ark., 2000; Güner ve ark. 2012). 3000'e yakın endemik tür barındıran, bu zengin flora, ılıman iklime sahip ülkeler arasında, Türkiye'ye ayrı bir önem kazandırmaktadır (Yeşilyurt ve ark., 2008). Ülkemizde dört farklı iklimin ve çeşitli bitki örtülerinin varlığı, farklı ve zengin toprak türlerinin olması, ülke genelinde yükseklik farklarının fazla olması ve sahip olunan sucul ortamların çeşitlilikleri bu durumun temel sebepleri olarak sıralanabilir (Kaya ve Aksakal, 2005).

Endemik türlerin bulunduğu familyalar arasında bulunan Lamiaceae familyası, hemen hemen tüm iklim türleri ve bitki örtülerinde varlığını devam ettirebilme, ayrıca farklı yüksekliklerde de yetişebilme kabiliyetine sahiptir ve bu familyanın üyelerini dünyanın her yerinde görmek mümkündür. Lamiaceae familyasının üyeleri dünyada en çok ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz ikliminin etkin olduğu kuşakta varlığını devam ettirmektedir (Watson ve Dallwitz 1978, Morgaris ve ark. 1982, Davis 1988). Tropikal yağmur ormanlarında yayılış gösteren birkaç cinsi dışında, Lamiaceae familyası üyeleri genel olarak açık arazi bitkileri olup, bu alanlarda yayılış gösterirler.

Lamiaceae familyasında bulunan bitkilerin taşıdıkları salgı tüyleri ve güzel kokular yayan bileşikler barındırmaları en önemli özellikleridir (Metcalf ve Chalk

1972, Başer 1994, Korosou 1997). Bu özelliklerinden dolayı tıp ve parfümeri alanlarında sahip oldukları uçucu yağlardan oldukça fazla faydalanılmaktadır.

Lamiaceae familyası üyelerinin birçoğu evlerde veya bahçelerde hoş görüntüleriyle dış mekân ve iç mekân bitkisi olarak veya gıda sanayinde yemeklere tat ve aroma katmaya yönelik kullanılmak üzere kültüre alınmaktadır. Bu yönüyle istifade edilen cins ılıman iklime sahip coğrafyalarda yetiştirilmektedir. Bu bölgelerde yetiştirilen cinslerin en yaygın olanları *Ajuga*, *Stachys*, *Nepeta*, *Origanum* *Mentha*, *Monarda*, *Phlomis*, *Salvia* ve *Thymus*'tur (Haşimi, 2012).

Lamiaceae familyasının değerli üyelerinden olan *Ajuga* cinsinin Güney Amerika dışındaki kıtalara yayılmış 300'den fazla türü bilinmektedir (İsraili ve Lyoussi, 2009). Ülkemizde bu bitki türü 23 takson (12 tür, 9 alttür, 2 varyete) ile temsil edilir (Duman, 2000; Bakış ve ark., 2011, Güner ve ark., 2012; Haşimi, 2012). *Ajuga* cinsi üyeleri çoğunlukla tek yıllık, nadiren odunsu çok yıllık çalı formundaki bitkilerin oluşturduğu salgı yapabilecek dokulara sahip hoş kokulu bitkilerdir (Anonim 2013).

Geçmişten günümüze kadar *Ajuga* cinsi üyeleri, alternatif tıp ve farklı birçok amaç için kullanılmıştır. *Ajuga* bitkisinin tıbbi alanda kullanımı üzerine yaptıkları çalışmada İsraili ve Lyoussi (2009); birçok *Ajuga* türünün dizanteri, malarya, gastroinstestinal, helmantik, diüretik, yüksek tansiyon, iltihap önleyici ve antifungal olmak üzere birçok hastalığa karşı kullanıldığı sonucuna varmışlardır. Yine aynı çalışmada; *Ajuga* cinsinin içerdiği bileşiklerin, farmakolojik ve tıbbi açıdan geniş bir biyolojik spektruma sahip olduğu belirtilmiştir. Bu bileşiklerin biyolojik, farmakolojik ve tedavi edici özellikleri (anabolik, analjezik, antibakteriyel, antiöstrojenik, anti-fungal, anti-enflamatuvar, anti-hipertensif, anti-lösemik, antimalarial, antimikobakteriyel (gram+ basil), antioksidan, antipiretik (ateş düşürücü), kardiyotonik, sitotoksik, hipoglisemik, damar rahatlatan, pestisit ve insektisit) bulunmaktadır. Misico ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada; Wittanolidlerin bronşiyal astıma, enfeksiyon, kanser ve otoimmün hastalıklara karşı tedavide etkili olduğu kanıtlanmıştır. Günümüzde halen Asya, Afrika, Çin gibi bazı ülkelerde halk arasında haricen lapa halinde yara iyileştirici olarak, ateş düşürücü, amenore, sıtma, gut ve diş ağrısı gibi rahatsızlıklarda kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra zehirli hayvan sokmalarında (yılan, akrep) panzehir olarak kullanımında da büyük bir üne sahiptir (Baytop, 1984). Bu özellikleriyle *Ajuga*'nın tıbbi ve ekonomik açıdan önemli bir cins olduğu ifade edilmiştir.

*Ajuga* cinsinin sahip olduğu ikincil metabolit içeriğiyle ilgili çok sayıda araştırma yapılmış ve fitoekdisteroidler, neo-klerodan-diterpenler, triterpenler, steroller,

antosiyanidin-glikozitleri, iridoid glikozitleri, vithanolidler, flavonoidler, trigliseridler, uçucu yağlar, fitosteroid, diterpen gibi bileşikler izole edilerek tıp ve farmakoloji başta olmak üzere bir çok alanda kullanıma sunulmuştur (Kökdil ve ark., 2002; Castro ve ark., 2008; Israili ve Lyoussi., 2009; Haşimi, 2012).

*Ajuga* cinsinin bazı türleri ile yapılan çalışmalarda; Başer ve ark. (2001), *Ajuga bombycina*'nın uçucu yağlarını; Hemcinschi ve ark. (2009), *Ajuga genevensis* ve *Ajuga reptans*'ın histo-anatomik özellikleri ve bileşiklerinin bazı anatomik ve kimyasal karakterlerini; Ghita ve ark. (2011), *Ajuga reptans* ve *Ajuga genevensis*'in fitokimyasal özelliklerini incelemişlerdir.

İnsanların direkt veya dolaylı yollarla sebep olduğu doğa tahribatı endemik bitki çeşitliliğini giderek artan miktarlarda tehdit etmeye başlamış ve bazı bitki türleri ortadan kaybolmuş bazılarıysa endemik bir tür haline gelmiştir. Erdoğan'a (2010) göre endemik türler, kendi yaşam alanlarına özgü, hassas, nadir bulunabilen ve korunma altına alınması gereken türlerdir. Ülkemizde, güncellenen IUCN (International Union for Conservation of Nature and Naturel Resources) Kırmızı Listesi'ne göre yaklaşık 165 tür, "soyu tamamen tehlike altında" türler olarak sınıflandırılmıştır (IUCN, 2020). Bitkiler, biyoteknoloji, farmakoloji, gıda, kozmetik vb. alanlarda kullanılan biyolojik aktif maddeler için kullanışlı kaynaklardır. Bitki kaynaklı maddeler, görünür yan etkileri olmayan birçok hastalığın veya rahatsızlığın önlenmesi ve tedavisi için gereklidir. Günümüzde, bitki kaynaklı maddelere olan talep de çok yüksektir (Hellwig ve ark., 2004, Darbinian-Sarkissian ve ark., 2006; Sarfaraj ve ark., 2012, Petrosyan ve ark., 2015). Bununla birlikte, kimyasal bileşim karmaşıklığı, düşük verim, sekonder metabolitlerdeki yüksek saflık talebi nedeniyle, bitkilerin bilinçsiz toplanması gibi etmenlerden dolayı hali hazırda bir çok endemik tür yok olma tehlikesiyle karşı karşıyadır (Abdin ve ark., 2003; Smetanska, 2008). Geleneksel yetiştirme yöntemleri ile karşılaştırıldığında, bitki hücre kültürleri, sınırlı zaman ve mekanda değerli metabolitlerin biyosentezi için umut verici bir platform olarak ortaya çıkmıştır (Yang ve Stockigt., 2010).

Bitki hücre kültürleri, yabani olarak yetişen bitki kaynaklarının azalması nedeniyle biyolojik olarak aktif maddeler elde etmek için alternatif bir yöntem teşkil eder. Bitki hücre kültürü sistemleri, mikrobiyal hücreler tarafından üretilmeyen veya biyokimyasal yönlendirmeler yoluyla elde edilemeyen değerli tıbbi bileşiklerin, tatlar, kokular ve renklendiricilerin potansiyel yenilenebilir kaynaklarının oluşumunu sağlar (Newman ve Cragg, 2007).

*In vitro* mikroçoğaltım yöntemleri kullanılarak değerli metabolitlerin elde edilmesi ile ilgili çalışmalar, son yıllarda bilimsel ve ticari alanda yapılan araştırmaların ilgi odağı olmaya başlamıştır. İklim, büyüme koşulları ve coğrafi konum gibi faktörler, bitkilerin çoğu için geleneksel yöntemlerle sekonder metabolit elde edilmesinde bazı dezavantajların oluşumunu sağlar. Sekonder metabolitlerin, geleneksel ve doğal yollarla elde edilmesinde karşılaşılabilecek bu dezavantajların ve sorunların ortadan kaldırılmasında *in vitro* kültür yöntemleri farklı bir alternatif oluşturmaktadır. Bu alternatifler sayesinde, öncelikle üretilen birçok bitkinin tekrar doğaya kazandırılması, sonrasında da farklı çoğaltım yöntemleri kullanmak sureti ile daha az bir maliyetle üretimin artırılması amaçlanır (Güven ve Gürsul, 2014 ).

Bitki, hücre ve dokularının *in vitro* koşullarda yönlendirilmesi olarak tanımlanan bitki doku kültürü, bitki biyoteknolojisinin önemli bir alanıdır. Steril koşullar sağlamak kaydı ile hazırlanmış besi yerlerinde kültüre alınan dokulardan, hücrelerden veya tek bir hücreden bile tam bir bitkiyi *in vitro* mikroçoğaltım yöntemlerini kullanarak ortaya çıkarmak mümkündür. Her bir hücrenin tam bir bitki meydana getirme potansiyeline sahip olması sadece bitki hücrelerine özgü olup totipotensi özelliği olarak adlandırılmaktadır. Bu özellik bakımından bitki hücreleri eşsizdir (Stewart, 2012). Bitki doku kültürü tekniği birbirinin aynı genetik karakterlerini taşıyan bitkilerin daha kısa sürede, daha az materyal ile mekândan tasarruf edilerek binlercesinin üretilmesine olanak sağlar (Özen ve Onay, 2013). Bu yöntemlerin kullanılmasıyla ihtiyaç duyulan bitki türleri çoğaltılabilir, endemik türlerin varlığını sürdürmesi sağlanabilir. Virüs taşımayan bitkiler elde etmek için ise meristem kültürü kullanılarak değerli bitkisel gen kaynakları muhafaza edilebilir veya bitki hücre kültürlerinden farklı ikincil metabolitler elde edilebilir (Babaoğlu ve ark., 2002).

Nesli tükenmekte olan bitkilerin korunmasında ve doğal yollarla üretilmesi zor olan bitkilerin çoğaltılmasında, ayrıca yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerin farklı varyasyonlarını meydana çıkarmak, bitki doku kültürünün temel hedefleri içerisinde yer almaktadır (Babaoğlu ve ark., 2002; Özen ve Onay, 2013). Ülkemizde bazı endemik veya nesli tükenmekte olan bitki türlerinin korunmasında *in vitro* çoğaltma teknikleri uygulanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Dayan 2006; Ayan ve Çırak 2006; Cenkçi ve ark. 2009; Hasançebi ve ark.2011; Oruç ve ark. 2012). Ancak endemik türlerin varlığının korunması, artırılması ve sürdürülebilirliği adına yapılan çalışmalar yetersiz görülmektedir.

Ajuga cinsi üyelerinin tıbbi ve ekonomik önemi göz önüne alındığında, özellikle endemik türlerin korunması ve sürdürülebilir kullanımı konusunda yeni metod ve yöntemler uygulanmalıdır. Bu bağlamda Kaul ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada şifalı bir bitki olan *Ajuga bracteosa*'nın genetik transformasyonu ve korunması adına, yaprak, yaprak sapı ve kök eksplantlarını  $2 \text{ mgL}^{-1}$  IAA ve  $5 \text{ mgL}^{-1}$  BA ile desteklenen MS besi ortamında kültüre alarak, *in vitro* mikro çoğaltma potansiyelini araştırmışlardır. Ayrıca Jan ve ark. (2014), *Ajuga bracteosa* Wall ex. Benth'in kallus indüksiyonu ve çoklu sürgün rejenerasyonu için verimli ve hızlı bir *in vitro* protokol oluşturmuşlardır. Araştırmacılar, kallus indüksiyonunu; yaprak, yaprak sapı ve internodal kesimlerden elde etmişlerdir. Sivanesan ve ark. (2016) ise yaptıkları çalışmada *Ajuga multiflora*'nın sürgün ucu eksplantlarından çoğaltılan sürgünler üzerinde, bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisini incelemişlerdir.

Endemik türlerin varlığının korunması ve artırılmasına yönelik kullanılacak bütün çoğaltma tekniklerine ve yeni teknikler elde etmek için yapılan çalışmalara gerekli önemin verilmesi günümüz koşullarında bir zorunluluk haline gelmiştir. Bu yöntemler kullanarak endemik bitki türlerinin genetik çeşitliliğinin korunması ve sürdürülebilirliği sağlanabilir. Bu tez çalışmasında araştırma materyali olarak kullanılan *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan bitkisinin yaşam alanları belli bir bölgeyle sınırlı olup nadir ve hassas bir bitki türüdür. Bu tür, bütün dünya üzerinde bilinen tek bir bölgede Diyarbakır'ın Çermik ilçesinde yetişmekte ve nesli tükenme tehlikesi altındadır (Davis, 1988). Bununla birlikte yapılan literatür taramasında *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan ile ilgili çok sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır (Işıksalan ve ark., 2020). Literatürdeki bu eksiklik tespit edilerek, tıbbi öneme sahip, endemik ve koruma altında olan *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan'nın genetik çeşitliliğinin korunması ve sürdürülebilirliğinin sağlanabilmesi için, *in vitro* ortamda mikroçoğaltılmasına sitokinin ve oksin kombinasyonlarının etkisi araştırılmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Biyoteknolojideki ilerlemeler nadir bulunan bitkilerin çoğaltımını elde etmek açısından oldukça önemlidir. *In vitro* doku kültürü teknikleri, endemik ve tehlike altındaki bitki türlerinin kalıtsal materyallerin korumak, istenildiğinde yeniden doğaya kazandırılmak üzere bitkisel materyal bulunmasına olanak sağlamak gibi bir çok avantaj sunduğundan son yıllarda oldukça yaygınlaşmıştır (Sarasan ve ark., 2006; Cenkçi ve ark., 2009).

Lamiaceae familyasının bir üyesi olan, sahip olduğu tıbbi ve farmakolojik özelliklerinin yanı sıra süs bitkisi olarak da yaygın kullanılmasından dolayı her geçen gün talebin arttığı *Ajuga* bitkisinin geleneksel yöntemlerle çoğaltılması, zayıf tohum yapısından dolayı oldukça zordur. Bu nedenle etkin mikroçoğaltım yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Park ve ark., 2017). Yapılan literatür taramasında çalışmada bitki materyali olarak kullanılan *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan bitkisinin mikroçoğaltılmasına dair çok fazla çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu tezin literatür ve kaynak taraması bölümünde genel olarak *Ajuga* bitkisi ile ilgili yapılan *in vitro* çalışmalar listelenmektedir.

Lineberg ve Wanstreet (1983), *Ajuga reptans*'ın *in vitro* çoğaltımı üzerine yaptıkları araştırmada Bitki Büyüme Düzenleyicileri'nin rolünü incelemişlerdir. Araştırmacılar çalışmada,  $2.5 \text{ mgL}^{-1}$  BA ve  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  NAA bulunduran MS besi ortamından her sürgün için 47.6 sürgün meydana geldiği sonucuna varmışlardır.

Preece ve Huetteman (1994), *Ajuga reptans*'ın mikroçoğaltım aşamalarını, sitokinin konsantrasyonunun etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmada, aksiler sürgünlerin BA konsantrasyonuna bakılmaksızın meydana geldiğini gözlemlemiş ve orta büyüklükteki eksplantların daha fazla kallus oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Kuria ve ark. (2002), *Ajuga remota*, Kenya'da sıtma tedavisi için en sık kullanılan ve alternatif tıpta en çok reçete edilen şifalı bitkidir. Bu çalışmalarında Kuria ve arkadaşları, bilinen iki izolatu olan ajugarin-1 ve ergosterol-5,8-endoperoksit ve yeni bir izolat 8-O-asetilharpagide'nin *in vitro* olarak antiplasmodial aktiviteleri açısından değerlendirmişlerdir. Ajugarin-1, Plasmodium falciparum'un klorokin duyarlı suşuna karşı orta derecede aktif olduğu belirtilmiştir.

Fekete ve ark. (2004), dört *Ajuga* türünden (*Ajuga reptans*, *Ajuga bracteosa*, *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber ve *Ajuga genevensis* L.) suda çözünür ekstraktların, iki exopterygota (emici böcek) türünün embriyonik gelişimi üzerindeki etkinliğini incelemişler. 60 metanol + 40 su fraksiyonunun tamamı test böceklerine karşı etkili

olduğu, ancak test türlerine ve uygulanan konsantrasyona göre farklı sonuçlar gösterdiği belirtilmiştir.

Cheng ve ark. (2008), *Ajuga turkestanica*'nın metabolizmayı artıran fitoekdisteroidlerinin birikimini artırmak için *in vitro* koşullarda kültüre almış ve besi ortamında fitoekdisteroid öncüleri (asetat, mevalonik asit kolesterol) veya metil jasmonat (bir elisitör) ilave etmişlerdir. Çalışmada hücre süspansiyon kültürlerinde, 20-hidroksiekdison (20E) içeriği, istenmeyen kültürlerle kıyasla sırasıyla 125 veya 250  $\mu\text{M}$  metil jasmonat ilavesiyle 2 - 3 kat arttığı belirtilmiştir.

Gautam ve ark. (2011), Lamiaceae familyasının şifalı bir bitkisi olan *Ajuga bracteosa* Wall Ex Benth.'in, ayurveda, romatizma, gut, felç ve amenore tedavisi gibi birçok hastalık için tanımlanmış olduğunu bildirmişlerdir. *Ajuga bracteosa*'nın antiinflamatuvar aktivitesini incelemek, olası etki mekanizmasını anlamak ve aktivitesinden sorumlu bileşenlerini belirlemek için yapılan çalışma da *Ajuga bracteosa*'nın %70 etanol özütünün, muhtemelen COX-1 ve COX-2 enzimlerinin inhibisyonu aracılığıyla gerçekleşen, umut verici antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Sivanesan ve ark (2011), *Ajuga multiflora bunge*'nin yaprak ve yaprak sapı eksplantlarından itibaren sürgün rejenerasyonu üzerinde sitokininlerin etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında sürgünlerin MS ortamına transferini takip eden 2 hafta içinde sürgün büyümesi ve kök başlangıcı gözlemlendiğini rapor etmiş ve kök indüksiyon sıklığının, sürgün başına ortalama 8.2 kök sayısı ile %100 oranında olduğunu vurgulamışlardır.

Haşimi (2012), yaptığı çalışmada lokal endemik türler olan, *Ajuga vestita* BOISS ve *Ajuga xylorrhiza* KİT TAN bitkilerine ait petrol eteri, aseton ve metanol ekstraktlarının antimikrobiyal, antioksidan, antikolinesteraz, mutajenik ve antimutajenik aktivitelerini araştırmıştır. Bitkilerden elde edilen özlerin antimikrobiyal etki gösterdiği, ayrıca toplam flavonoid ve toplam fenolik miktarları tayin edildikten sonra yüksek oranda antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Ellman yöntemi kullanılarak antikolinesteraz aktivite araştırmacı tarafından belirlenmiştir ve her iki bitki türünden elde edilen ekstraktların antikolinesteraz aktivitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir.

Kaul ve ark. (2013) tıbbi bir bitki olan *Ajuga bracteosa*'nın genetik transformasyonu ve korunması adına, yaprak, yaprak sapı ve kök eksplantlarını IAA (2  $\text{mgL}^{-1}$ ) ve BA (5  $\text{mgL}^{-1}$ ) ile desteklenen MS besi ortamında kültüre alarak, *in vitro* mikro çoğaltma potansiyelini araştırmışlardır. Araştırmacılar, bitkinin tıbbi amaçlı

çoğaltılmasına yönelik yapmış oldukları çalışmada IAA ( $2 \text{ mgL}^{-1}$ ) ve BA ( $5 \text{ mgL}^{-1}$ ) ile desteklenmiş MS ortamında ortalama 41.4 ile %100 sürgün yenilenmesi sağlandığını ve kültür başına 8.4 cm'lik sürgünler elde edildiği sonucuna varmışlardır. Aynı çalışmada MS + IBA'ya ( $0.5 \text{ mgL}^{-1}$ ) aktarıldığında *in vitro* sürgünler kesilerek, tüm kültürlerde 20.2 cm ortalama uzunlukta 20 kök / sürgün üretildiği bildirilmiştir.

Jan ve ark. (2014) tıbbi önemi olan *Ajuga bracteosa* Wall ex. Benth'in farklı eksplantlarını kullanmışlardır. Kallus indüksiyonu ve çoklu sürgün rejenerasyonu için, hızlı ve verimli bir *in vitro* protokol oluşturmuşlardır. Bu çalışmada kallus indüksiyonu yaprak, yaprak sapı ve internodal kesimler gibi, farklı eksplantlardan elde edilmiştir. Maksimum kallus oluşumunun yaprak eksplantlarında  $5.0 \text{ mgL}^{-1}$  BAP, petiyol eksplantlarında  $2.0 \text{ mgL}^{-1}$  BAP+ $3.0 \text{ mgL}^{-1}$  IAA ve internodal eksplantlarda  $2.0 \text{ mgL}^{-1}$  BAP+ $5.0 \text{ mgL}^{-1}$  NAA içeren MS besi ortamlarında oluştuğunu bildirmişlerdir. Araştırmada çoklu sürgün oluşumu için, farklı eksplantlardan elde ettikleri kallusu, farklı konsantrasyonlarda oksin (IAA, NAA) ve sitokinin (BAP, Kinetin) ile takviye edilmiş MS besi ortamında elde ettiklerini ayrıca  $5.0 \text{ mgL}^{-1}$  BAP ile desteklenmiş MS besi ortamında maksimum sürgün elde ettiklerini açıklamışlardır.

Kayani ve ark. (2014), Coğrafya ve habitatın, bir bitkinin metabolizması ve morfolojisinde önemli bir rol oynadığından yola çıkarak, yapmış oldukları çalışmayla fitocoğrafya, mevsim ve doku tipinin *Ajuga bracteosa*'nın morfolojisi ve 20-HE (20 hidrokseksidron) içeriği üzerindeki etkisinin değerlendirilmesini amaçlamışlardır. Sonuçlar, *Ajuga bracteosa*'nın çeşitli ekotiplerinde büyük morfolojik farklılıklar ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, fitocoğrafyalarına bakılmaksızın aynı yükseklikteki bitkilerin benzer morfolojiyi temsil ettiği bildirilmiştir. Araştırmacılar düşük sıcaklığın 20-HE içeriği üzerindeki etkisini doğrulamak için, *Ajuga bracteosa*'yı farklı sıcaklık rejiminde *in vitro* olarak kültüre almışlardır. Bu sonuçlara dayanarak, soğğun vejetatif büyümeyi engellediğini ve bir savunma tepkisi olarak stresin indüklediği 20-HE birikimini tetiklediğini varsaymışlardır.

Sivanesan ve Jeong (2014), yaptıkları çalışmada, silisyum (Si) konsantrasyonunun sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkisini ve *Ajuga multiflora*'nın tuzluluk toleransını araştırmışlardır. Sonuç olarak, Si'nin kültür ortamına eklenmesi, antioksidan enzimlerin aktivitesini değiştirerek *Ajuga multiflora*'nın sürgün rejenerasyonuna teşvik ettiğini gözlemlemişler. NaCl'nin dâhil edilmesi sürgün rejenerasyonunu ve *A. multiflora* büyümesini önemli ölçüde azaltmış. Si'nin NaCl içeren kültürlere eklenmesi, antioksidan enzimlerin aktivitesini değiştirerek, stomaların

ultra yapısını koruyarak, yapraklardaki NaCl birikimini sınırlandırıp, *Ajuga multiflora*'nın büyümesini ve kök uzunluğunu önemli ölçüde arttırdığını belirtmişlerdir.

Akbaş ve ark. (2015), BAP ve Kinetinin *Ajuga vestita* BOISS'in mikroçoğaltılması üzerine etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında, olgun tohumların sırasıyla %70 etil alkol içinde 30 saniye, %5 NaOCl çözeltisi içinde de 15 dakika bekletmiş ve çatlatılan steril tohumları *in vitro* ortamda  $30 \text{ gL}^{-1}$  sükröz ile desteklenmiş  $\frac{1}{4}$  MS ortamında çimlendirmişlerdir. Bu şekilde elde edilen sürgünleri farklı BAP ve Kin'in farklı konsantrasyonlarını içeren ortamda kültüre alarak sitokinlerin *in vitro* mikroçoğaltım üzerindeki etkisi test edilmiştir. Çalışmanın sonucunda sitokin konsantrasyonu azaldığında her iki hormon türünde de sürgün sayısının arttığı sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda test edilen tüm hormon konsantrasyonlarında, sürgün oluşumu için en iyi sonuç  $0,125 \text{ mgL}^{-1}$  Kin içeren ortamda gözlenmiştir.

Kayani ve ark. (2016) *Ajuga bracteosa*'nın  $0.45\text{-}3.6 \text{ mgL}^{-1}$  BA değerindeki MS besi ortamında büyük oranda sürgün elde edildiğini vurgulamış ve bu sürgünlerin %100 oranda köklendiği sonucunu rapor etmişlerdir.

Sahakyan ve ark (2016), *Ajuga genevensis* L.'nin *in vitro* kültürde kimyasal etkileşimi ve biyolojik aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışmalarında,  $0.2 \text{ mgL}^{-1}$  Kin ve  $2 \text{ mgL}^{-1}$  IAA  $2 \text{ mgL}^{-1}$  glisin eklenmiş MS besi ortamında, yaprak ve kök eksplantlarından yüksek büyüme aktivitesi ve rejenerasyon kabiliyetine sahip *Ajuga genevensis* kültürü (kallus) elde edildiğini belirtmişlerdir. Elde ettikleri kallusların biyolojik aktivite ve kimyasal içerik açısından incelenmesi sonucunda kallus dokusunun doğal bitki türlerinden daha fazla antioksidan taşıdıkları sonucuna varmışlardır.

Sivanesan ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada *Ajuga multiflora*'nın sürgün ucu eksplantlarından çoğaltılan sürgünler üzerinde, bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisini incelemişlerdir. Maksimum sürgün sayısını (17.1),  $8 \text{ }\mu\text{M}$  BA ve  $2.7 \text{ }\mu\text{M}$  NAA ile güçlendirilmiş MS kültür ortamında elde etmişlerdir. Eksplant başına ortalama sürgün sayısının, yarı katı ortama kıyasla sıvı ortamda 1.6 kat arttığı belirtilmiştir. MS besi ortamında sürgün başına ortalama 7,2 kök oluşumu ile (% 100) köklenme elde edildiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar köklendirilmiş bitkileri, serada %100 hayatta kalma oranıyla başarılı bir şekilde toprağa aktarmışlardır. Serada yetiştirilen bitkilerin maksimum seviyede yağ asidi, tokoferol ve karotenoid içeriklerinin *in vitro* olarak MS besi ortamında kültüre alınmış filizlerin yapraklarından elde edildiği sonuç olarak bildirilmiştir.

Kokab ve ark. (2017), *Ajuga bracteosa*'nın antioksidan potansiyelini, *in vitro* ortamda antidiyabetik ve antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır. Fitokimyasal analiz, fenoller, flavonoidler, tanenler, saponinler, kininler, terpenoidler, ksantoproteinler, glikozitler, karbonhidratlar, steroidler, fitosteroller ve amino asitlerin varlığını göstermiştir. Kloroform ve n-hekzan ekstraktları sırasıyla 29.92  $\mu\text{g} / \text{ml}$  ve 131.7  $\mu\text{g} / \text{ml}$  IC50 değerleri ile önemli enzim inhibisyon potansiyeli gösterdiği belirtilmiştir. Sulu zt, *E. coli*, *S. typhimurium*, *E. amnigenus*, *S. pyogenes* ve *S. aureus*'un maksimum inhibisyonunu sırasıyla (18.0  $\pm$  1.0 mm, 12.5  $\pm$  0.7 mm, 17.0  $\pm$  0.0 mm, 11.0  $\pm$  0.0 mm ve 15.3  $\pm$  2.0 mm), göstermişler. Bu alışma ayrıca *Ajuga bracteosa* kökünün n-hekzan, kloroform, etil asetat ve sulu ekstraktlarının  $\alpha$ -glukozidaz inhibitör aktivitelere sahip olduğunu ve bu nedenle postprandiyal hipergliseminin tedavisinde hipoglisemik ajanlar olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Saeed ve ark. (2017), tıbbi değerleri yüksek ve nesli tükenmek üzere olan *Ajuga brakteosa* Wall ex'in gelişmemiş kök süspansiyon kültürlerinde biyokütle birikimi, sekonder metabolit üretimi ve antioksidan potansiyeli üzerine metiljasmonat (Me-Ja) ve fenil asetik asit (PAA) gibi önemli iki elisitrn etkilerini araştırmışlardır. Elde ettikleri verilere göre; biyokütle birikiminde önemli bir artış olduğu ve kontrol ile karşılaştırıldığında elisitör işlemlerine yanıt olarak kültür büyümesinin daha uzun log evreleri sergilediğini belirtmişlerdir. Ayrıca, *A. bracteosa*'nın kök süspansiyon kültürlerinde toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik ve antioksidan aktivitede elisitrlerin indüklediği artışı gözlemlenmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar adventif köklerin oluşması, adventif köklerde biyokütlenin ve metabolit içeriğinin arttırılması adına yeni bir protokol oluşturduklarını rapor etmişlerdir.

Ali ve ark. (2018), Thidiazuron (TDZ)'un, *Ajuga brakteosa*'da sürgün morfogenezi, antioksidan sistemi ve uçucu organik bileşiklerin biyosentezi üzerindeki etkilerini *in vitro* olarak test etmişlerdir. Tek başına tidiazuron, 1.2 ppm (TDZ) ile desteklenmiş MS ortamında yetiştirilen gövde eksplantlarında en yüksek sürgün indüksiyonunu (% 88) teşvik ederek, eksplantlarda doğrudan kök morfogenezi için en iyi büyüme düzenleyicisi olarak etki göstermiştir. TDZ'nin düşük dozlarda kullanılması (0.5 ppm) sonucu sürgünlerin 5.8 cm uzaması ve en fazla 18 adet sürgün oluşturduğu sonuçlarına ulaşmışlardır. En yüksek toplam fenolik (TPC; 4.5 mgGAE/gDW) ve flavonoid içeriğini (TFC; 3.5mgQE/gDW), 1.2 ppm TDZ+2.0 ppm BAP hormon kombinasyonunu içeren MS besi ortamında kültüre alınmış sürgünlerden elde etmişlerdir. *In vitro* hücre kültürlerinden elde edilmiş sürgünlerde, GC-MS (Gaz

kromatografisi-kütle spektrometresi) ile yapılan analizler 34 uçucu bileşiğin biyosentezini göstermiştir. Bunlardan en önemli olan bileşikler arasında,  $\alpha$ -pinen (% 5,3), kamfen (% 4,45), limonen (% 3,4), 1,8 – sineol (% 14,3) olmak üzere önemli miktarlarda biyoaktif monoterpen hidrokarbon üretiminin olduğu, ayrıca thujone (% 9,4) ve kafur (% 12,2), borneol (% 11,4) ve nerol (% 9,2) gibi oksinlenmiş monoterpenler olduğu sonucuna varmışlardır.

Jan ve ark. (2018), *Ajuga bracteosa*'nın mikroçoğaltma protokolü geliştirmek için yaprak sapı ve internod eksplantlarından kallus kültürlerini kullanmışlardır. Oksin ve sitokinin içeren farklı konsantrasyondaki MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan oluşan kallusların, farklı BBD içeren MS ortamında alt kültürlere alarak sürgün rejenerasyonu sağlamışlardır. Petiyol eksplantlarında maksimum sürgün sayısını  $3 \text{ mgL}^{-1}$  BAP içeren (%80) MS besi ortamında, internod eksplantında ise  $2 \text{ mgL}^{-1}$  BAP ve  $5 \text{ mgL}^{-1}$  NAA içeren MS besi ortamında (%100) sağlandığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar oluşan sürgünlerin  $2 \text{ mgL}^{-1}$  IAA ile desteklenmiş MS besi ortamında köklendirme işleminin ardından, doğal yaşam alanlarına aktarılması için sera ortamında yaklaşık bir ay bekletilmiş ve başarılı bir şekilde doğaya aktarıldığı rapor edilmiştir.

Jeong ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada ışık kalitesi ve sükröz konsantrasyonunun *Ajuga multiflora*'nın *in vitro* sürgün kültürlerindeki sürgün rejenerasyonu ve biyoaktif bileşik içerikleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. WFL ( beyaz floresan ışık) altında %2 sükröz ile desteklenen ortamda yaprak başına maksimum filiz tomurcuğu (34.8) elde edildiği bildirilmiştir. Kırmızı ışık yayan LED (light emitting diode) diyotlar altındaki ortamda, eksplant başına ortalama 13.7 adet sürgün ve 6.4 cm sürgün boyu elde etmişlerdir. Toplam karotenoidlerin maksimum içeriği, WFL altında %3 sükröz ile desteklenen MS besi ortamında kültüre alınan sürgünlerden elde edilirken, minimum içerik ise, mavi LED altında %1 sükröz ile desteklenen MS besi ortamında kültüre alınan sürgünlerden elde etmişler. Ayrıca tokoferol içeriğine bakıldığında; en yüksek tokoferol içeriği, WFL altında %3 sükröz ile MS ortamında kültüre alınmış sürgünlerden elde edilirken, en düşük tokoferol içeriği, kırmızı LED altında %1 sükröz içeren MS ortamında kültüre alınmış sürgünlerden elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Rukh ve ark. (2018), ışığın çeşitli tıbbi bitkilerde morfojenik yanıtlarda ve biyoaktif bileşiklerin üretiminde rol oynayan ana faktör veya uyaranlardan biri olduğu düşüncesi ile *Ajuga bracteosa*'nın embriyonik olmayan kallus kültürlerinden somatik embriyoların indüksiyonunda renkli ışıkların özelliklerini araştırmışlardır. Yapılan

araştırmalar sonucunda mavi, yeşil ve kırmızı ışıkların somatik embriyolarda fenolik ve flavonoid üretimini, polifenolik içeriği ve toplam polifenolik üretimini de artırdığı araştırmacılar tarafından gözlemlenmiştir. Kallus kültürlerinin renkli ışıklara maruz kalması, nesli tükenmekte olan *Ajuga bracteosa* türlerinin korunması ve biyoaktif bileşiklerinin artırılması için etkili ve ümit verici bir *in vitro* teknik sağladığı sonucuna varmışlardır.

Akbaş ve ark. (2019) *in vitro* koşullar altında *Ajuga vestita* Boiss'in çimlenme protokolünün optimizasyonunu yaptıkları çalışmalarında, 30 g sükröz ile desteklenmiş ¼ MS besiyeri ve ışık ortamında en yüksek çimlenme oranını elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Çalışmada elde edilen sürgünlerin 0.125 mgL<sup>-1</sup> Kin içeren 1/1 MS besi ortamında alt kültüre alınarak mikroçoğaltımlarının gerçekleştirildiği ve %80 başarıyla toprağa aktarıldığı vurgulanmıştır.

Ali ve ark. (2019), farklı spektral ışıklar altındaki *Ajuga brakteosa*'nın adventif kök kültürlerinde,  $\alpha$ -naftalen asetik asidin (NAA) büyüme, sekonder metabolizma ve fenolik asit miktarı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Farklı spektral ışıklar arasında, en yüksek adventif kök indüksiyon frekansı (% 88) ve biyokütle oluşumu (72 g/L FW ve 22 g/L DW), sarı ışık altında 1.5 mgL<sup>-1</sup> NAA varlığında inkübe edilen eksplantlardan elde edildiği bildirilmiştir. maksimum polifenol (TPC; 44.2 mg) ve flavonoid (TFC; 2.51 mg) üretiminin mavi ışık varlığında büyütölen adventif kök kültürlerinde kaydedildiğini rapor etmişlerdir. Mavi spektral ışığın, adventif kök kültürlerinde sırasıyla maksimum süperoksit dismutaz (SOD; 2.5 nM) ve peroksidaz aktivitesini (POD; 0.85 nM) indüklediği, kırmızı ışığın ise, adventif kök kültürlerinin antioksidan potansiyelini önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir.

Haider Abbasi ve ark. (2020) yılında *Ajuga integrifolia*'nın çoklu sürgün kültüründe gelişmiş fitokimyasal ve biyolojik aktiviteler için salisilik asit (SA) ve gibberellik asit (GA) gibi bitki sinyal moleküllerinin eksojen rolünü araştırmışlardır. Pakistan bölgesinde bu bitkinin fitokimyasallarının, hafif diş ağrısından sıtmaya ve iltihaplı hastalıklara kadar çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanıldığı bilinmektedir. Sürgünler çeşitli SA ve GA konsantrasyonlarına maruz bırakılarak, veriler 21 gün sonra toplanmıştır. SA ve kontrole kıyasla GA'ya (5.0 mgL<sup>-1</sup>) yanıt olarak biyokütlede önemli artış (kuru ağırlık (DW): 17.9 g / L) gözlenmiş. Sonuçlar, salisilik asidin sürgün kültürlerinde fitokimyasal üretimi artırdığını, ancak gibberellik asidin biyosentezini düşürdüğünü göstermiştir. Buna karşın *in vitro* ortamda SA (150  $\mu$ M) muamelesi altında antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteler önemli ölçüde artmıştır, bu

da fitokimyasal biyosentez ve ilgili biyolojik aktivitelerinde doğrudan bir korelasyon olduğunu düşündürmüştür.

Işıkalan ve ark. (2020), *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan bitkisinin *in vitro* çoğaltılmasında sitokinin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada sürgünler, çeşitli konsantrasyonlarda BAP, TDZ ve Kin ile desteklenen MS bazal ortamında kültüre alınmış ve optimal sürgün oluşumu 0.125 mg L<sup>-1</sup> BAP (eksplant başına 7.91 sürgün) ve 0.25 mg L<sup>-1</sup> Kin (eksplant başına 4.9 sürgün) içeren ortamlardan elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu (3,43 ila 3,63 cm) açısından en iyi sonuç ise Kinetin içeren besi ortamlarından elde edilmiştir. Köklendirme için, rejenere sürgünler 0 (kontrol), 0.5 veya 1.0 mg L<sup>-1</sup>'de iki farklı IAA ve NAA konsantrasyonu içeren 1/4 kuvvetli MS ortamına aktarılmıştır. Araştırmacılar, sürgün başına kök sayısı açısından en iyi sonuçların, 0.5 mg L<sup>-1</sup> IAA (eksplant başına 3.10 kök) ile desteklenen ortamdan elde edildiğini bildirmişlerdir.

Bazı *Ajuga* türleri ile ilgili yapılan *in vitro* mikroçoğaltma çalışmaları mevcuttur (Sivanesan ve ark. 2011; Kaul ve ark. 2013; Sivanesan ve Park 2015; Akbaş ve ark. 2015). Bununla birlikte, endemik *Ajuga xylorrhiza* ile ilgili ise mevcut bilgiler çok sınırlı sayıdadır (Haşimi, 2012; Işıkalan ve ark., 2020). Bu amaçla, tez çalışmasında tıbbi öneme sahip *Ajuga* cinsine ait, endemik ve koruma altında olan *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan'nın *in vitro* ortamda mikroçoğaltılmasına Kin ve IAA-NAA kombinasyonlarının etkisi araştırılmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Bitki Materyali

Bu araştırmada kullanılan bitki materyali yerel endemik bir tür olan *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan'nın olgun tohumları kullanılmış olup, bitkinin tohumları Diyarbakır Doğa Koruma ve Milli Parklar il müdürlüğünden temin edilmiştir (**Şekil 3.1.**). Deneysel çalışmalarımız Batman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araştırma Laboratuvarında gerçekteştirilmiştir.

**Alem** Plantae (Bitkiler)

**Altalem** Tracheobionta (Damarlı Bitkiler)

**Üstbölüm** Spermatophyta (Tohumlu Bitkiler)

**Bölüm** Magnoliophyta (Kapalı Tohumlular)

**Sınıf** Magnoliopsida (Çift Çenekliler)

**Altsınıf** Asteridae

**Takım** Lamiales

**Aile** Lamiaceae (Ballıbagiller)

**Cins** *Ajuga* (Mayasilotu)

**Tür** *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan (Kabamayası)

*Ajuga* cinsi üyeleri çoğunlukla tek yıllık, nadiren odunsu çok yıllık çalı formundaki bitkilerin oluşturduğu salgı yapabilecek dokulara sahip hoş kokulu bitkilerdir. Genel olarak gövde köşesiz veya 4 köşeden oluşmuş, Parçalı veya bölünmüş, bazen tüysüz basit yapraklara sahiptirler. Gövde yanlarında yaprakçıklar bulunmaz genel olarak yapraklar karşılıklı çapraz dizilmişlerdir. Dişli ya da üç dişliye kadar değişen tam kenarlı gövde yapraklarına sahiptirler. Çiçeklenme yapısı çoğunlukla yaprak tabanının geniş kısımlarından deste halinde başaklar oluşturmuştur. Bu bitkilerin üreme kısımları (çiçek) erseliktir. Çanak yapraklar 5 kısımdan oluşmakta olup; üst labia 3 dişten, alt labia 2 dişten oluşmuştur. Bitkinin renkli kısmını oluşturan taç yaprakları genellikle üstte 2 loblu galea, altta 3 loblu labellum olmak üzere iki kısımdan oluşmuştur. İki uzun ikisi kısa (Didinam) olmak üzere 4 adet erkek organları bulunur. Yumurtalık 2 tohum zarflı (karpel) 4 tohum taslağına sahip ve kısımlara ayrılmıştır. Tohumu fındığa benzer bir yapı oluşturur (Anonim 2013).



**Şekil 3.1.** *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan'nın doğal yaşam alanındaki genel görünümü

*Ajuga* cinsinin Güney Amerika hariç birçok kıtaya yayılmış 300'ün üzerinde farklı türü bulunduğu bilinmektedir (Israili ve Lyoussi 2009). Anadolu topraklarında yetişen 13 mayasıl bitkisi türünden altı tanesi endemik olarak varlığını sürdürmekte (Güner ve ark., 2012). *Ajuga* cinsleri arasında tek yıllık veya çok yıllık otsu veya odunsu bitki türleri mevcuttur. *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan sadece Güney Doğu Anadolu bölgesinde, Diyarbakır ilinin Kuzeybatısında, Çermik İlçesi sınırları içerisinde yer alan doğal, yerel endemik bir türdür (Davis ve ark. 1988). *Ajuga xylorrhiza*'nın yaprakları yelpaze şeklinde, çiçekleri beyaz renkli dikotil (çok yıllık) bitkilerdir. 3 ile 7 cm arasında değişen genişliğe sahip kökleri sayesinde kaya çatlaklarına yerleşebilir. Gövde kısmı çiçekli veya bazı zamanlar üreyemeyecek şekilde çiçeksiz olabilir. Genel olarak genç bitkilerin gövde yapıları çoğalma aşamasında olmayabilir. Dallanmalar çoğunlukla yalın, gövde ve lamina kısımları fazla sayıda narin dikey yumuşak tüylere sahiptir. Laminanın her iki yüzeyi de aynı şekilde tüyleri taşır. Çanak yapraklar yaklaşık olarak 7 mm uzunluğunda çan şeklinde ve dardır. Yüzeyi yoğun tüylerle kaplıdır. Taç yapraklar yaklaşık olarak 20 mm uzunluğunda tomurcuk iken ara ara pembe, çoğunlukla beyaz renklidir (Davis, 1988).

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. *In vitro* kültür koşulları**

#### **3.2.1.1. Cam malzeme, filtre kâğıdı ve saf suyun sterilizasyonu**

Mikroçoğaltım araştırmalarında kullanılacak erlenmayer ve beher gibi cam malzemeler fırça kullanılarak temizlendikten sonra, sıcak suya tutuldu. Daha sonra 3 tekrardan oluşmak kaydıyla saf suyla durulandı. 3 saat boyunca 180 °C sıcaklıkta etüvde bekletilen malzemelerin sterilizasyon aşaması tamamlandı. Balon joje, mezür ve pipetlerin sterilizasyonu aynı işlemlerin tekrar edilmesiyle başladı. Öncelik olarak yumuşak bir sünger veya fırça yardımıyla temizlendi. Daha sonra sıcak suyla yıkandı ve 3 defa saf suyla durulandı. Sonrasında 80 °C sıcaklıkta 3 saat boyunca etüvde sterilizasyona bırakıldı. Bitki kültürü sürecinde kullanılan Magenta GA-7 kaplarının sterilizasyon işlemi öncesinde yumuşak bir sünger yardımıyla temizlendikten sonra, 3 defa sıcak sudan geçirildi, daha sonra 3 defa saf sudan geçirilerek durulandı. Magenta kapları kurduktan sonra alüminyum folyolara iki kat olacak şekilde sarıldı ve 121 °C' de 1 atmosfer basınç altında 25 dakika otoklavda steril edildi. Deneilerin her kademesinde kullanılan filtre kâğıtları öncelikle uygun boyutlarda kesildi. Daha sonrasında iki kat yağlı kâğıtla sarılıp 180 °C sıcaklıkta 2 saat boyunca etüve alındı, bitki besi kültürlerinin hazırlanmasında kullanılan saf suyun yine etüvde 180 °C 3 saat bekletilmesiyle steril edildiler.

#### **3.2.1.2. Metal malzemelerin sterilizasyonu**

Araştırmada kullanılacak bitkilerin uygun şekillerde hazırlanması, ayrıştırılması ve kültür kaplarına aktarılması adına kullanılan bistüri ucu ve pens gibi materyallerin sterilizasyonu için öncelikle %96'lık etanol ile temizlenip daha sonra folyoya sarılarak 300 °C'de kuru hava sterilizatörüne yarım saat bırakılarak sterilizasyonu gerçekleştirilir.

#### **3.2.1.3. Sterilize edilmiş materyallerin korunması**

Buradaki başlıca gaye, sterilizasyonu gerçekleştirilmiş materyallerin steril durumunun korunmasıdır. Steril edilmiş ve henüz sterilizasyonu gerçekleşmemiş malzemeler ayrı dolaplarda muhafaza edilmelidir. Sterilize edilmiş malzemeler dezenfeksiyonu yapılmış olan dolaplarda saklandı. Cam malzemelerin ağızları bir pamuk yardımıyla veya folyo yardımıyla kapatıldı. Sterilizasyonu yapılmış Magenta GA-7 kaplarının kapakları kapalı tutuldu.

#### **3.2.1.4. Doku kültürü ve röpikaj odalarının dezenfeksiyon ve sterilizasyonu**

Bu bölümde bitki doku kültürleri kontaminasyondan uzak bir şekilde izole edilerek besi yerine aktarılır. Olası bulaşma etkilerini en aza indirmek için laminar akımlı steril edilmiş kabinler kullanılır. Çalışmalar başlamadan 24 saat öncesinde çalışılacak bölümünün zemin, duvar, kapı, dolap ve masaların yüzeyleri genel olarak hazırlanan sodyum hipoklorit (NaOCI) kullanılarak (1/100'lük, 1L suya 10 cc NaOCI) dezenfekte edildi. Daha sonrasında bitki materyallerinin aktarımının gerçekleşeceği laminar akımlı (inkübatör) kabin, kullanılacak masa, dolap ve çalışma alanı, daha steril bir çalışma alanı sağlamak adına %70'lik alkol çözeltisi yardımıyla temizlendi. Ortalama 3 saat açık bırakılan ultraviyole ışığı sayesinde çalışma alanının sterilizasyon aşamaları tamamlanmış oldu.

İnkübasyon (yetiştirme) odası; yetiştirilecek materyallerin ihtiyacına göre hava, sıcaklık, ışık ve karanlığın ayarlanabildiği özel tasarlanmış odalardır. Civalı Floresan lambalar (400 w, MBFR/U, Thorn)  $30-60 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetine sahiptirler. Ayrıca yetiştirme odasında sıcaklığı  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklıkta sabit tutmayı sağlayan bir sıcaklık kontrol ünitesi mevcuttur. Yetiştirme odasının fotoperiyot süresi 8 saat karanlığa karşılık 16 saat aydınlık olacak şekilde ayarlandı (3000-5000 lüks).

#### **3.2.1.5. Besi ortamlarının hazırlanması ve sterilizasyonu**

Bu çalışmada, uygulamaların hepsinde besi yeri olarak kullanılan Murashige ve Skoog (Murashige ve Skoog, 1962-MS) temel kültür ortamının stok çözeltiler kullanılarak hazırlanması ve bitki büyüme düzenleyicilerinin oranlarını gösteren tablolar verilmiştir (**Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2.**).

**Çizelge 3.1.** MS besin kültüründe kullanılan stok çözeltiler ve miktarları

<b>MS Ana Çözelti (Makro Elementler)</b>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16.5 g		
KNO <sub>3</sub>	19.0 g		
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4.4 g		
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.7 g		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7 g		
Distile Su	1000 ml'ye tamamlanır.		
<b>MS Ana Çözeltisi (Mikro Elementler-1)</b>			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620 mg		
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	1690 mg		
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	860 mg		
KI	83 mg		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	25 mg		
Distile su ile	100 ml'ye tamamlanır		
<b>MS Ana Çözeltisi (Mikro Elementler-2)</b>			
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	25 mg		
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	25 mg		
Distile su	100 ml'ye tamamlanır		
<b>Vitamin Karışımı Ana Çözeltisi</b>		<b>Kompleks Kelatör Ana Çözeltisi</b>	
Nikotinic asit	50 mg	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.725 g
Glisin	200 mg	Na <sub>2</sub> EDTA	2.785 g
Pridoksin HCl	50 mg	Distile su	1000 ml'ye tamamlanır
Tiamin HCl	10 mg	<b>B1 Vitamini Ana Çözeltisi (10<sup>-3</sup>)</b>	
Distile su	100 ml'ye tamamlanır	Tiamin HCl	100 mg
		Distile su	100 ml'ye tamamlanır

**Çizelge 3.2.** Besi ortamına eklenen BBD'lerin oranları ve hazırlanışı

<b>BAP Ana Çözeltisi (10<sup>-3</sup>)</b>		<b>Kinetin Ana Çözeltisi (10<sup>-3</sup>)</b>	
6-Benzilaminopurin	100 mg	Kinetin(6furfuroaminopurin)	100 mg
1N HCl	3-5 cc	Distile su ile	100ml'ye tamamlanır
Distile su	100ml'ye tamamlanır		
<b>NAA Ana Çözeltisi (10<sup>-3</sup>)</b>		<b>IAA Ana Çözeltisi (10<sup>-3</sup>)</b>	
α-Naftalen asetik asit (NAA)	100 mg	Indolasetikasit (IAA)	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	3-5 cc	% 95 lik Etil Alkol	5-10 cc
Distile su	100ml'ye tamamlanır	Distile su	100ml'ye tamamlanır

### 3.2.1.6. MS (Murashige ve Skoog) besi ortamının hazırlanması

Deneylerde kullanılan MS besi ortamı için öncelikle 1 litrelik erlenmayer kullanılarak, içerisine 250 ml sterilizasyonu yapılmış saf su eklendi. Bu sayede karışıma katılacak olan maddelerin daha kolay bir şekilde çözülmesi sağlandı. Daha sonra aşağıda belirtilen tablodaki mevcut stok çözeltiler sırasıyla (sakkaroz, ana solüsyon, MS-1, MS-2, kompleks kelatör, vitamin karışımı, B1 vitamini) erlenmayer içerisindeki saf suya dahil edildi (**Çizelge 3.3.**). Karışıma dâhil edilen her bir madde için çözeltiler daha iyi karışabilsin diye bir müddet çalkalandı. Son olarak araştırılacak olan bitki materyallerine uygun bitki büyüme düzenleyicilerinin eklenmesi sağlandı (**Şekil 3.2.**).

Agar (5.6 g) ilavesinden önce, çözeltilerin tamamı 1 litre olacak şekilde distile su eklendi. Besi ortamının pH'sı tampon çözeltiler sayesinde 5.7 olacak şekilde ayarlanarak, 121 °C 1 atmosfer basınç altında 25 dakika boyunca otoklav'da sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha önce sterilizasyonu yapılmış olan Magenta GA-7 kaplarından yeteri miktarda alınarak, laminar akımlı hava kabinlerinde, sterilizasyonu yapılmış besi kültürü her bir kaba ortalama 55 ml olacak şekilde aktarıldı. Magenta GA-7 kaplarındaki besi ortamının laminar akımlı hava kabinlerinde steril bir şekilde katılması beklenildi.

**Çizelge 3.3.** Besi ortamının standart içeriği (Murashige ve Skoog, 1962)

Sakkaroz	30 g
MS Ana Çözeltisi (Makro Elementler)	100 ml
MS Mikro Elementler-1	10 ml
MS Mikro Elementler-2	1 ml
Kompleks Kelatör	10 ml
Vitamin Karışımı	1 ml
B1 Vitamini Ana Çözeltisi	1 ml
Distile Su	1000 ml'ye tamamlanır
Agar	5.6 g

### 3.3. Deneysel Çalışmaların Başlatılması

*Ajuga xylorrhiza* Kit Tan'nın olgun tohumlarının öncelikle *in vitro* olarak çimlendirilmesi sağlandı. Bunun için olgun tohumlar musluk suyunda iyice yıkandıktan sonra 30 saniye boyunca %70'lik alkolde bekletilerek ön sterilizasyona tabi tutuldu. Daha sonra tohumlar % 5'lik NaOCI solüsyonunda 15 dakika bekletildi ve çıkarılarak 5 dakika süreyle 5 tekrar olmak üzere distile su ile çalkalanarak üzerindeki NaOCI kalıntılarının arındırılarak sterilizasyon işlemi tamamlandı. Tohumların çimlenmesi ve büyümesi için MS besi ortamı 30 g/L sakkaroz, 5.6 gr agar ile desteklendi. Agar

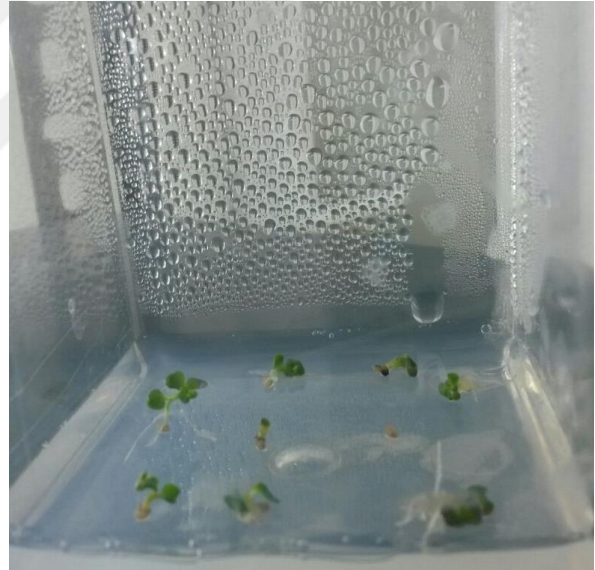
ilavesinden önce besi ortamının pH'sı 5.7 olacak şekilde ayarlanarak 1 atmosfer basınçta 121 °C de 25 dakika süre ile otoklavda sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Steril tohumlar testası çatlatılmış olarak, 1/4 hormonsuz MS besi ortamını içeren Magenta GA-7 kaplarında kültüre alınarak, büyüme odasında (büyüme odasının sıcaklığı 25±2 °C, ışık periyodu 16 saat aydınlık 8 saat karanlık; 3000-5000 lüx) çimlenmeye bırakıldı.

### 3.4. Mikroçoğaltma Çalışmaları

*In vitro* ortamda çimlendirilen *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan'ın olgun tohumları, mikroçoğaltma çalışmalarında başlangıç materyali olarak kullanılmak amacıyla 30 g/L sakkaroz ve 5.6 g agar ile desteklenmiş MS besi ortamında yeni sürgünler elde edebilmek adına kültüre alındı (**Şekil 3.3**). *In vitro* ortamda yetiştirilen sürgünlerin mikroçoğaltımına oksinlerin (IAA-indol asetik asit ve NAA- naftalen asetik asit) ve bir sitokin olan kinetin'in etkisi kontrol grubu ile birlikte araştırıldı.



Şekil 3.2. Kültür besi ortamlarının hazırlanması

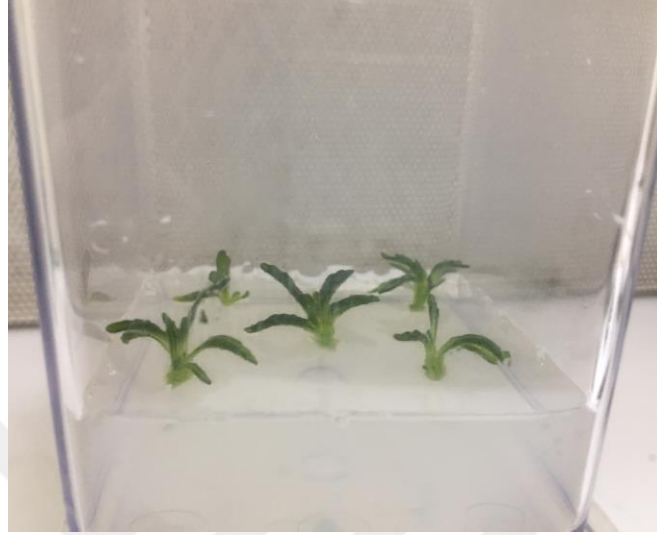


Şekil 3.3. *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan tohumlarının çimlendirilmesi

#### 3.4.1. Sürgün çoğaltımı üzerine sitokin ve oksinlerin kombine etkisi

*In vitro* ortamda elde edilen sürgünler steril kabinde inkübe edilmeden önce MS besi ortamı, 30 g/L sakkaroz ve besi ortamının katılması için daha önce belirlenen 5.6 g/L oranında agar ile desteklenerek steril bir şekilde hazırlandı. İnkübasyon odasında, sterilizasyonu gerçekleştirilen kurutma kâğıtları, pens, bistüri ve Magenta GA-7 kültür kapları hazır bulunduruldu. *In vitro* sürgünler temizlendi, sürgün başına 2-4 ya da daha

fazla yaprak içeren, ortalama 1-2 cm boyundaki sağlıklı sürgünler ayıklandı daha sonra aşağıdaki hormon kombinasyonlarını içeren magenta kültür kaplarına uygun şartlar ve steril ortamda aktarıldı (**Şekil 3.4**).



**Şekil 3.4.** *In vitro* ortama aktarılan sürgünlerin çoğaltımı

Mikroçoğaltım ve köklendirme aşamalarında kullanılan kombinasyonlar aşağıda belirtilmiştir.

- Kontrol grubu 0.125 – 0.25 – 0.5 – 1.0 mgL<sup>-1</sup> Kin (Kinetin)
- 1. Grup: (0.1 IAA-0.2 IAA-0.5 IAA / 0.1 NAA-0.2 NAA-0.5 NAA) + 0.125 Kin mgL<sup>-1</sup>
- 2. Grup: (0.1 IAA-0.2 IAA-0.5 IAA / 0.1 NAA-0.2 NAA-0.5 NAA) + 0.25 Kin mgL<sup>-1</sup>
- 3. Grup: (0.1 IAA-0.2 IAA-0.5 IAA / 0.1 NAA-0.2 NAA-0.5 NAA) + 0.5 Kin mgL<sup>-1</sup>
- 4. Grup: (0.1 IAA-0.2 IAA-0.5 IAA / 0.1 NAA-0.2 NAA-0.5 NAA) + 1.0 Kin mgL<sup>-1</sup>

Besi ortamına aktarılmış sürgünler büyüme odasına (büyüme odasının sıcaklığı 25±2 °C, ışık periyodu 16 saat aydınlık 8 saat karanlık; 3000-5000 lüx) gelişmesi için bırakıldı (**Şekil 3.5**). Yaklaşık olarak 28-30 günlük kültür süresi ardından elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.



**Şekil 3.5.** *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan sürgünlerinin *in vitro* ortamda büyüme odasında gelişmeye bırakılması

### 3.5. Köklendirme Çalışmaları

Alt kültürlerden alınmış olan sürgünlerin, *in vitro* kültür ortamında IAA (0,25 - 0,5 - 1,0 - 1,5) ve NAA'nın (0,25 - 0,5 - 1,0 - 1,5) farklı konsantrasyonları kullanılarak bir kontrol grubu ile birlikte kök oluşturma kapasitesi değerlendirildi. Daha öncesinde de belirtildiği gibi alt kültürlerden elde edilen en az 1-2 cm boyunda ya da daha uzun olabilecek ancak sağlıklı sürgünler steril bir ortamda tek tek besi ortamı ve agar jelinden arındırıldı. Daha sonra IAA ve NAA'nın farklı konsantrasyonlarını içeren ve 30 g/L sakkaroz ve 5.6 g agar ile takviye edilen 1/1 MS besi ortamı, Magenta GA-7 kaplarına taksim edilip steril ortamda katılaştırıldı. Hazırlanan besi ortamlarına kontrol (hormonsuz) da dâhil olmak üzere sürgünler tek tek aktarıldı. Besi ortamına aktarılan yeni sürgünler büyüme odasında gelişmeye bırakıldı ve haftalık gözlemler yapıldı. Dört hafta sonunda alınan veriler istatistiksel analizlerle değerlendirildi.

### 3.6. Toprağa Adaptasyon

*In vitro* koşullarda yetiştirilen sürgünler yaklaşık dört haftalık kültür süresi sonunda, kültür kaplarından çıkarılarak değerlendirmeye tabi tutuldu. Sürgünlerin arasından sürgün boyu, sürgün sayısı ve özellikle köklenme açısından sağlıklı olanlar seçildi. Seçilen sürgünler musluk suyu altında 5-10 dk boyunca dikkatli bir şekilde yıkanarak jelözünden arındırıldı ve perlit-torf karışımı (1:2) saksılara aktarıldı. Her bir sürgüne can suyu verildikten sonra, saksıların üzeri şeffaf bir poşet ile kapatıldı. Ayrıca poşetlerin üzerinden kürdan vasıtasıyla bitkilerin hava almasını kolaylaştıracak delikler

açıldı. Yapılan işlemler ardından saksılar büyüme odasında gelişmeye bırakıldı (**Şekil 3.6.** ).



**Şekil 3.6.** Saksılara aktarılmış *Ajuga xylorrhiza* Kin Tan fidelerinin büyüme odasında gelişmeye bırakılması

### 3.7. İstatistiksel Analiz

Yaklaşık olarak 28-30 günlük kültür süresi ardından örneklerden elde edilen verilerin analizi SPSS 20.0 (veri analiz programı) kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel verilerin karşılaştırılmalarında, farklılıkların önem derecesini ortaya koymak için O.W.A (One Way Anova) tek yönlü varyans analizinin, Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Elde edilen alt kültürler, farklı oksin ve sitokin kombinasyonları kullanılarak her bir kültür kabı en az 3 en fazla 5 eksplant kullanılarak, 3-5 kültür ortamına inkübasyonu sağlandı. Örnek materyallerden her bir parametre için ortalama  $n=12-15$  sürgün olmak kaydıyla (sürgün boyu, sürgün sayısı, kök boyu, kök sayısı) alınan veriler ve sonuçlar istatistiksel olarak SPSS 20.0 programında değerlendirildi.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Araştırma Bulguları

#### 4.1.1. Sürgün çoğaltımı üzerine 0.125 mgL<sup>-1</sup> kin + oksinlerin etkisi

*Ajuga xylorrhiza* Kit Tan'ın olgun tohumlarından itibaren *in vitro* koşullarda elde edilen sürgünlerin mikroçoğaltımı üzerine 0.125 mgL<sup>-1</sup> Kin ile oksinlerin (IAA-NAA) farklı konsantrasyonlarının (0.1-0.2-0.5 mgL<sup>-1</sup>) etkisi bir kontrol grubu ile birlikte araştırıldı ve elde edilen veriler **Çizelge 4.1.** de sunuldu.

**Çizelge 4.1.** *In vitro* sürgünlerin mikroçoğaltımı üzerine sitokin (Kin) ve oksin (IAA-NAA) konsantrasyonlarının etkisi

BBD	Konsantrasyon (mgL <sup>-1</sup> )	Sürgün boyu ± Ortalama Standart Sapma*	Sürgün sayısı ± Ortalama Standart Sapma*	Kök boyu ± Ortalama Standart Sapma*	Kök sayısı ± Ortalama Standart Sapma*
Kontrol	0.125 Kin	2.03±0.15 <sup>b</sup>	3.58±0.65 <sup>d</sup>	-	-
Kinetin+	0.125 Kin+ 0.1 IAA	2.95±0.13 <sup>a</sup>	10.91±0.79 <sup>a</sup>	2.83±0.44 <sup>a</sup>	2.00±0.57 <sup>c</sup>
IAA	0.125 Kin+ 0.2 IAA	2.96±0.07 <sup>a</sup>	8.07±1.04 <sup>b</sup>	1.83±0.33 <sup>ab</sup>	2.33±0.88 <sup>c</sup>
	0.125 Kin+ 0.5 IAA	2.76±0.12 <sup>a</sup>	5.16±0.47 <sup>cd</sup>	2.54±0.22 <sup>a</sup>	21.58±5.56 <sup>b</sup>
Kinetin+	0.125 Kin+ 0.1 NAA	2.71±0.12 <sup>a</sup>	7.00±0.67 <sup>bc</sup>	1.25±0.43 <sup>b</sup>	1.75±0.47 <sup>c</sup>
NAA	0.125 Kin+ 0.2 NAA	2.74±0.16 <sup>a</sup>	7.16±0.73 <sup>bc</sup>	2.07±0.28 <sup>ab</sup>	26.90±5.48 <sup>ab</sup>
	0.125 Kin+ 0.5 NAA	2.10±0.10 <sup>b</sup>	5.00±0.49 <sup>cd</sup>	2.45±0.26 <sup>a</sup>	40.00±0.00 <sup>a</sup>

\*Aynı sütunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ( $p \leq 0.05$ ).

\*Rakamlar 4 haftalık kültür periyodu sonunda 15 materyalin ortalamasını göstermektedir.

Dört haftalık kültür periyodu sonunda, test edilen Kin ve oksin parametrelerinde, sürgün boyu bakımından sonuçların kontrol grubundan farklı olduğu (0.125 mgL<sup>-1</sup> Kin+ 0.5 mgL<sup>-1</sup> NAA kombinasyonu hariç) ve bu farklılığın istatistiki açıdan da anlamlı olduğu görüldü. Genel olarak besi ortamında kullanılan oksin çeşitleri içerisinde IAA konsantrasyonlarının NAA konsantrasyonlarından daha iyi sonuç verdiği belirlendi (**Şekil 4.1.**, **Şekil 4.2.**, **Şekil 4.3.**, **Şekil 4.4.** ve **Şekil 4.5.**). Test edilen tüm uygulamalar içerisinde, sürgün boyu bakımından en iyi sonuç 2.96 cm ile 0.125 Kin+ 0.2 mgL<sup>-1</sup> IAA grubunda kültüre alınan sürgünlerden elde edildi.

Sürgün sayısı bakımından değerlendirildiğinde, yeni sürgün oluşumunun uygulama gruplarına göre değiştiği ve test edilen oksin konsantrasyonlarının kontrol grubundan genel olarak anlamlı farklılık gösterdiği belirlendi. Sürgün boyunda olduğu gibi sürgün sayısında da IAA konsantrasyonlarının NAA konsantrasyonlarından daha iyi sonuç verdiği ve bu sonucun **Çizelge 4.1.** görüldüğü gibi genel açıdan da anlamlı olduğu tespit edildi. Test edilen IAA konsantrasyonları kendi aralarında değerlendirildiğinde, her üç uygulamanın birbirlerinden farklı sonuçlar verdiği ve bu

farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Buna karşın NAA konsantrasyonlarının ise, IAA'nın tersine birbirlerine yakın değerler verdiği ve istatistiksel olarak anlamlı farklılıklara sahip olmadığı gözlemlendi. Ancak besi ortamına bırakılan oksin konsantrasyonu arttıkça sürgün sayısının azalarak kontrole yakın sonuçlar verdiği (her iki oksin çeşidinin  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  konsantrasyonu) ve bu sonuçların istatistiksel olarak da benzer olduğu saptandı. Sonuç olarak elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde, sürgün çoğaltımı için besi ortamına  $0.125 \text{ mgL}^{-1}$  Kin'e ilaveten mutlaka düşük konsantrasyonda ( $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  ve  $0.2 \text{ mgL}^{-1}$ ) bir oksin bırakılması gerektiği belirlendi. Ayrıca tüm uygulama grupları arasında en fazla yeni sürgün oluşumuna, eksplant başına 10.91 adet sürgün ile  $0.125 \text{ Kin} + 0.1 \text{ IAA mgL}^{-1}$  besi yerinden elde edildi.

Kök boyu bakımından veriler değerlendirildiğinde, kontrol grubunda herhangi bir kök oluşumu meydana gelmediği gözlemlenmiştir (**Çizelge 4.1.**). Bununla birlikte kontrol dışındaki tüm konsantrasyonlarda kök oluştuğu,  $0.125 \text{ Kin} + 0.1 \text{ mgL}^{-1} \text{ IAA}$ – $0.125 \text{ Kin} + 0.5 \text{ mgL}^{-1} \text{ IAA}$ – $0.125 \text{ Kin} + 0.5 \text{ mgL}^{-1} \text{ NAA}$  uygulama gruplarının diğer gruplardan genel anlamda farklılık gösterdiği ve kök uzunluğu bakımından daha iyi sonuçlar verdiği belirlendi. Aynı zamanda  $0.125 \text{ Kin} + 0.2 \text{ mgL}^{-1} \text{ IAA}$  ve  $0.125 \text{ Kin} + 0.2 \text{ mgL}^{-1} \text{ NAA}$  oksin konsantrasyonlarının istatistiksel olarak birbirlerine yakın sonuçlar oluşturduğu ve buradan besi ortamına ilave edilen oksin çeşidinden ziyade konsantrasyonunun kök boyu için daha önemli olduğu sonucuna varıldı. **Çizelge 4.1.**'de görüldüğü gibi, NAA'nın kullanıldığı besi ortamlarında, sürgünlerin kök uzunluklarında düzenli bir artışın meydana geldiği, ancak bu durumun IAA uygulamalarında söz konusu olmadığı tespit edildi. Sonuç olarak test edilen tüm uygulamalar içerisinde en iyi kök uzunluğu 2.83 cm ile  $0.125 \text{ Kin} + 0.1 \text{ mgL}^{-1} \text{ IAA}$  uygulama grubunda kültüre alınan sürgünlerden elde edildi.

Kök boyunda olduğu gibi kök sayısı açısından değerlendirildiğinde, aynı şekilde kontrol grubu dışında tüm uygulama gruplarında kök oluşumu meydana geldiği gözlemlendi.  $0.1 \text{ mgL}^{-1} \text{ IAA}$ ,  $0.2 \text{ mgL}^{-1} \text{ IAA}$  ve  $0.1 \text{ mgL}^{-1} \text{ NAA}$  dışında kalan bütün oksin konsantrasyonlarının yüksek oranlarda kök oluşturduğu ve istatistiksel farklılıklar ortaya koyduğu gözlemlendi. Kültür besi ortamında kullanılan oksin çeşitleri karşılaştırıldığında, NAA uygulama gruplarının konsantrasyonlarının IAA gruplarına oranla daha iyi sonuçlara yol açtığı gözlemlendi. Bununla birlikte her iki oksin çeşidinde de konsantrasyon artışı ile birlikte kök gelişiminin de düzenli olarak arttığı tespit edildi. Sonuç olarak, test edilen oksin parametreleri arasında,  $0.125 \text{ Kin} + 0.5 \text{ mgL}^{-1} \text{ NAA}$

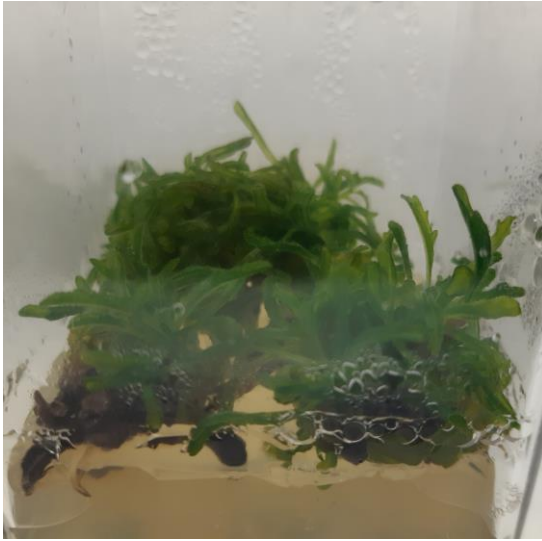
uygulama grubunda sürgün başına ortalama 40 adet kök oluşturarak en iyi sonucu verdiği belirlendi (**Çizelge 4.1.**).

Oluşan sürgünlerin morfolojik gelişimlerine bakıldığında, kültüre alınan eksplantlardan genel olarak sürgün oluşumunda sağlıklı bir gelişim gözlemlendi. Ancak oluşan sürgünlerin çoğunun taban kısmında kallus oluşumu tespit edildi. Bununla birlikte  $0.125 \text{ Kin} + 0.2 \text{ mgL}^{-1} \text{ NAA}$  besi ortamında kültüre alınan sürgünlerin yapraklarında kısmen vitrifikasyon (şeffaflaşma) oluşumu görüldü.





**Şekil 4.1.** 0.125 mgL<sup>-1</sup> Kin (kontrol) uygulamasında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler



**Şekil 4.2.** 0.125 Kin+ 0.1 mgL<sup>-1</sup> IAA besli ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler



**Şekil 4.3.** 0.125 Kin+ 0.2 mgL<sup>-1</sup> IAA besli ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler



**Şekil 4.4.** 0.125 Kin+0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA besli ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler



**Şekil 4.5.** 0.125 Kin+0.5 mgL<sup>-1</sup> NAA besli ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler

#### 4.1.2. Sürgün çoğaltımı üzerine 0.25 mgL<sup>-1</sup> Kin + oksinlerin etkisi

*Ajuga xylorrhiza* Kit Tan'ın olgun tohumlarından itibaren *in vitro* koşullarda elde edilen sürgünlerin mikroçoğaltımı üzerine 0.25 mgL<sup>-1</sup> Kin ile IAA ve NAA'nın farklı konsantrasyonlarının (0.1 - 0.2 - 0.5 mgL<sup>-1</sup>) etkisi bir kontrol grubu ile birlikte araştırıldı. Dört haftalık kültür periyodu sonunda elde edilen veriler **Çizelge 4.2.** de sunuldu.

**Çizelge 4.2.** *In vitro* sürgünlerin mikroçoğaltımı üzerine sitokin (Kin) ve oksin (IAA-NAA) konsantrasyonlarının etkisi

BBD	Konsantrasyon (mgL <sup>-1</sup> )	Sürgün boyu ± Ortalama Standart Sapma*	Sürgün sayısı ± Ortalama Standart Sapma*	Kök boyu ± Ortalama Standart Sapma*	Kök sayısı ± Ortalama Standart Sapma*
Kontrol	0.25 Kin	2.25±0.16 <sup>bc</sup>	8.00±1.19 <sup>a</sup>	-	-
Kinetin+ IAA	0.25 Kin+ 0.1 IAA	2.27±0.11 <sup>bc</sup>	8.25±0.72 <sup>a</sup>	-	-
	0.25 Kin+ 0.2 IAA	1.21±0.22 <sup>d</sup>	3.25±0.70 <sup>c</sup>	-	-
	0.25 Kin+ 0.5 IAA	2.62±0.14 <sup>ab</sup>	9.00±0.89 <sup>a</sup>	-	-
Kinetin+ NAA	0.25 Kin+ 0.1 NAA	2.85±0.17 <sup>a</sup>	6.66±0.59 <sup>ab</sup>	2.00±0.89 <sup>a</sup>	2.40±0.50 <sup>b</sup>
	0.25 Kin+ 0.2 NAA	2.10±0.13 <sup>c</sup>	7.33±1.02 <sup>a</sup>	2.03±0.20 <sup>a</sup>	40.00±0.00 <sup>a</sup>
	0.25 Kin+ 0.5 NAA	1.60±0.12 <sup>d</sup>	4.50±0.51 <sup>bc</sup>	2.35±0.19 <sup>a</sup>	40.00±0.00 <sup>a</sup>

\*Aynı sütunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ( $p \leq 0.05$ ).

\*Rakamlar 4 haftalık kültür periyodu sonunda 12 materyalin ortalamasını göstermektedir.

Dört haftalık kültür periyodu sonunda **Çizelge 4.2.** de görüldüğü gibi, kültüre alınan sürgünlerin boy uzunluğunun besi ortamında kullanılan oksin çeşidi ve konsantrasyonuna göre değiştiği belirlendi. Bununla birlikte test edilen Kin ve oksin konsantrasyonlarında 0.25 Kin+0.2 mgL<sup>-1</sup> IAA ve 0.25 Kin+0.5 mgL<sup>-1</sup> NAA uygulama grupları hariç kontrol grubu da dâhil olmak üzere sürgün boyu bakımından bütün verilerin birbirlerine yakın olduğu sonucuna varıldı. 0.25 Kin+0.2 mgL<sup>-1</sup> IAA ve 0.25 Kin+0.5 mgL<sup>-1</sup> NAA uygulama gruplarında ise kültüre alınan eksplantların sürgün boylarının kontrol grubundan daha kısa olduğu görüldü. Test edilen oksin konsantrasyonları içerisinde en iyi sonuç 2.85 cm sürgün boyu ile 0.25 Kin+0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA ile desteklenen besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edildi.

Sürgün sayısı bakımından değerlendirildiğinde, yeni sürgün oluşumunun uygulama gruplarına göre değiştiği ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında genel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi (**Çizelge 4.2.**). Yaptığımız çalışma sonucunda sürgün boyunda olduğu gibi, sürgün sayısında da IAA konsantrasyonlarının NAA konsantrasyonlarından daha iyi sonuç verdiği ancak bu sonucun **Çizelge 4.2.**'de

görüldüğü gibi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki açıdan anlamlı olmadığı görüldü. Uygulama grupları arasında en fazla yeni sürgün oluşumu eksplant başına 9.00 adet sürgün ile 0.25 Kin+ 0.5 mgL<sup>-1</sup> IAA besisi ortamından elde edilirken en düşük sürgün oluşumu da eksplant başına 3.25 adet sürgün ile 0.25 Kin+ 0.2 mgL<sup>-1</sup> IAA besisi ortamından elde edildi (Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9. ve Şekil 4.10).

Kök boyu ve kök sayısı bakımından uygulama grupları değerlendirildiğinde, kontrol grubu ve 0.25 Kin + IAA (0.1-0.2-0.5) mgL<sup>-1</sup> konsantrasyonlarında kültüre alınan eksplantlarda, kök oluşumu meydana gelmediği gözlemlendi. Bununla birlikte, NAA içeren tüm konsantrasyonlarda sürgünlerde kök oluşumu meydana geldiği ve kök boyu açısından istatistiki anlamda en iyi sonuçlar 0.25 Kin+0.5 mgL<sup>-1</sup> NAA (2.35 cm) besisi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edildi. Ayrıca test edilen oksin konsantrasyonları içerisinde kök sayısı bakımından 0.25 Kin+0.5 NAA mgL<sup>-1</sup> ve 0.25 Kin+0.2 mgL<sup>-1</sup> NAA uygulama gruplarında sürgün başına ortalama 40 adet kök oluşumu ile en iyi sonuçları verdiği tespit edildi.



**Şekil 4.6.** 0.25 mgL<sup>-1</sup> Kin (kontrol) uygulamasında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler



**Şekil 4.7.** 0.25 kin+0.1 mgL<sup>-1</sup> IAA besli ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler



**Şekil 4.8.** 0.25 kin+0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA besli ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler



**Şekil 4.9.** 0.25 Kin+0.5 mgL<sup>-1</sup> IAA besli ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler



**Şekil 4.10.** 0.25 Kin+0.5 mgL<sup>-1</sup> NAA besli ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler

#### 4.1.3. Sürgün çoğaltımı üzerine 0.5 mgL<sup>-1</sup> Kin + oksinlerin etkisi

*Ajuga xylorrhiza* Kit Tan'ın olgun tohumlarından itibaren *in vitro* koşullarda elde edilen sürgünlerin mikroçoğaltımı üzerine 0.5 mgL<sup>-1</sup> Kin ile oksinlerin (IAA-NAA) farklı konsantrasyonlarının (0.1 - 0.2 - 0.5 mgL<sup>-1</sup>) etkisi bir kontrol grubu ile birlikte araştırıldı. Dört haftalık kültür periyodu sonunda elde edilen veriler **Çizelge 4.3.** de sunuldu.

**Çizelge 4.3.** *In vitro* sürgünlerin mikroçoğaltımı üzerine sitokin (Kin) ve oksin (IAA-NAA) konsantrasyonlarının etkisi.

BBD	Konsantrasyon (mgL <sup>-1</sup> )	Sürgün boyu ± Ortalama Standart Sapma*	Sürgün sayısı ± Ortalama Standart Sapma*	Kök boyu ± Ortalama Standart Sapma*	Kök sayısı ± Ortalama Standart Sapma*
Kontrol	0.5 Kin	3.10±0.17 <sup>a</sup>	4.66±0.45 <sup>a</sup>	-	-
Kinetin+	0.5 Kin+ 0.1 IAA	1.97±0.13 <sup>c</sup>	3.53±0.35 <sup>bcd</sup>	-	-
IAA	0.5 Kin+ 0.2 IAA	1.83±0.11 <sup>c</sup>	2.86±0.25 <sup>cd</sup>	-	-
	0.5 Kin+ 0.5 IAA	2.92±0.23 <sup>a</sup>	3.73±0.35 <sup>abcd</sup>	-	-
Kinetin+	0.5 Kin+ 0.1 NAA	2.58±0.17 <sup>ab</sup>	4.13±0.33 <sup>ab</sup>	-	-
NAA	0.5 Kin+ 0.2 NAA	2.10±0.26 <sup>bc</sup>	3.93±0.41 <sup>abc</sup>	-	-
	0.5 Kin+ 0.5 NAA	2.67±0.15 <sup>a</sup>	2.80±0.29 <sup>d</sup>	-	-

\*Aynı sütunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir (p≤0.05)  
\*Rakamlar 4 haftalık kültür periyodu sonunda 15 materyalin ortalamasını göstermektedir

Dört haftalık kültür periyodu sonunda, test edilen Kin ve oksin çeşitleri konsantrasyonlarının sürgün boyu üzerindeki etkisi incelendiğinde, verilerin uygulama gruplarına göre değişkenlik gösterdiği belirlendi (**Çizelge 4.3.**). Test edilen uygulama gruplarından 0.5 Kin+0.1 mgL<sup>-1</sup> IAA ve 0.5 Kin+ 0.2 mgL<sup>-1</sup> IAA ile desteklenmiş besi ortamlarında kültüre alınan eksplantların sürgün boyunun, diğer uygulamalara oranla düşük seviyelerde seyrettiği gözlemlendi. Genel olarak, sürgünleri boy uzunluğu için NAA konsantrasyonlarının IAA konsantrasyonlarından daha iyi sonuç verdiği, ancak bu sonucun **Çizelge 4.3.**'te görüldüğü üzere kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki açıdan anlamlı olmadığı belirlendi. Test edilen tüm uygulamalar içerisinde, sürgün boyu bakımından en iyi sonuç 3.10 cm ile 0.5 mgL<sup>-1</sup> Kin besi ortamında (kontrol grubu) kültüre alınan sürgünlerden elde edildiği gözlemlendi.

Sürgün sayısı bakımından değerlendirildiğinde, yeni sürgün oluşumunun uygulama gruplarına göre değiştiği ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, bazı uygulama grupları hariç (0.1 mgL<sup>-1</sup> IAA, 0.2 mgL<sup>-1</sup> IAA, 0.5 mgL<sup>-1</sup> NAA) anlamlı bir farklılık olmadığı ve kontrol grubundan daha düşük sayıda olduğu belirlendi. Genel olarak sürgün sayısında da NAA konsantrasyonlarının IAA konsantrasyonlarından daha iyi sonuç verdiği ancak bu sonucun **Çizelge 4.3.**'te görüldüğü gibi kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında daha düşük sayıda olduğu görüldü. En iyi sürgün oluşumu eksplant başına 4.66 adet sürgün ile kontrol grubu olan 0.5 mgL<sup>-1</sup> Kin ve eksplant başına 4.13 sürgün ile 0.5 Kin+0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA besi ortamlarından elde edildi. Oysa en düşük sürgün oluşumu da eksplant başına 2.80 adet sürgün ile 0.5 Kin+ 0.5 mgL<sup>-1</sup> NAA besi ortamından elde edildi (Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14. ve Şekil 4.15). Sonuç olarak uygulama grupları arasında en fazla yeni sürgün oluşumu kontrol grubundan elde edildi.

Bununla birlikte sürgün çoğaltımı için test edilen uygulamalar kök boyu ve kök sayısı bakımından değerlendirildiğinde, kontrol grubu da dâhil olmak üzere IAA ve NAA konsantrasyonlarının hiç birinde kök oluşumu meydana gelmediği gözlenmiştir.





**Şekil 4.11.** 0.5 mgL<sup>-1</sup> Kin (kontrol) besi ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler



**Şekil 4.12.** 0.5 Kin+ 0.1 mgL<sup>-1</sup> IAA besi ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler



**Şekil 4.13.** 0.5 Kin+ 0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA besi Ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler



**Şekil 4.14.** 0.5 Kin+ 0.5 mgL<sup>-1</sup> IAA besi ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler



**Şekil 4.15.** 0.5 Kin+ 0.5 mgL<sup>-1</sup> NAA besi Ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler

#### 4.1.4. Sürgün çoğaltımı üzerine 1.0 mgL<sup>-1</sup> Kin + oksinlerin etkisi

*Ajuga xylorrhiza* Kit Tan'ın olgun tohumlarından itibaren *in vitro* koşullarda elde edilen sürgünlerin mikroçoğaltımı üzerine 1.0 mgL<sup>-1</sup> Kin ile oksinlerin (IAA-NAA) farklı konsantrasyonlarının (0.1 - 0.2 - 0.5 mgL<sup>-1</sup>) etkisi bir kontrol grubu ile birlikte araştırıldı. Dört haftalık kültür periyodu sonunda elde edilen veriler **Çizelge 4.4.** de sunuldu.

**Çizelge 4.4.** *In vitro* sürgünlerin mikroçoğaltımı üzerine sitokin (Kin) ve oksin (IAA-NAA) konsantrasyonlarının etkisi.

BBD	Konsantrasyon (mgL <sup>-1</sup> )	Sürgün boyu ± Ortalama Standart Sapma*	Sürgün sayısı ± Ortalama Standart Sapma*	Kök boyu ± Ortalama Standart Sapma*	Kök sayısı ± Ortalama Standart Sapma*
Kontrol	1.0 Kin	2.63±0.15 <sup>a</sup>	5.66±0.34 <sup>a</sup>	-	-
Kinetin+	1.0 Kin+ 0.1 IAA	1.91±0.15 <sup>bc</sup>	7.13±1.15 <sup>a</sup>	-	-
IAA	1.0 Kin+ 0.2 IAA	1.93±0.21 <sup>bc</sup>	5.13±0.92 <sup>ab</sup>	2.20±0.00	4.00±0.00
	1.0 Kin+ 0.5 IAA	1.62±0.15 <sup>cd</sup>	4.66±0.76 <sup>ab</sup>	-	-
Kinetin+	1.0 Kin+ 0.1 NAA	2.15±0.14 <sup>b</sup>	5.66±0.75 <sup>a</sup>	-	-
NAA	1.0 Kin+ 0.2 NAA	1.34±0.17 <sup>d</sup>	2.93±0.65 <sup>b</sup>	-	-
	1.0 Kin+ 0.5 NAA	1.90±0.08 <sup>bc</sup>	6.73±0.71 <sup>a</sup>	1.36±0.73	9.50±4.51

\*Aynı sütunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir (p≤0.05)  
\*Rakamları 4 haftalık kültür periyodu sonunda 15 materyalin ortalamasını göstermektedir

Dört haftalık kültür periyodu sonunda, test edilen Kin ve oksin konsantrasyonlarının, kontrol grubuna oranla sürgün boyu bakımından daha düşük frekanslarda sonuçlar sergilediği gözlemlendi. Kontrol grubundan alınan sonuçların diğer uygulama gruplarından farklı olduğu ve istatistiki açıdan da bu farklılığın anlamlı olduğu belirlendi. Test edilen tüm uygulamalar içerisinde, en iyi sonuç 2.63 cm ile kontrol (1.0 mgL<sup>-1</sup> Kin) grubunda kültüre alınan eksplantlardan elde edildiği, kontrol grubu hariç sürgün boyu bakımından en iyi sonuç ise 2.15 cm ile 1.0 Kin+0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA kültür ortamına alınan sürgünlerden elde edildiği belirlendi. Sürgün boyu bakımından en düşük değer ise 1.34 cm ile 1.0 Kin+0.2 mgL<sup>-1</sup> NAA besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edildi. Yaptığımız çalışmadaki tüm uygulamalar göz önünde bulundurulduğunda, sürgün boyu açısından en iyi sonuç kontrol grubunda kültüre alınmış eksplantlardan elde edildi.

Sürgün sayısı bakımından değerlendirildiğinde ise, genel anlamda tüm uygulama gruplarında yeni sürgün oluşumunun meydana geldiği ancak sürgün sayısının uygulama gruplarına göre değiştiği belirlendi. Test edilen oksin konsantrasyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (1.0 Kin+ 0.2 mgL<sup>-1</sup> NAA hariç) istatistiki bakımından anlamlı farklılıkların olmadığı belirlendi (**Çizelge 4.4.**). Sürgün sayısı bakımından oksin

çeşitleri karşılaştırıldığında, IAA konsantrasyonlarının NAA konsantrasyonlarından daha iyi sonuç verdiği görüldü. Uygulama grupları arasında en fazla yeni sürgün oluşumu, eksplant başına 7.13 adet sürgün ile 1.0 Kin+ 0.1 mgL<sup>-1</sup>IAA besi ortamında kültüre alınan sürgünlerden elde edildi (**Şekil 4.16.**, **Şekil 4.17.**, **Şekil 4.18.**, **Şekil 4.19.** ve **Şekil 4.20**). Test edilen oksin konsantrasyonları içerisinde en az sürgün oluşumu ise, eksplant başına 2.93 adet sürgün sayısı ile 1.0 Kin+ 0.2 mgL<sup>-1</sup> NAA besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edildiği ve sonucun istatistiki bakımdan da diğer tüm uygulama gruplarından anlamlı farklılık gösterdiği saptandı. Sonuç olarak elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde, sürgün çoğaltımı için besi ortamına 1.0 mgL<sup>-1</sup> Kin'e ilaveten mutlaka düşük konsantrasyonda (0.1 mgL<sup>-1</sup>) IAA veya yüksek konsantrasyonda (0.5 mgL<sup>-1</sup>) NAA bırakılması gerektiği kanaatine varıldı.

Kök boyu ve kök sayısı bakımından uygulama grupları değerlendirildiğinde kontrol grubu da dâhil olmak üzere kültüre alınan eksplantlardan 1.0 Kin+ 0.2 mgL<sup>-1</sup> IAA ve 1.0 Kin+ 0.5 mgL<sup>-1</sup> NAA uygulama grupları hariç hiçbir uygulama grubunda kök meydana gelmediği belirlendi.



**Şekil 4.16.** 1.0 mgL<sup>-1</sup> Kin (kontrol) besi ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler



**Şekil 4.17.** 1.0 Kin+0.1 mgL<sup>-1</sup> IAA besi ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler



**Şekil 4.18.** 1.0 Kin+0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA besi ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler



**Şekil 4.19.** 1.0 Kin+0.5 mgL<sup>-1</sup> IAA besi ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler



**Şekil 4.20.** 1.0 Kin+0.5 mgL<sup>-1</sup> NAA besi ortamında 4 hafta sonunda gelişen sürgünler

#### 4.1.5. Sürgünlerin köklendirilmesine farklı oksin konsantrasyonlarının etkisi

*Ajuga xylorrhiza* Kit Tan'ın olgun tohumlarından itibaren *in vitro* koşullarda elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi üzerine oksinlerin (IAA-NAA) farklı konsantrasyonlarının (0,25 – 0,5 – 1,0 – 1,5 mgL<sup>-1</sup>) etkisi bir kontrol grubu ile birlikte araştırıldı. Dört haftalık kültür periyodu sonunda elde edilen veriler **Çizelge 4.5.** de sunuldu.

**Çizelge 4.5.** *In vitro* sürgünlerin köklendirilmesi üzerine oksin (IAA-NAA) konsantrasyonlarının etkisi

BBD	Konsantrasyon (mgL <sup>-1</sup> )	Kök boyu ± Ortalama Standart Hata*	Kök sayısı ± Ortalama Standart Hata*
Kontrol	0.0 mgL <sup>-1</sup>	-	-
	0.25 mgL <sup>-1</sup>	-	-
IAA	0.5 mgL <sup>-1</sup>	0.45±0.25 <sup>a</sup>	3.00±1.00 <sup>b</sup>
	1.0 mgL <sup>-1</sup>	1.20±0.48 <sup>a</sup>	4.71±0.74 <sup>b</sup>
	1.5 mgL <sup>-1</sup>	0.92±0.12 <sup>a</sup>	6.55±1.36 <sup>b</sup>
NAA	0.25 mgL <sup>-1</sup>	1.10±0.16 <sup>a</sup>	24.25±4.27 <sup>a</sup>
	0.5 mgL <sup>-1</sup>	1.36±0.34 <sup>a</sup>	13.10±2.81 <sup>ab</sup>
	1.0 mgL <sup>-1</sup>	1.14±0.21 <sup>a</sup>	20.66±4.61 <sup>a</sup>
	1.5 mgL <sup>-1</sup>	1.51±0.26 <sup>a</sup>	26.50±3.50 <sup>a</sup>

\*Aynı sütunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir (p≤0.05)  
\*Rakamlar 4 haftalık kültür periyodu sonunda 12 materyalin ortalamasını göstermektedir

Dört haftalık kültür periyodu sonunda, **Çizelge 4.5.**'te görüldüğü gibi kontrol grubu ve 0.25 mgL<sup>-1</sup> IAA uygulama grubunda kültüre alınan eksplantlarda kök oluşumu meydana gelmediği, diğer uygulama gruplarında ise konsantrasyona bağlı olarak farklılıklar göstermekle birlikte kök oluştuğu gözlemlendi. Bununla birlikte kök boyu bakımından uygulama grupları arasında istatistiki açıdan önemli farklılık görülmedi. Ancak kullanılan oksin çeşitleri içerisinde NAA konsantrasyonlarının IAA konsantrasyonlarından daha iyi sonuç verdiği saptandı. Test edilen oksin konsantrasyonları arasından, kök boyu bakımından en iyi sonuçların 1.5 mgL<sup>-1</sup> NAA besisi ortamında kültüre alınan (1,51 cm) eksplantlarda meydana geldiği belirlendi.

Kök sayısı bakımından oksin çeşitleri karşılaştırıldığında NAA konsantrasyonlarının IAA konsantrasyonlarından daha fazla kök oluşumunu teşvik ettiği ve bunun istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlendi (**Çizelge 4.5.**). Genel olarak NAA konsantrasyonlarında kültüre alınan eksplantlarda yüksek oranda kök oluşumu elde edildi. Test edilen oksin konsantrasyonları içerisinde kök sayısı bakımından en iyi sonuç sürgün başına ortalama 26,50 adet kök ile 1,5 mgL<sup>-1</sup> NAA ve 24. 25 adet kök ile

0.25 mgL<sup>-1</sup> NAA ile desteklenmiş besi ortamlarında kültüre alınan eksplantlardan elde edildi. Bununla birlikte morfolojik olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm uygulama gruplarında kültüre alınan eksplantların yeni sürgünler oluşturduğu ve sağlıklı bir şekilde gelişimine devam ettiği gözlemlendi (Şekil 4.21., Şekil 4.22., Şekil 4.23., Şekil 4.24., Şekil 4.25. ve Şekil 4.26).



Şekil 4.21. Kontrol grubu (hormonsuz) uygulaması



Şekil 4.22. 0.5 mgL<sup>-1</sup> NAA eklenmiş besi ortamında sürgünlerin genel görünümü



Şekil 4.23. 0.25 mgL<sup>-1</sup> IAA eklenmiş besi ortamında sürgünlerin genel görünümü



Şekil 4.24. 0.25 mgL<sup>-1</sup> NAA eklenmiş besi ortamında sürgünlerin genel görünümü



Şekil 4.25. 1.0 mgL<sup>-1</sup>IAA eklenmiş besi ortamında sürgünlerin genel görünümü



Şekil 4.26. 1.5 mgL<sup>-1</sup> NAA eklenmiş besi ortamında sürgünlerin genel görünümü

#### 4.1.6. Bitkilerin Toprağa Adaptasyonu (Aklimatizasyon)

Bitkilerin doğal koşullara kademeli adaptasyonu amacı ile saksılara aktarılmış bitkilerin üzerindeki poşetler, ikinci günden itibaren 10 gün boyunca belirli sürelerde açılmıştır. 10 günlük sürenin sonunda, saksıların üzerindeki poşetler tamamen çıkarılarak büyüme odasında yaklaşık 14 gün boyunca gelişmeye bırakılmıştır. Fidelerin bu aşamadan sonra hayatta kalmaya devam ettikleri ve yeni sürgün oluşturdukları tespit edildi. *In vitro* şartlarda yetiştirilen endemik türlerin toprağa ve dış ortama adaptasyonu çalışmamızın en önemli kısmı teşkil etmektedir. Yapılan uygulamalar sonucunda köklendirilmiş Ajuga bitkilerinin toprağa adaptasyonu %100 oranında başarı ile gerçekleştirildi (Şekil 4.27., Şekil 4.28. Şekil 4.29., Şekil 4.30.,).



Şekil 4.27. *In vitro* kültür ortamında köklendirilmiş sürgünler



Şekil 4.28. Köklendirilmiş sürgünlerin saksılara ekilmesi



Şekil 4.29. Köklendirilmiş Ajuga bitkilerinin toprağa adaptasyonu (4 ay sonunda)



Şekil 4.30. Köklendirilmiş Ajuga bitkilerinin toprağa adaptasyonu (1 yıl sonunda)

## 4.2. Tartışma

Lamiaceae familyasının değerli üyelerinden olan *Ajuga* cinsi, alternatif tıp alanında günümüzde dahi birçok hastalığın tedavisinde farmasötik olarak kullanılmaktadır. İlaç sanayinde olduğu gibi gıda ve kozmetik sanayisinde de oldukça rağbet görmektedir. *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan yaşam alanları belli bir bölgeyle sınırlı nadir hassas bir bitki türüdür. Çermik bölgesinde geniş yayılım gösteren türlerin genetik çeşitlilikleri yerel endemik türlere oranla daha fazladır. Bundan dolayıdır ki endemik türler doğal yaşam alanlarındaki farklılaşmalara oldukça hassas olup; habitatlarında ki şartların değişmesi sonucunda daha çok nesli tükenmekle karşı karşıyadır (Primarck 1993). *Ajuga xylorrhiza* Dünya üzerinde bilinen tek bir bölgede, Diyarbakır'ın Çermik ilçesinde yetişmekte ve nesli tükenme tehlikesi altındadır (Davis, 1988).

*In vitro* mikroçoğaltım teknikleri, endemik veya nesli tehlike altında olan ve üretilmesi zor olan türlerde, bitki biyoçeşitliliğini sağlama ve devam ettirme açısından iyi bir alternatiftir (Engelmann 2011). Son yirmi yıl içerisinde endüstriyel, süs, tıbbi ve tarımsal amaçlı kullanılan çok sayıda bitki türü *in vitro* koşullarda çoğaltılmaktadır (Lema-Rumińska ve Kulus 2014; Rubluo 1997; Civatti ve ark. 2017; Zoghlami ve ark. 2012). Bu teknik sayesinde germplasm bankaları kurulmakta ve böylelikle bitkiler kendi doğal yaşam alanlarında korunabilmektedir (García-Rubio ve Malda-Barrera 2010; Giusti ve ark. 2002). Yaptığımız çalışmada, koruma altına alınan *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan bitkisinin doğaya kazandırılması amacıyla *in vitro* koşullar altında mikroçoğaltımı yapılmıştır.

*In vitro* koşullar altında yapılan sürgün çoğaltımı çalışmalarında genellikle sitokininler yaygın olarak kullanılmaktadır. *Ajuga* cinsi ile ilgili yapılan çalışmalarda araştırmacıların bir kısmı sitokininlerin tek başına kullanımının sürgün çoğaltımı için yeterli olduğunu bildirmişlerdir. Örneğin Jan ve ark. (2014) tıbbi önemi olan *Ajuga bracteosa* Wall ex. Benth'in farklı eksplantlarından kallus indüksiyonu ve çoklu sürgün rejenerasyonu için, hızlı ve verimli bir *in vitro* protokol oluşturmuşlardır. Araştırmada çoklu sürgün oluşumu için, farklı yaprak eksplantlarından elde ettikleri kallusu, farklı konsantrasyonlarda oksinler (IAA, NAA) ve sitokininler (BAP, Kinetin) ile takviye edilmiş MS besisi ortamında elde ettiklerini ayrıca 5.0 mgL<sup>-1</sup> BAP ile desteklenmiş MS besisi ortamında maksimum sürgün elde ettiklerini açıklamışlardır. Akbaş ve ark. (2015), BAP ve Kinetinin *Ajuga vestita* BOISS'in mikroçoğaltılması üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında, sürgün oluşumu için en iyi sonucu 0,125 mgL<sup>-1</sup> Kin içeren ortamda gözlemişlerdir. Kayani ve ark. (2016) *Ajuga bracteosa*'nın 0.45-3.6 mgL<sup>-1</sup> BA

değerindeki MS besi ortamında büyük oranda sürgün elde edildiğini vurgulamıştır. Yaptığımız çalışmada ise besi ortamına bırakılan sitokin grubu hormonlara ilaveten düşük oranda oksin kullanımının sürgün çoğaltımını teşvik ettiğini ve araştırmacıların bildirdiğinin aksine yalnız sitokin içeren besi ortamından (kontrol) daha yüksek oranda sürgün elde edildiğini tespit ettik.

Ajuga cinsi ile ilgili yapılan sürgün çoğaltımı çalışmalarında, sitokin hormon grubu olarak BA + Oksin kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Örneğin Lineberg ve Wanstreet (1983), *Ajuga reptans*'ın *in vitro* çoğaltımı üzerine yaptıkları araştırmada 2.5 mgL<sup>-1</sup> BA ve 0.1 mgL<sup>-1</sup> NAA bulunduran MS besi ortamından her sürgün için 47.6 sürgün meydana geldiğini bildirmiştir. Yine Kaul ve ark. (2013) tıbbi bir bitki olan *Ajuga bracteosa*'nın genetik transformasyonu ve korunması adına, yaprak, yaprak sapı ve kök eksplantlarını IAA (2 mgL<sup>-1</sup>) ve BA (5 mgL<sup>-1</sup>) ile desteklenen MS besi ortamında kültüre alarak ortalama 41.4 ile %100 sürgün yenilenmesi sağlandığını ve kültür başına 8.4 cm'lik sürgünler elde edildiği sonucuna varmışlardır. Sivanesan ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada *Ajuga multiflora*'nın sürgün ucu eksplantlarından çoğaltılan sürgünler üzerinde, bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisini incelemişlerdir. Maksimum sürgün sayısını (17.1), 8 µM BA (Benziladenin) ve 2.7 µM NAA (Naftalenasetik asit) ile güçlendirilmiş MS (Murashige Skoog) kültür ortamında elde etmişlerdir. Eksplant başına ortalama sürgün sayısının, yarı katı ortama kıyasla sıvı ortamda 1.6 kat arttığı belirtilmiştir. Jan ve ark. (2018), *Ajuga bracteosa*'nın mikroçoğaltma protokolü geliştirmek için yaprak sapı ve internod eksplantlarından kallus kültürlerini kullanmışlar. Oksin ve sitokin içeren farklı konsantrasyondaki MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan oluşan kallusların, farklı BBD içeren MS ortamında alt kültürlerle alarak sürgün rejenerasyonu sağlamışlardır. Petiyol eksplantlarında maksimum sürgün sayısının 3 mgL<sup>-1</sup> BAP içeren (%80) MS besi ortamında, internod eksplantında ise 2 mgL<sup>-1</sup> BAP ve 5 mgL<sup>-1</sup> NAA içeren MS besi ortamında (%100) sağlandığını bildirmişlerdir. Bizde yaptığımız çalışmada *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan'ın sürgün çoğaltımı üzerine sitokin hormon grubu olarak kinetin + oksin konsantrasyonlarının etkisini araştırdık ve 0.125 mgL<sup>-1</sup> Kin + 0.1 mgL<sup>-1</sup> IAA içeren MS besi ortamının en iyi sonucu verdiğini saptadık.

Işıkalın ve ark. (2020), *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan bitkisinin *in vitro* çoğaltılmasında sitokin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada sürgünler, çeşitli konsantrasyonlarda BAP, TDZ ve Kin ile desteklenen MS bazal ortamında kültüre alınmış ve optimal sürgün oluşumu 0.125 mgL<sup>-1</sup> BAP (eksplant başına 7.91 sürgün) ve

0.25 mgL<sup>-1</sup> Kin (eksplant başına 4.9 sürgün) içeren ortamlardan elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu (3.43 ila 3.63 cm) açısından en iyi sonuç ise Kinetin içeren besi ortamlarından elde edilmiştir. Aynı ajuga türü ile yaptığımız çalışmada tüm uygulama grupları arasında en fazla yeni sürgün oluşumuna, eksplant başına 10.91 adet sürgün ile 0.125 mgL<sup>-1</sup> Kin+ 0.1 mgL<sup>-1</sup> IAA içeren besi ortamından elde edildi. Sürgün boyu bakımından ise, en iyi sonuç 3.10 cm ile 0.5 mgL<sup>-1</sup> Kin içeren besi ortamında kültüre alınan sürgünlerden elde edildi. Bu bilgiler ışığında koruma altında bulunan *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan bitkisinin sürgün çoğaltımı için besi ortamına sitokinin yanında oksin ilave edilmesinin olumlu sonuç verdiği kanaatine varılabilir.

Sivanesan ve ark (2011), *Ajuga multiflora* bunge ile ilgili yaptıkları çalışmalarında, sürgünlerin MS ortamına transferini takip eden 2 hafta içinde sürgün büyümesi ve kök başlangıcı gözlemlendiğini rapor etmiş ve kök indüksiyon sıklığının, sürgün başına ortalama 8.2 adet kök ile % 100 oranında olduğunu vurgulamışlardır. Sivanesan ve ark. (2016), *Ajuga multiflora*'nın sürgün ucu eksplantlarından elde ettikleri sürgünlerin köklendirilmesi çalışmalarında, MS bazal ortamında sürgün başına ortalama 7.2 adet kök ile azami köklenme (%100) elde ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar köklendirilmiş bitkileri, serada %100 hayatta kalma oranıyla başarılı bir şekilde iklimlendirmişlerdir. Jan ve ark. (2018), *Ajuga brakteosa*'nın mikroçoğaltma protokolü geliştirmek için yaptıkları çalışmada, *in vitro* ortamda oluşan sürgünleri 2 mgL<sup>-1</sup> IAA ile desteklenmiş MS besi ortamında köklendirme işleminin ardından, doğal yaşam alanlarına repikajı için sera ortamında bir ay kadar bir süre bekletilmiş ve başarılı bir şekilde doğaya salındığı bildirilmiştir.

Akbaş ve ark. (2019) *in vitro* koşullar altında *Ajuga vestita* Boiss'in sürgünlerini 0.125 mgL<sup>-1</sup> Kin içeren 1/1 MS besi ortamında alt kültüre alınarak mikroçoğaltımlarının gerçekleştirildiği ve %80 başarıyla toprağa aktarıldığı vurgulanmıştır. Işıksız ve ark. (2020), *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan bitkisinin *in vitro* çoğaltılan sürgünlerinin köklendirilmesi için, rejenere sürgünler 0 (kontrol), 0.5 veya 1.0 mgL<sup>-1</sup>'de iki farklı indol asetik asit (IAA) ve  $\alpha$ -naftalenetik asit (NAA) konsantrasyonu içeren 1/4 kuvvetli MS ortamına aktarmıştır. Araştırmacılar, sürgün başına kök sayısı açısından en iyi sonuçların, 0.5 mgL<sup>-1</sup> IAA (eksplant başına 3.10 kök) ile desteklenen ortamdan elde edildiğini bildirmişlerdir. Aynı Ajuga türü ile ilgili yaptığımız çalışmada, *in vitro* koşullarda elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için iki farklı oksinin (IAA-NAA) farklı konsantrasyonlarının (0.25 – 0.5 – 1.0 – 1.5 mgL<sup>-1</sup>) bulunduğu 1/1 MS besi ortamı kullanıldı. Kontrol grubu ve 0.25 mgL<sup>-1</sup> IAA uygulama grubunda kültüre alınan

eksplantlarda kök oluşumu meydana gelmedi. Hem kök boyu hem de kök sayısı bakımından en iyi sonuçlar sürgün başına ortalama 26.50 adet kök ve 1.51 cm ile 1.5 mgL<sup>-1</sup> NAA ile desteklenmiş besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edildi. Ayrıca, kontrol grubu da dâhil olmak üzere tüm uygulama gruplarında kültüre alınan eksplantların yeni sürgünler oluşturduğu ve sağlıklı bir şekilde gelişimine devam ettiği gözlemlendi. Köklendirilen fideler, perlit-torf karışımı (1:2) bulunan saksılara aktararak toprağa adaptasyonları başarılı (%100) bir şekilde gerçekleştirildi.



## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın verileri doğrultusunda elde edilen sonuçlar ve öneriler aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır:

1. *In vitro* koşullarda elde edilen sürgünlerin, sürgün çoğaltımı çalışmaları için sitokin ve oksin hormonlarının farklı kombinasyonları denendi.  $0.125 \text{ mgL}^{-1}$  Kin uygulamaları içerisinde en fazla yeni sürgün oluşumuna, eksplant başına 10.91 adet sürgün ile  $0.125 \text{ Kin} + 0.1 \text{ mgL}^{-1}$  IAA hormon grubunu içeren besi yerinden elde edildi. Test edilen tüm uygulamalar içerisinde sürgün boyu bakımından en iyi sonuç  $2.96 \text{ cm}$  ile  $0.125 \text{ Kin} + 0.2 \text{ mgL}^{-1}$  IAA grubu ve  $2.95 \text{ cm}$  ile  $0.125 \text{ Kin} + 0.1 \text{ mgL}^{-1}$  IAA grubunda kültüre alınan sürgünlerden elde edildi.
2.  $0.25 \text{ mgL}^{-1}$  Kin için test edilen konsantrasyonlar içerisinde en iyi sonuç  $2.85 \text{ cm}$  sürgün boyu ile  $0.25 \text{ Kin} + 0.1 \text{ mgL}^{-1}$  NAA besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edildi. Uygulama grupları arasında en fazla yeni sürgün oluşumuna eksplant başına 9.00 adet sürgün ile  $0.25 \text{ Kin} + 0.5 \text{ mgL}^{-1}$  IAA besi ortamından elde edildi.
3.  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  Kin için test edilen tüm uygulamalar içerisinde, sürgün boyu bakımından en iyi sonuç  $3.10 \text{ cm}$  ile  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  Kin besi ortamında (kontrol grubu) kültüre alınan sürgünlerden elde edildiği gözlemlendi. En iyi sürgün oluşumu eksplant başına 4.66 adet sürgün ile kontrol grubu olan  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  Kin ve eksplant başına 4.13 sürgün ile  $0.5 \text{ Kin} + 0.1 \text{ mgL}^{-1}$  NAA besi ortamlarından elde edildi.
4.  $1.0 \text{ mgL}^{-1}$  Kin için ise, test edilen tüm uygulamalar içerisinde en iyi sonuç  $2.63 \text{ cm}$  sürgün boyu ile kontrol ( $1.0 \text{ mgL}^{-1}$  Kin) grubunda kültüre alınan eksplantlardan elde edildiği, kontrol grubu hariç sürgün boyu bakımından en iyi sonuç ise  $2.15 \text{ cm}$  ile  $1.0 \text{ Kin} + 0.1 \text{ mgL}^{-1}$  NAA kültür ortamına alınan sürgünlerden elde edildiği belirlendi. Uygulama grupları arasında en fazla yeni sürgün oluşumuna, eksplant başına 7.13 adet sürgün ile  $1.0 \text{ Kin} + 0.1 \text{ mgL}^{-1}$  IAA besi ortamında kültüre alınan sürgünlerden elde edildi.
5. Genel olarak, IAA konsantrasyonlarının NAA konsantrasyonlarından daha iyi sonuç verdiği ve besi ortamında sitokin (kinetin) yanında düşük miktarda oksin kullanımının sürgün çoğaltımını teşvik ettiği ( $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  Kin hariç) görüldü.

6. Köklendirme uygulamaları değerlendirildiğinde kontrol grubu ve  $0.25 \text{ mgL}^{-1}$  IAA test gruplarında kök oluşumuna rastlanmadı. Hem kök boyu hem de kök sayısı bakımından test edilen oksin konsantrasyonları arasından en iyi sonuçlar  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$  NAA (1.51 cm ve 26.50 adet kök) besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edildi.
7. Köklendirme amacıyla yapılan çalışmalar sonucu elde edilen sağlıklı fideler torf – perlit karışımını içeren saksılara ekilerek toprağa adaptasyonu (%100) sağlandı.

Sonuçlar değerlendirildiğinde; literatür taramasına göre yapılan araştırmalar içerisinde en yüksek sürgün sayısına eksplant başına 10.91 adet sürgün ile  $0.125 \text{ Kin}+0.1 \text{ mgL}^{-1}$  IAA hormon kombinasyonunu içeren MS besi ortamındaki eksplantlardan elde edilerek tam teşekküllü bir bitki şeklinde toprağa adaptasyonları başarılı bir şekilde sağlanmıştır.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda elde edilen bitkilerin DNA analizi yapılarak klon olup olmadığının tespit edilmesi ve neticesinde doğal yaşam alanına aktarılmasının sağlanması öngörülmektedir. Böylece koruma altındaki *Ajuga reptans* Kit Tan bitkisinin popülasyon sayısı artırılarak genetik çeşitliliğinin korunması ve sürdürülebilirliğinin sağlanması adına katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

## KAYNAKLAR

- Abdin, M. Z., Izrar, M., U, R.R., Jain, S.K. 2003, "Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production," *Planta Med*, 69: 289–299.
- Ali, H., Khan, M.A., Kayanic, W.K., Khand, T., Mashwanie, Z.R., Ullaha, N., Khana, 2018, Thidiazuron regulated growth, secondary metabolism and essential oil profiles in shoot cultures of *Ajuga bracteosa* R.S. *Journal of Photochemistry & Photobiology*, B: Biology 183 242–250.
- Ali, H., Khan, M. A., Kayani, W. K., Dilshad, E., Rani, R., & Khan, R. S. 2019, Production of biomass and medicinal metabolites through adventitious roots in *Ajuga bracteosa* under different spectral lights. *Journal of Photochemistry and Photobiology* B: Biology. doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.02.010
- Akbas, F., Kuru, I.S., Orcan, P.K., 2015, The effects of BAP and Kin on micropropagation of *Ajuga vestita* Boiss.; a rare endemic medicinal plant. 2nd Int Conference on Advances in environment, Agriculture & Medical Sciences (ICAEAM 15), June 11–12, 2015. doi: 10.17758/IAAST.A0615033.
- Akbaş, F., Orcan, P., Kuru, İ.S., Işıkalın, Ç., Namlı, S. 2019 optimization of germination protocol for rare endemic *Ajuga vestita* Boiss. Under in vitro conditions. *Bangladesh J Bot* 48:649-653
- Akman, Y. 1993. *Biyocoğrafya. Palme Yayınları*. Ankara, 379 s.
- Anonim. 2007, "Ulusal Biyolojik Çeşitlilik Stratejisi ve Eylem Planı", T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü Doğa Koruma Dairesi Başkanlığı, Ankara.
- Anonim. 2013, "*Ajuga xylorrhiza* Tür Koruma Eylem Planı", T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü XV, Bölge Müdürlüğü Diyarbakır Şube Müdürlüğü, Ankara.
- Ayan, A.K., Çirak, C., Yanar, ve ark. 2006, Variations in total phenolics during ontogenetic, morphogenetic, and diurnal cycles in *Hypericum* species from Turkey. *J Plant Biology*. 49: 432-439. Ref.: <https://bit.ly/2TeXqqC>
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. 2002, "Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları" II. Baskı, Konya, Selçuk Üniversitesi Basımevi.

- Bakis, Y., Babac, M. T., & Uslu, E. 2011. "Updates and improvements of Turkish Plants Data Service (TÜBİVES)" In Health Informatics and Bioinformatics (HIBIT), 2011 6th International Symposium on (pp. 136-140). IEEE.
- Başer, K. H. C. 1994, Essential Oil of Labiatae from Turkey:Recent Results. Lamiales Newsletter, 3: 6-11.
- Başer K. H. C., Kürkçüoğlu M., Erdemgil F.Z. 2001. The Essential Oil of *Ajuga bombycina* from Turkey. Chemistry of Natural Compounds, 37 (3); 242-244.
- Baytop, T. 1984, Therapy with Medicinal Plants (Past and Present); Istanbul University Publications, Sayfa:298- 416, İstanbul.
- Castro, A., Coll, J., Tandron, Y.A., Pant AK and Mathela C.S. 2008, Phytoecdy steroids from *Ajuga macrosperma* var, *breviflora* roots. J. Nat. Prod, 71: 1294-1296.
- Cenkci, S., Temel, M., Kargioğlu, M., Dayan, S. 2009, Propagation of endangered *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüködük using conventional and in vitro techniques Turk J. Biol, 33:327-333.
- Cheng, D.M., Yousef, G.G., Grace, M.H., Rogers, R.B., Gorelick-Feldman, J., Raskin I ve Lila M.A. 2008, In vitro production of metabolism-enhancing phytoecdysteroids from *A. turkestanica*, Plant Cell Tiss Cult. Organ, 93:73-83.
- Civatti, L., Marchi, M., Schnadelbach, A., Bellintani, M. 2017, In vitro multiplication and genetic stability of two species of *Micranthocereus* Backeb. (Cactaceae) endemic to Bahia, Brazil. Plant Cell Tissue Organ Cult 131:537-54
- Darbinian-Sarkissian, N., Darbinyan, A., Otte, J., Radhakrishnan, S., Sawaya, B.E., et al., 2006, "p27SJ, a novel protein in St John's Wort, that suppresses expression of HIV-1 genome," Gene Therapy. 1; 288-295
- Davis, P. H. 1982, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol. 7, Edinburgh.
- Davis, P. H., 1988, Flora of Turkey and The East Aegaen Islands. Edinburg University Press,10.
- Davis, P.H., Mill, R.R. and Tan, K. (eds), 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, (Supplement), University Press, Edinburgh, Vol 10.
- Dayan, S. 2006, Endemik ve tehlike altındaki *Thermopsis turcica*(Fabaceae)'nın in vitro çimlenmesi ve mikroçoğaltımı, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim dalı, Yüksek lisans tezi 67 s., Afyon.

- Duman, H. 2000. *Ajuga L.* in: A. Güner et al. (eds.) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 11: 197. Edinburgh University Press. Edinburgh.
- Engelmann, F. 2011, Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell Dev Plant* 47:5–16
- Erdoğan, U. 2010, Tehlike Altındaki *Silene Sangaria* Coode&Cullen' nın Mikroçoğaltımı, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 90 s., Edirne.
- Erdoğan, E.A. 2014 *Lamiaceae* Familyasına Ait Bazı Bitkilerin Uçucu Yağ İçeriklerinin Belirlenmesi, Antimikrobiyal ve Antimutajenik Aktivitelerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin Üniversitesi, 134 s.
- Fekete, G., Polgár, L., Báthori, M., Coll J ve Darvas B. 2004, Peros efficacy of *Ajuga* extracts against sucking insects, *Pest Manag, Sci*, 60: 1099-1104.
- García-Rubio, O., Malda-Barrera, G. 2010, Micropropagation and reintroduction of the endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to its natural habitat. *Hortscience* 45:934–938
- Gautam, R., Jachak, S. M., & Saklani, A. (2011). Anti-inflammatory effect of *Ajuga bracteosa* Wall Ex Benth. mediated through cyclooxygenase (COX) inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 928–930. doi:10.1016/j.jep.2010.11.003
- Ghita, G., Cionca, O., Gille, E., Necula, R., Zamfirache, M.M., Stanescu U. 2011, Contributions to the phytochemical study of some samples *A. reptans L.* and *A. genevensis L.* *Bulletin of the Transilvania University of Braşov Series VI, Medical Sciences* 4 (53) 2, 7-14.
- Giusti, P., Vitti, D., Fiocchetti, F., Colla, G., Saccardo, F., Tucci, M. 2002, *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Sci Hortic* 95:319–332
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Baser, K. H. C. (ed.), 2000, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Supplement 2)*, Vol. 11, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M. 2012, *Türkiye Bitkileri Listesi Damarlı Bitkiler, Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını*, İstanbul.
- Güven, A. ve Gürsul, I., 2014, Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Sentezi, *Gıda*, 39 (5), 299-306.

- Haider, Abbasi, B., Ullah, M. A., Nadeem, M., Tungmunnithum, D., & Hano, C. 2020, Exogenous application of salicylic acid and gibberellic acid on biomass accumulation, antioxidant and anti-inflammatory secondary metabolites production in multiple shoot culture of *Ajuga integrifolia* Buch. Ham. ex D. Don. *Industrial Crops and Products*, 145, 112098. doi:10.1016/j.indcrop.2020.112098
- Hasançebi, S., Turgut, Kara. N., Cakir, O., Ari, S. 2011, Micropropagation and root culture of Turkish endemic *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae). *Turk J Bot* 35:203–210
- Haşimi, N. 2012, *Ajuga vestita* Ve *Ajuga xylorrhiza* Bitkilerinin Petrol Eteri, Aseton Ve Metanol Ekstrelerinin Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Diyarbakır, S;1-12.
- Hemcinschi, A., Galeş, R., Stanescu, U., Toma, C. 2009, Comparative histo-anatomy and Chemical Composition two *Ajuga* Species from the Romanian Flora, *Biologie Vegetale* 2, II, 33-45.
- Hellwig S., J. Drossard, R.M. Twyman, and R. Fischer, 2004, “Plant cell cultures for the production of recombinant proteins,” *Nat Biotech*, vol. 22, pp. 1415-1422.
- Israili, Z.H., Lyoussi, B. 2009, Ethnopharmacology of The Plants of Genus *Ajuga*, *Pak. J. Pharm. Sci*, 22(4): 425-462.
- Işıkalan Ç., Orcan P., Akbaş F., Namlı S., Kuru İ. S., Buluş Ş. 2020 Effect of Cytokinins on In Vitro Propagation of *Ajuga xylorrhiza* Kit Tan (Critically Endangered), Endemic to Turkey. Received: 21 November 2019 / Accepted: 1 April 2020 / Editor: Marco Buenrostro-Nava *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10082-z>
- IUCN. 2020 RedList. Published on the internet. <https://www.iucnredlist.org/>. Downloaded on 15 Jun 2021.
- Jan, M., Singh, S., Kaloo, Z.A., Maqbool, F. (2014), Callus induction and multiple shoot regeneration in *Ajuga bracteosa* Wall. ex Benth.—an important medicinal plant growing in Kashmir Himalaya. *J Sci Innov Res* 3:319–324
- Jan, M., Singh, S., Maqbool, F. 2018, Micropropagation of *Ajuga bracteosa* Wall ex. Benth.-an important medicinal plant growing in Kashmir Himalaya, *International Journal of Advance Research in Science and Engineering*, 7(4); 2010-2020.
- Jeong, B.R., Sivanesan, I. 2018, Impact of light quality and sucrose on adventitious shoot regeneration and bioactive compound accumulation in *Ajuga multiflora* Bunge, *Scientia Horticulturae* 236-222–228.

- Kaul, S., Das, S., Srivastava, P.S. 2013, Micropropagation of *Ajuga bracteosa*, a juhynönm medicinal herb, *Physiol Mol Biol Plants*, 19(2):289–296
- Kaya Y. ve Aksakal Ö. 2005, Distribution of endemic plants in the World and Turkey *Erzincan Eğitim Fakültesi Dergisi Cilt: (7) Sayı: (1)* 85-99.
- Kayani, W.K., Rani, R., Ihsan-ul, H., Mirza, B. 2014, Seasonal and geographical impact on the morphology and 20-hydroxyecdysone content in different tissue types of wild *Ajuga bracteosa* Wall. ex Benth. *Steroids* 87:12–20. doi:10.1016/j.steroids.2014.04.017
- Kayani, W.K., Fattahi, M., Palazon, J., Cusido, R.M., Mirza, B. 2016, Comprehensive screening of influential factors in the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the Himalayan elixir: *Ajuga bracteosa*.
- Korosou, R. 1997, Distibution and linal variation of *salvia fruticosa* mill. on the Island of Crete. *Willdenowia*, 27: (1-2), 113-120.
- Kokab, H., Saiqa, A., Tahseen, G., Rozina, G. M., Anum, N., Irsa, S., Kalsoom, A., 2017, Current Pharmaceutical Biotechnology, 18(4), 336-342(7) *Bentham Science Publishers* <https://doi.org/10.2174/1389201018666170313095033>
- Kökdil, G., Gülaçtı, T., Gören, A.C., Wolfgang, V. 2002, Steroids and Terpenoids from *Ajuga relictata*. *Zeitschrift für Naturforschung B Journal of Chemistry*, 57 (b): 957-960.
- Kuria, K. A. M., Chepkwony, H., Govaerts, C., Roets, E., Busson, R., de Witte, P., Laekeman, G. (2002). The Antiplasmodial Activity of Isolates from *Ajuga remota*. *Journal of Natural Products*, 65(5), 789–793. doi:10.1021/np0104626
- Lema-Rumińska, J., Kulus, D. 2014, Micropropagation of cacti—a review. *Haseltonia* 19:46–63
- Lineberger, R.D., Wanstreet, A.G. 1983, Micropropagation of *Ajuga reptans* ‘Burgundy Glow’. *Ohio Agric Res Dev Ctr Res Circ* 274:19–22
- Metcalf, C. R., Chalk, L. 1972, *Anatomy of Dicotyledon*. Clarendon Press, 502-535, Oxford.
- Misico, R.I., Nicotra, V.E., Oberti, J.C., Barboza, G., Gil, R.R., Burton, G. 2011, Withanolides and related steroids. In: *Progress in the chemistry of organic natural products*, 94:127–229

- Morgaris, N., Koedam, A., Vokou, D., 1982. Aromatic Plants. Martinius Njhoff Publisher, 265-269, London.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962, A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures, *Plant Physiology*, 15, 473-497 pp.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2007, Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*;70: 461–77.
- Oruc, H.H., Hranitz, J.M., Sorucu ,A., Duell, M., Cakmak, I., Aydinand, L., Orman, A. 2012, Determination of acute oral toxicity of flumethrin in honey bees. *J. Econ. Entomol.* **105**(6), 1890–1894
- Özen, H.Ç., Onay, A. 2013, *Bitki Fizyolojisi Ders Kitabı 2. Basım*, Nobel Akademik Yayıncılık.
- Park, H.Y., Kim, D.H., Sivanesan, I. 2017, Micropropagation of *Ajuga* species: a mini review *Biotechnol Lett* 39:1291–1298.
- Preece, J.E., Huetteman, C.A., 1994, A laboratory exercise for axillary shoot proliferation using *Ajuga reptans*. *HortTechnology* 3:312–314
- Petrosyan M., Sherbakova Y., Sahakyan N., Vardanyan Z., Poladyan A., Popov Yu., Trchounian A. 2015. “*Alkanna orientalis* (L.) Boiss. plant isolated cultures and antimicrobial activity of their extracts: Phenomenon, dependence on different factors and effects on some membraneassociated properties of bacteria,” *Plant Cell, Tissues and Organ Culture - J Plant Biotechnol*, 122(3):727-738.
- Primack, R.B. 1993, *Essentials of Conservation Biology*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Rubluo, A. 1997, Micropropagation in *Mammillaria*. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry. High techniques and micropropagation*, vol. VI. Springer, Berlin, pp 193–205
- Rukh, G., Ahmad, N., Rab, A., Ahmad, N., Fazal, H., Akbar, F., Samad, N. 2018, Photo-dependent somatic embryogenesis from non-embryogenic calli and its polyphenolics content in high-valued medicinal plant of *Ajuga bracteosa*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.11.012

- Saeed, S., Ali, H., Khan, T., Kayani, W., Khan, M. A., 2017, Impacts of methyl jasmonate and phenyl acetic acid on biomass accumulation and antioxidant potential in adventitious roots of *Ajuga bracteosa* Wall ex Benth., a high valued endangered medicinal plant, *Physiol Mol Biol Plants* (January–March 2017) 23(1):229–237 DOI 10.1007/s12298-016-0406-7
- Sahakyan, N., Petrosyan, M., Trchounian, A. 2016, Comparative analysis of chemical composition and biological activities of *Ajuga genevensis* L. in in vitro culture and intact plants. *Int J Biol Biomol Agric Food Biotechnol Eng* 10:322–326
- Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M.M. 2006, Conservation in vitro of threatened plants– Progress in the past decade, *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42: 206-214.
- Sarfaraj, H. Md., Sheeba, F., Saba, A., Rahman, Md., Akhlaquer, A. 2012, “Current approaches toward production of secondary plant metabolites,” *J Pharm & Bioall Scien*, vol. 4, N 1, pp.10-20.
- Sivanesan, I., Ko, C.H., Lee, J.P., Jeong, B.R. 2011, Influence of cytokinins on adventitious shoot regeneration from leaf and petiole explants of *Ajuga multiflora* Bunge. *Propag Ornament Plants* 11:156–158
- Sivanesan, I., Jeong, B.R. 2014, Silicon promotes adventitious shoot regeneration and enhances salinity tolerance of *Ajuga multiflora* Bunge by altering activity of antioxidant enzyme. *Sci World J* 2014:10. doi:10.1155/2014/521703
- Sivanesan, I., Park, S.W. 2015a, Optimizing factors affecting adventitious shoot regeneration, in vitro flowering and fruiting of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Ind Crops Prod* 76:323–328
- Sivanesan, I., Saini, R.K., Noorzai, R., Zamany, A.J., Kim, D.H. 2016, In vitro propagation, carotenoid, fatty acid and tocopherol content of *Ajuga multiflora* Bunge. *3. Biotech* 6:91. doi:10.1007/s13205-016-0376-z
- Smetanska, I. 2008, “Production of secondary metabolites using plant cell cultures,” *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 111:187-228.
- Stewart, J.R., Neal, C. 2012, *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications*. Bitki biyoteknolojisi ve Gnetik: İlkeler, Teknikler ve Uygulamalar/çeviri editörleri: Hüseyin Avni Öktem-Meral Yücel, Nobel kitap, Ankara.

Watson, L., Dallwitz, M. T. 1978, The Families of Flowering Plants. Oxford University Press, London.

Yang, L., Stočkigt, J. 2010, Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids. *Nat Prod Rep* 27:1469–1479

Yeşilyurt, E.B., Kurt, L., Akaydın, G. 2008, A Study on Flora of Hacı kadın Valley (Ankara/Turkey) Biological Diversity and Conservation *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma* 1/2 25-52.

Zoghlami, N., Bouamama, B., Khammassi, M., Ghorbel, A. 2012, Genetic stability of long-term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: perspectives for in vitro conservation. *Ind Crop Prod* 36:59–56

