

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

***IN VITRO* ÇOĞALTILAN VE DOĞAL ORTAMDA
YAYILIŞ GÖSTEREN *DIGITALIS TROJANA* IVAN.
TÜRÜNDE PROGESTERON 5 β -REDUKTAZ GEN
İFADESİNİN VE KARDENOLİD
ÜRETİMİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Nurşen ÇÖRDÜK
Biyoloji
Tezin Sunulduğu Tarih: **10/07/2012**

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Cüneyt AKI

ÇANAKKALE

DOKTORA TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

NURŞEN ÇÖRDÜK tarafından DOÇ. DR. CÜNEYT AKI yönetiminde hazırlanan “*IN VITRO* ÇOĞALTILAN VE DOĞAL ORTAMDA YAYILIŞ GÖSTEREN *DIGITALIS TROJANA* IVAN. TÜRÜNDE PROGESTERON 5 β -REDUKTAZ GEN İFADESİNİN VE KARDENOLİD ÜRETİMİNİN KARŞILAŞTIRILMASI” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Cüneyt AKI

Yönetici

Prof. Dr. Ekrem GÜREL

Jüri Üyesi

Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

Jüri Üyesi

Doç. Dr. K. Melik TAŞKIN

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

Jüri Üyesi

Sıra No:.....

Tez Savunma Tarihi: 10/07/2012

Prof.Dr. İsmet KAYA

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

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

Nurşen ÇÖRDÜK

TEŞEKKÜR

Doktora tezimin hazırlanmasında bilimsel birikimini benimle paylaşan, her aşamada desteğini esirgemeyen danışmanım ve her konuda örnek aldığım Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi, Sayın Doç. Dr. Cüneyt AKI'ya içtenlikle teşekkür ederim. Doktora Tez İzleme Komitesi Üyelerim Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç.Dr. K. Melik TAŞKIN'a moleküler analizler sırasında gerekli olan makine teçhizat ve kimyasal temininde yardımcı olduğu için, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü Öğretim üyesi, Sayın Prof. Dr. Bahattin TANYOLAÇ'a tezimin gelişmesine katkı sağladığı için çok teşekkür ederim. Arazi çalışmalarına katılan, bitki örneklerinin toplanması ve teşhisinde bana yardımcı olan Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Ersin KARABACAK'a çok teşekkür ederim. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim üyesi, Sayın Yrd. Doç. Dr. Barış TUNCEL'e, laboratuvarlarında çalışma imkanı sağladıkları için teşekkür ederim. Tezimin laboratuvar çalışmaları sırasında bana yardımcı olan, Araş. Gör. Dr. Mustafa AY, Araş. Gör. Dr. Özlem EROL, Araş. Gör. Neşe YILMAZ, Nergis KAYA, Tuğba BAGATARHAN'a teşekkür ederim. Tezimde kullandığım haritaların çizimini yapan Coğrafya Bölümü Öğretim Elemanı Arş. Gör. Zahide ACAR DENİZ'e teşekkür ederim.

Ayrıca manevi desteklerini benden esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Çiğdem GÜL, Arş. Gör. Dr. Nurcihan HACIOĞLU ve Arş. Gör. Dr. Sefer DEMİRBAŞ, Ayşe YURDAKUL'a teşekkür ederim.

TÜBİTAK, Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığına (BİDEB), doktora eğitimimi Yurt içi doktora burs programı ile desteklediği için teşekkür ederim.

Tez kapsamında yapılan arazi çalışmalarına gerekli izinleri veren T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü, Edremit Orman İşletme Müdürlüğü ve Milli Park yöneticilerine teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca bana maddi, manevi olarak her zaman destek olan, bana inanan ve her zaman yanımda olan aileme çok teşekkür ediyorum.

Nurşen ÇÖRDÜK

SİMGE VE KISALTMALAR

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
2,4 D	2,4-Diklorofenoksiasetik asit
AKR	Aldo keto reduktaz
B5	Gamborg B5 besin ortamı
BAP	6-Benzil amino pürin
bç	Baz çifti
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	Komplementer DNA
CH_3CN	Asetonitril
cm	Santi metre
CR	Critically Endangered
DEPC	Dietilpirokarbonat
dH_2O	Distile Su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribo Nükleotid Trifosfat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
g	Gram
<i>GAPDH</i>	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
IAA	Indol-3- Asetik Asit
IBA	Indol-3- Bütirik asit
K	Kinetin
KA	Kuru ağırlık
l	Litre
m	Metre
M	Molar
MES	4-Morpholineethanesulfonic acid
mg	Miligram

MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
MS	Murashige Skoog besin ortamı
N	Normal
NAA	Naftalen asetik asit
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
ng	Nano gram
NH ₄ ⁺	Amonyum
nm	nanometre
NO ₃ ⁻	Nitrat
°C	Santigrat Derece
OD	Optik Densite
<i>P5βR</i>	Progesteron 5β-reduktaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	Pikomol
PVP	Polivinilprolidon
rpm	Rotation per minute (Dakika/Devir)
RT-PCR	Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDR	Kısa zincirli dehidrogenaz/reduktaz
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SPE	Katı Faz Ekstraksiyonu
TAE	Tris EDTA Asetat
TDZ	Thidiazuron
TIS	Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemi
Tris	Hidroksimetil Aminometan
UV	Ultraviyole Transilluminator
v/v	Hacim/ hacim
w/v	Ağırlık/hacim
VU	Vulnerable

ÖZET

***IN VITRO* ÇOĞALTILAN VE DOĞAL ORTAMDA YAYILIŞ GÖSTEREN *DIGITALIS TROJANA* IVAN. TÜRÜNDE PROGESTERON 5 β -REDUKTAZ GEN İFADESİNİN VE KARDENOLİD ÜRETİMİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Nurşen ÇÖRDÜK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Doç.Dr. Cüneyt AKI

10/07/2012, 87

Bu tez çalışmasında, Kazdağı endemik bitkisi ve tıbbi öneme sahip olan *Digitalis trojana* Ivan. türününün Mayıs ve Temmuz aylarında Kazdağından farklı yüksekliklerinden toplanan bitki örneklerinde ve *in vitro* üretilen bitki örneklerinde β -kardenolitlerin biyosentezinde kilit role sahip progesteron 5 β -reduktaz geninin ifadesi belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır.

Çalışmada ayrıca *Digitalis trojana* türününün *in vitro* çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Bitkinin yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonunun 0,1 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP içeren MS ortamında meydana geldiği ve bu ortamın türün kısa sürede etkili bir şekilde *in vitro* çoğaltımı için kullanılabilir olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca bitki örneklerinin taban yapraklarındaki kardenolitlerin katı faz ekstraksiyonu yapılmış ve örneklerdeki lanatosit C, digoksin, digitoksin ve gitoksigenin miktarları HPLC ile belirlenmiştir. HPLC analizi sonucunda Temmuz ayında toplanan bitki örneklerindeki kardenolit içeriklerinin (μ g/g KA) Mayıs ayında toplanan bitki örneklerinin içeriklerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bitkilerdeki kardenolid içeriklerinin yüksekliğe göre değiştiği belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda *in vitro* üretilen bitkilerden sadece 1 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP içeren MS besin ortamında üretilen 12 haftalık bitkilerde lanatosit C (10,288 μ g/g KA) ve digoksin (2,068 μ g/g KA) tespit edilebilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Digitalis trojana*, Kazdağları, mikroçoğaltım, kardenolit, progesteron 5 β -reduktaz.

ABSTRACT

COMPARATIVE RESEARCH ON PROGESTERONE 5 β -REDUCTASE GENE EXPRESSION AND CARDENOLIDE PRODUCTION OF *IN VITRO* PROPAGATED AND NATURAL HABITAT PLANTS OF *DIGITALIS TROJANA* IVAN.

Nurşen ÇÖRDÜK

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Science

Chair for Biology Thesis of Philosophy of Doctorate

Advisor: Assoc.Prof.Dr.Cüneyt AKI

10/07/2012, 87

In this research, gene expression of progesterone 5 β -reductase which plays a key role in the biosynthesis of cardenolides, was determined and compared between natural plants collected in May and July from Kazdağı Mountain in different locations and *in vitro* propagated plants of *Digitalis trojana* Ivan. an endemic plant of Kazdağı Mountain.

In addition that, micropropagation of *D. trojana* was carried out. MS medium supplemented with 0,1 mg/l NAA and 3 mg/l BAP can be used as a shoot induction medium from leaf explants.

Cardenolides were extracted from basal leaves of plants by solid phase extraction and lanatoside C, digoxin, digitoxin and gitoxigenin contents in plants determined by HPLC. HPLC analyses show that the plants collected in July presented lanatoside C, digoxin, digitoxin and gitoxigenin (μ g/g dry wt) contents higher than the plants collected in May. Also, cardenolides contents of plants show variations by height. In addition, 12-weeks-old plants that *in vitro* propagated in MS medium supplemented with 1 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP were contained lanatoside C (10,288 μ g/g dry wt) and digoxin (2,068 μ g/g dry wt).

Keywords: *Digitalis trojana*, plant tissue culture, micropropagation, cardenolide, progesterone 5 β -reductase.

İÇERİK

	Sayfa
DOKTORA TEZİ SINAV SONUÇ FORMU	İİ
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
SİMGE VE KISALTMALAR	V
ÖZET	Vİİ
ABSTRACT.....	Vİİİ
BÖLÜM 1- GİRİŞ	1
1.1. Bitki Gen Kaynaklarının Koruma Altına Alınması	2
1.1.1. <i>In Situ</i> koruma.....	2
1.1.2. <i>Ex Situ</i> koruma.....	3
1.1.2.1. Bitki doku kültürü.....	3
1.1.2.1.1. Mikroçoğaltım	5
1.2. <i>Digitalis trojana</i> Ivan. Türünün Genel Özellikleri.....	7
1.2.1. <i>Digitalis trojana</i> türünün tıbbi önemi	8
1.2.2. <i>Digitalis</i> kardenolitlerin yapısı ve biyosentezleri.....	9
1.2.2.1. Progesteron 5 β -Reduktaz geni (<i>P5βR</i>).....	11
BÖLÜM 2- ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	13
BÖLÜM 3- MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Bitkisel Materyalin Toplanması	25
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Doku kültüründe kullanılacak malzemelerin sterilizasyonu	25
3.2.2. Besin ortamlarının hazırlanması ve sterilizasyonu	25
3.2.3. Genel doku kültürü şartları.....	26
3.2.4. <i>Digitalis trojana</i> türünün <i>in vitro</i> mikroçoğaltım aşamaları	26
3.2.4.1. Hazırlık aşaması	27
3.2.4.2. Kültür başlangıç aşaması.....	27

3.2.4.3. Sürgün çoğaltım aşaması	28
3.2.4.4. Sürgün gelişimi ve köklendirme	28
3.2.4.5. İstatistiksel analizler	29
3.2.5. Bitki yaprak dokusundan total RNA izolasyonu	29
3.2.5.1. İzole edilen total RNA'ların elektroforezi.....	29
3.2.5.2. İzole edilen total RNA'ların miktarlarının spektrofotometre ile belirlenmesi.....	31
3.2.6. Komplementer DNA (cDNA) sentezi.....	31
3.2.7. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile cDNA'ların çoğaltılması	32
3.2.7.1. PCR ürünlerinin elektroforezi	33
3.2.8. cDNA'nın jelden geri kazanılması.....	33
3.2.9. RT-PCR ürününün dizi analizi.....	34
3.2.10. Biyoinformatik analizler	34
3.2.11. Progesteron 5 β - Reduktaz gen ifadesinin belirlenmesi	34
3.2.12. Taban yapraklardaki kardenolitlerin ekstraksiyonu ve miktarının yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analizi.....	34
3.2.12.1. Kardenolitlerin katı faz ekstraksiyonu	34
3.2.12.2. HPLC analizi.....	35
BÖLÜM 4- ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	37
4.1. Bitkisel Materyalin Toplanması ile İlgili Bulgular	37
4.2. <i>D. trojana</i> Türünün Mikroçoğaltımı ile İlgili Bulgular	38
4.2.1. Hazırlık aşaması ile ilgili bulgular.....	38
4.2.2. Kültür başlangıç aşaması ile ilgili bulgular	39
4.2.2.1. Kök eksplantı ile ilgili bulgular	40
4.2.2.2. Yaprak eksplantı ile ilgili bulgular.....	42
4.2.2.2.1. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine etkisinin araştırılması ile ilgili bulgular.....	42
4.2.2.2.2. Sürgün rejenerasyonu için uygun besin ortamının seçimi ile ilgili bulgular	49
4.2.3. Sürgün çoğaltım aşaması ile ilgili sonuçlar	50
4.2.4. Sürgün gelişimi ve köklendirme ile ilgili bulgular	52

4.3. Moleküler Analizlere Ait Bulgular	58
4.3.1. RNA izolasyonu ile ilgili bulgular	58
4.3.2. cDNA sentezi ile ilgili bulgular	59
4.3.3. Biyoinformatik analizi ile ilgili bulgular	59
4.3.4. <i>P5βR</i> geninin ifadesi ile ilgili bulgular	63
4.4. Yapraklardaki Kardenolit Miktarının HPLC ile Analizi ile İlgili Bulgular	67
4.4.1. Katı faz ekstraksiyonu ile ilgili bulgular	67
4.4.2. HPLC ile analizi ile ilgili bulgular	67
BÖLÜM 5- SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR	I
EKLER	I
ÇİZELGELER	III
ŞEKİLLER.....	IV
ÖZGEÇMİŞ.....	VII

BÖLÜM 1**GİRİŞ**

Türkiye, coğrafik konumu, jeolojik yapısı, sahip olduğu iklim koşulları, Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan gibi üç ayrı biyocoğrafik bölgeye ve bunların geçiş zonlarına sahip olması gibi birçok özelliği sonucu, çok zengin bir biyoçeşitliliğe sahiptir. Bu genetik çeşitlilik özellikle endemik, nadir, tıbbi ve kültür bitkilerinin tür çeşitliliği ile önem kazanmaktadır. Ülkemizde, çok sayıda önemli kültür bitkisi ve tıbbi bitkilerin çeşitlilik merkezi olan 5 mikro-gen merkezi bulunmaktadır. Ayrıca ülkemiz tahılların ve bahçe bitkilerinin ortaya çıkışında önemli role sahip olan Akdeniz ve Yakın Doğu gen merkezinin kesiştiği noktada yer almaktadır.

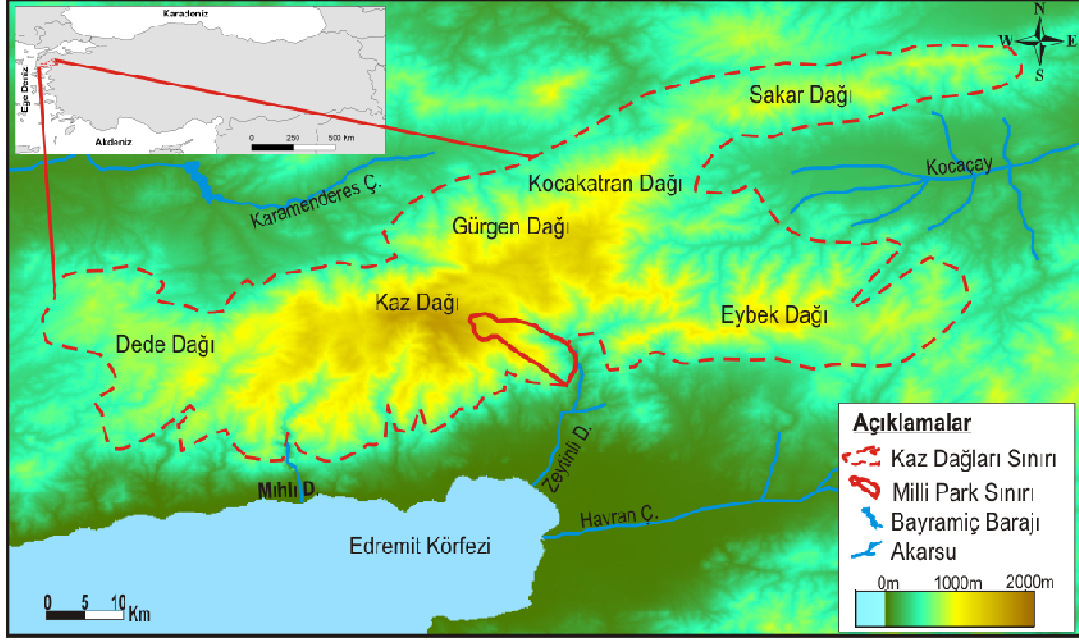
Sahip olduğumuz bu zengin bitki çeşitliliği içerisinde endemik bitki türleri, önemli bir yere sahiptir. Belirli bölgelere uyum sağlamış ve bu bölgeler dışında başka bir yerde yayılış göstermeyen bitki türleri endemik bitki olarak tanımlanmaktadır. Türkiye florası 3925 adet endemik bitki türü ile %34 endemizm oranına sahiptir (Demirayak, 2002; Avcı 2005; Anonim, 2007).

Ülkemizde yayılış gösteren endemik bitki türlerinin bir kısmı geniş yayılış gösterirken bir kısmı ise belirli dağ veya dağ silsileleri gibi dar alanlarda yayılış göstermektedir. Bu yüzden birçok dağ silsilesi endemik bitki tür sayısı bakımından oldukça zengindir. Yüksek endemizm oranına sahip dağlardan biri de, Kuzeybatı Anadolu'da yer alan ve Çanakkale Balıkesir sınırları içerisinde bulunan, Kazdağları'dır (Şekil 1). Marmara ve Ege bölgelerinin doğal sınırını oluşturan Kazdağı silsilesi, Batı-Güneybatı/Doğu-Kuzeydoğu yönünde 60 km boyunca 258.000 hektarlık alana yayılmakta ve Batıda Dededağı, doğuda Eybek dağı, kuzeydoğuda Gürgen, Kocakatran ve Susuz dağları ve ortada Kazdağından oluşmaktadır (Eken ve ark., 2006; Anonim, 2011).

Kazdağları, Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan flora bölgelerinin kesişim alanında yer alması, coğrafik konumu, iklimsel koşulları ve kuzey-güney doğrultuda yaran derin vadi ve kanyonlara sahip olması nedeniyle zengin bir bitki çeşitliliğine sahiptir. Biyoçeşitliliği nedeniyle Kazdağları, önemli bitki alanlarından biri olarak belirtilmektedir (Uysal, 2010; Satıl ve Dirmenci, 2012).

Kazdağlarında 800 bitki taksonu yayılış göstermektedir. Bu türler içerisinde 79 tanesi Türkiye'ye endemik bitki türleridir. Sadece Kazdağlarına endemik tür sayısı ise 32'dir

(Özel ve Gemici, 2001; Satıl, 2009). Bugüne kadar Kazdağlarında belirlenen toplam bitki türü sayısı ve bunların içerisindeki endemik bitki türü sayısı yapılan yeni çalışmalara bağlı olarak sürekli değişim göstermektedir (Satıl ve Dirmenci, 2012).



Şekil 1. Kazdağları haritası. (Özgün)

1.1. Bitki Gen Kaynaklarının Koruma Altına Alınması

Endemik bitki türleri, sadece belirli bir bölgeye özgü yayılım göstermeleri ve popülasyondaki birey sayısında meydana gelen azalmalar nedeni ile tehlike altında kalabilmektedir. Kazdağlarının sahip olduğu biyoçeşitliliğin gelecek nesillere aktarılması, gen kaynaklarının yok olmaması, özellikle kültürü yapılan birçok türün yabancı formlarının kaybolmaması ve bitkisel üretimin sürdürülebilirliği için bu bölgedeki bitki türlerinin koruma altına alınması gerekmektedir.

Bitki gen kaynaklarının koruma altına alınma çalışmalarında genel olarak *in situ* ve *ex situ* olmak üzere iki strateji uygulanmaktadır.

1.1.1. *In Situ* koruma

In situ koruma, korunmaya alınacak türlerin en iyi şekilde kendi ekosisteminde yerinde korunması gerektiğini ve yaşamlarını sürdürebilmelerinin yaşadıkları doğal çevreye bağlı oldukları yaklaşımını temel almaktadır. Bu yüzden *in situ* korumada, bitki türleri buldukları ekosistemde koruma altına alınmakta ve ekosistemlerinde doğal

hallerine bırakılarak dışarıdan müdahale yapılmamaktadır. *In situ* korumada bir tür korumaya alınırken ekosistemde yer alan diğer türlerinde korunması sağlanmaktadır.

In situ koruma stratejisi doğrultusunda koruma alanı olarak belirlenen alanlara; Milli Parklar, Tabiat Parkları, Doğayı Koruma Alanları, Habitat/Tür Yönetim ve İşletme Alanları, Gen Yönetim Zonları, Gen Koruma Ormanları, Doğa Anıt ve Özel Çevre Koruma Alanları örnek verilebilmektedir.

Bu koruma stratejisi, çok geniş alanlara ihtiyaç duyulması ve bazı türlerin bu alanlarda koruma altına alınamaması nedeni ile türlerin korunmasında tek başına yeterli olmamaktadır. Bu yüzden türler, doğal ortamlarda korunmalarının yanı sıra ekosistem dışında yapay ortamlarda da koruma altına alınabilmektedir.

1.1.2. Ex Situ koruma

Ex Situ korumada türler, buldukları ekosistemin dışında yapay ortamlarda koruma altına alınmaktadır. Genetik kaynakların *ex situ* korunması, korunmaya alınacak genetik materyalin çeşidine ve kaynağına bağlı olarak botanik bahçeleri, orijin ve döl deneme alanları, tohum bahçeleri, klon arşivleri, tohum, polen ve DNA bankaları veya doku kültüründe gerçekleştirilmektedir (Engelmann ve Engels, 2001).

Türlerin koruma altına alınmasında, bitki çeşidine, genetik yapısına, kullanılacak materyal çeşidine bağlı olarak en uygun koruma alanı belirlenmeli ve bu alanlarda korunma altına alınmaları gerekmektedir (Balkaya ve Yanmaz, 2001).

1.1.2.1. Bitki doku kültürü

Doku kültürü, aseptik koşullar altında, bir bitkinin hücre, doku, organ, meristem veya embriyo gibi kısımlarının uygun yapay besin ortamında kültüre alınması ile yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesine olanak sağlamaktadır (Babaoğlu ve ark., 2001).

Bitki hücreleri, totipotensi özellikleri sayesinde, meristematik aşamaya dönerek bir hücre tipinden diğer hücre tipine dönüşebilme ve tam organizasyonlu bir bitki oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Meristematik hücreler, embriyonik özelliğe sahip, sınırsız bölünme özelliği gösteren farklılaşmamış hücrelerdir. Hücre dışından gelen sinyallere göre farklılaşmaya yönlendirilerek belirli bir dokuya özgü hücre tipine dönüşebilmektedir. Farklılaşma geçirmiş bir bitki hücresi, hücre membranına ve işlevsel bir çekirdeğe sahip oldukları sürece tekrar meristematik aşamaya geri dönme yeteneğine

sahiptir. Bitki hücrelerinin sahip olduğu bu özellik, totipotensi yani bütünü verme olarak adlandırılmaktadır (Gürel ve Türker, 2001).

Totipotensi özelliğine sahip bitki hücreleri veya dokuları makroelementler, mikroelementler, vitaminler, karbon kaynağı, bitki büyüme düzenleyicileri içeren uygun yapay besin ortamlarında *in vitro* kültüre alınmaları ile organogenezis ya da somatik embriyogenesis aracılığıyla bitki üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Özellikle besin ortamlarına ekzojen olarak ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinin miktarları, çeşitleri ve kombinasyonları, bitkilerin *in vitro* kültüre alınmaları ile bitki veya bitkisel ürünlerin üretiminin gerçekleştirilmesinde en önemli etken olarak belirtilmiştir (Christianson ve Warnick, 1983; Yamaguchi ve ark., 2003; D'onofrio ve Morini, 2006).

Bir bitkinin hücre, doku veya embriyo gibi kısımlarının doku kültüründe kültüre alınması ile belirgin bir organ ortaya çıkmasına kadar geçen sürede, üç ayrı aşamada değerlendirilebilecek olaylar gerçekleşmektedir. Bu aşamalar sırasıyla yeterlilik, kararlılık, morfolojik farklılaşma aşamalarıdır. Yeterlilik aşamasında, ortama konulan bitki hücresi veya dokusu organogenik bir uyarım için belli bir yetenek, yeterlilik kazanmaktadır. Bu aşamada öncelikle olgun eksplant dokusunun tersine farklılaşması gerçekleşmektedir. İkinci aşamada; ortamdaki bitki büyüme düzenleyicilerinin miktarları ve kombinasyonları ile hücreler belirli bir gelişme tipi için şartlandırılmaları yani kararlı bir hale gelmeleri gerçekleşmektedir. Son aşama ise, morfolojik farklılaşma ve gelişmenin tamamlandığı ve belirgin organın gözükmeye başladığı aşamadır (Christianson ve Warnick, 1983, 1984, 1985; Sugiyama, 1999). Bu olaylar, seçilen bitki türüne, eksplant kaynağı olarak kullanılan bitkinin genotipine, fizyolojik durumuna, eksplant çeşidine, kullanılan besin ortamı çeşidine, ortama ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinin miktar ve kombinasyonlarına, sıcaklık, ışık, nem gibi çevresel kültür şartlarına bağlı olarak gerçekleşmektedir (Tran Thanh Van, 1974; Cousson ve Tran Thanh Van, 1981; Monacelli ve ark., 1983; Van Den Ende ve ark., 1984; Tran Thanh Van, ve ark., 1985; Altamura ve ark., 1989).

Bitki doku kültürü, embriyo, kök, meristem, kallus kültürü ve hücre süspansiyon kültürü çalışmaları, somatik melezleme, haploid bitki üretimi, doğada tozlaşması mümkün olmayan türlerin hibridizasyonu, somaklonal varyasyon ve gen transferi gibi bitki ıslahında uygulama alanlarının yanı sıra ticari ve ıslah dışı çalışmalarda, hastaliksız bitki üretimi, mikroçoğaltım, sentetik tohum üretimi ve sekonder metabolit üretimi gibi çok çeşitli doku kültürü çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmaların yanı sıra, özellikle generatif ve vejetatif

yollarla çoğaltılması mümkün olmayan veya zor olan, genetik olarak değeri yüksek olan türlerin ve doğada yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalan bitkisel gen kaynaklarının *ex situ* koruma altına alınması için önemli yöntemlerden biridir. Bitki hücre ve dokularının kültüre alınmasında kullanılan gelişmiş biyoteknolojik yöntemler, değerli, nadir ve endemik tıbbi bitkilerin hızlı çoğaltımına ve korunmasına yeni araçlar sağlamaktadır (Mikulík, 1999; Rout ve ark., 2000).

Bitki türlerinin *ex situ* korumasında uygulanan alanların biri olan bitki doku kültüründe türler, bitkisel materyalin çeşidine göre *in vitro* büyümenin yavaşlatılması, çok düşük sıcaklıklarda dondurularak (kryoprezervasyon) saklama veya *in vitro* çoğaltımı yapılarak koruma altına alınmaktadır.

In vitro büyümenin yavaşlatılması veya azaltılması, kültür ortamının ve koşullarının değiştirilmesi ile kültüre alınan bitkinin canlılığını yitirmeden yavaş büyütülmesi yöntemidir. Besin ortamında mineral madde içeriğinin azaltılması, ortam sıcaklığının azaltılması, sıcaklık ve besin ortamının birlikte değiştirilmesi, gaz alışveriş ortamının değiştirilmesi, ışık miktarının azaltılması ve büyüme engelleyicilerinin ortama ilave edilmesi ile bitkilerin yavaşlatılmış büyütülmesi ve muhafazası gerçekleştirilmektedir (Emeklier, 2001).

Çok düşük sıcaklıklarda dondurularak (kryoprezervasyon) koruma altına alma, bitki türlerine ait olan tohum, embriyo, kallus, gamet veya meristematik dokularının soğukta depolanarak hücre bölünmesi ve buna bağlı büyüme ve diğer bütün biyolojik aktiviteleri tam anlamıyla durdurulması gerçekleştirilmektedir. Canlılığını yitirmeden korunan bitkisel materyalin, ihtiyaç duyulduğu zaman tekrar büyüme ve gelişmesi devam ettirilebilmektedir (Panis ve Lambardi, 2005; Paunescu, 2009).

1.1.2.1.1. Mikroçoğaltım

Bitkilere ait olan meristem dokusu, yaprak, gövde gibi kısımların *in vitro* kültüre alınarak az sayıda başlangıç materyalinden genotipik olarak birbirinin aynısı olan çok sayıda bitki elde etmeye yönelik olarak yapılan çalışmalara mikroçoğaltım adı verilmektedir. Mikroçoğaltım ile kısa bir sürede, dar bir alanda, yetiştirme mevsimine bağlı kalmaksızın, hastaliksız çok fazla sayıda bitki üretimi yapılabilmektedir (Özkaynak ve Samancı, 2003).

İlk olarak 1974 yılında Murashige tarafından, bir bitkinin mikroçoğaltımının 3 aşamada gerçekleşeceği belirtilmiştir. Daha sonra, kültüre alınan eksplantlarda yaşanan

kontaminasyon sorunları nedeniyle Debergh ve Maene (1981) tarafından bu aşamalara ek olarak sıfırıncı aşama eklenmiştir. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla başarılı bir mikroçoğaltımın 5 aşamada gerçekleşebileceği belirtilmiştir (Trigiano ve Gray, 1996). Bu aşamalar sırasıyla; hazırlık aşaması (0), kültür başlangıç aşaması (1), sürgün çoğaltım aşaması (2), sürgün gelişimi ve köklendirme (3), dış ortama alıştırma (4) olarak beş ayrı aşamada gerçekleşmektedir.

a) Hazırlık aşaması:

Hazırlık aşaması, eksplant kaynağı olarak kullanılacak bitkinin seçilmesi ve yetiştirilmesini kapsamaktadır. Eksplant kaynağı olarak kullanılacak bitkinin seçimi, bitkinin genotipi, yaşı, fizyolojik durumu ve yetiştirilme koşulları dikkate alınarak seçilmelidir. Eksplant kaynağı olarak kullanılacak bitkinin seçimi ve kullanımı, diğer aşamalarının başarısını etkileyeceği için hazırlık aşaması çok önemli bir aşamadır.

b) Kültür başlangıç aşaması:

Kültür başlangıç aşamasında, sürgün rejenerasyonu için kullanılacak eksplant çeşidinin seçimi ve sterilizasyonu, bu eksplantların kültüre alınacağı başlangıç ortamlarının ve kültür çevresel koşullarının belirlenmesini içermektedir. Çoğunlukla, apikal ve aksiller tomurcuk kullanılmasına rağmen kök, sürgün ucu, yaprak, çiçek sapı ve gövde eksplantları da kullanılabilir.

c) Sürgün çoğaltım aşaması:

Kültür başlangıç aşamasında teşvik edilen sürgünlerin çoğaltım aşamasıdır. Genel olarak kültür başlangıcı için kullanılan besin ortamı sürgün çoğaltımı için kullanılabilirken bazı durumlarda değişiklik yapılabilir.

d) Sürgün gelişimi ve köklendirme aşaması:

Çoğaltılan sürgünlerin gelişimini ve köklendirilmeleri ile tam bitki eldesini kapsamaktadır. Çoğaltılan sürgünlerin ilk aşamada gelişmeleri gerçekleştirilmektedir. Belirli büyüklüğe gelen sürgünlerin daha sonra köklendirilmesi ve böylece tam bitkinin oluşması gerçekleşmektedir.

e) Dış ortama alıştırma ve saksıya aktarım:

Bu aşamada *in vitro* üretilen bitkilerin dış ortama alıştırılarak saksılara aktarımını gerçekleştirilmektedir. Bitkilerin canlılıklarının saksıda devamı için iyi bir şekilde dış ortama uyum sağlamaları gerekmektedir. Uyum sağlayan bitkilerin son aşamada saksıya aktarımı gerçekleştirilmektedir (Mansuroğlu ve Gürel, 2002).

Mikroçoğaltım yöntemi ile hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal eldesi, fenotip ve genotip yönünden homojen bitkilerin üretimi, ticari süs bitkileri, tıbbi bitkiler, kesme çiçekler, meyve ağaçları ve orman ağaçlarının çoğaltılması gerçekleştirilmektedir (Chaturvedi ve ark., 2007). Ayrıca mikroçoğaltım yöntemi, özellikle doğada yok olma tehlikesi ile karşı karşıya olan endemik ve nadir bitki türlerinin genetik kaynaklarının korunması ve sürdürülebilmesi amacıyla çoğaltılmasına olanak sağlamaktadır (Bramwell, 1990; Klavina ve ark., 1992; Rout ve ark., 2000; George ve ark., 2007).

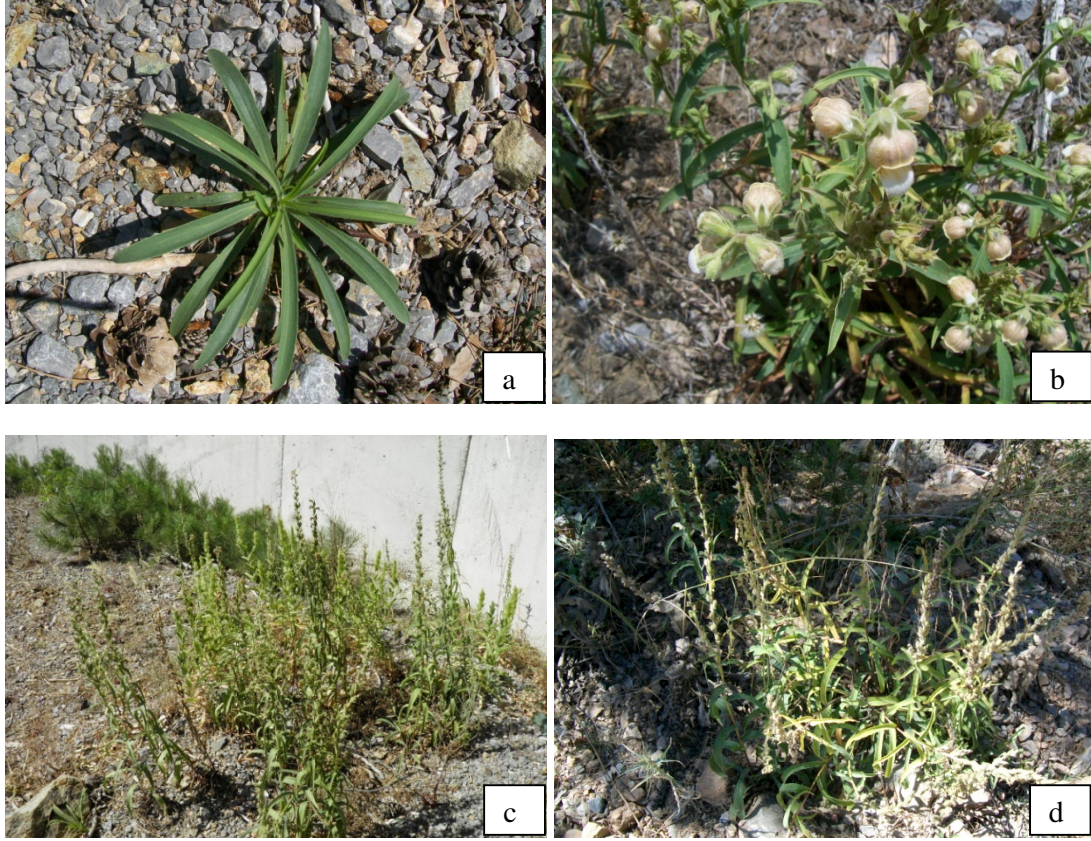
Nadir ve endemik bitki türlerinin genetik kaynaklarının korunmasında, türlerin kısa sürede fazla sayıda üretiminin gerçekleştiği en uygun ve güvenilir çoğaltım yönteminin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Geliştirilen ve optimize edilen *in vitro* koşullarda böylece bir türün *ex situ* koleksiyonu oluşturulabilir ve devam ettirilebilmektedir.

1.2. *Digitalis trojana* Ivan. Türünün Genel Özellikleri

Digitalis cinsi (yüksük otu, arıkovanı), ülkemizde dördü endemik olmak üzere 8 tür ve 2 alttür ile temsil edilmektedir. Bunlar; *Digitalis cariensis* Boiss. Ex Jaub. et Spach, *Digitalis davisiana* Heywood, *Digitalis grandiflora* Miller, *Digitalis lamarckii* Ivan, *Digitalis lanata* Ehrh., *Digitalis trojana* Ivan, *Digitalis viridiflora* Lindley, *Digitalis ferruginea* L. subsp. *ferruginea* L. ve *Digitalis ferruginea* L. subsp. *schischkinii* (Ivan.) Werner türleridir (Davis, 1978).

Son yıllarda yapılan moleküler sistematik çalışmalar ile tekrar gözden geçirilen familyalardan biri olan *Scrophulariaceae* familyası içerisinde yer alan *Digitalis* cinsi, yeni bilgiler doğrultusunda *Plantaginaceae* familyası içerisine dahil edilmiştir (Olmstead ve ark., 2001; Bräuchler ve ark., 2004 Oxelman ve ark., 2005; Albach ve ark., 2005).

Digitalis trojana, Kazdağlarında yayılış gösteren endemik ve tıbbi öneme sahip bitki türüdür. İki ya da çok yıllık otsu bir bitkidir. Bitki, 30-80 cm boyunda olup gövde dik ve silindirikdir. Yapraklar basit, tabanda rozet tipte, dar ve mızraksı yapıda ve sapsızdır. Gövde üzerinde bulunan yapraklar ise basit dizilişli, kuşaksı mızraksı yapıda ve sapsızdır. Çiçek durumu 13-25 çiçekten oluşan bir rasemustur. Kaliks derin 5 parçalı, korolla kırmızımsı kahverengi renkte ve tüpsüdür. Korolla 2 dudaklı olup, alt dudak daha büyük ve sarkıktır. Stamenler petallere bağlı 4 adet olup iki tanesi uzun iki tanesi kısadır. Ovüller çok sayıda ve anatropdur. Meyve septisid kapsül olup üçgenimsi ve uç tarafı sivridir (Uysal ve Öztürk, 1991; Seçmen ve ark., 2000; Dirmenci ve ark., 2007).



Şekil 2. *Digitalis trojana* Ivan. vejetasyon dönemi, Mayıs 2011 (a), çiçeklenme dönemi (b), tohum dönemi (c,d). (Temmuz 2011)

Bitkinin çiçeklenme dönemi Mayıs-Haziran aylarıdır. Kireç açısından fakir, fosforca zengin ve organik maddece çok zengin topraklarda yetişmektedir (Uysal ve Öztürk, 1991). Çalılık yamaçlarda, kireç taşlı uçurumlarda, orman açıklıklarında, boş ve nadasa bırakılmış tarlalarda ve yol kenarlarında yayılış göstermektedir (Davis, 1978). Kazdağı Milli Parkı sınırları içerisinde 90 metreden 1200 metreye kadar yayılış göstermektedir.

D. trojana türünün doğada tükenme riski yüksek olduğundan dolayı Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabına göre zarar görebilir (VU=vulnerable) kategorisinde yer almaktadır (Ekim ve ark., 2000).

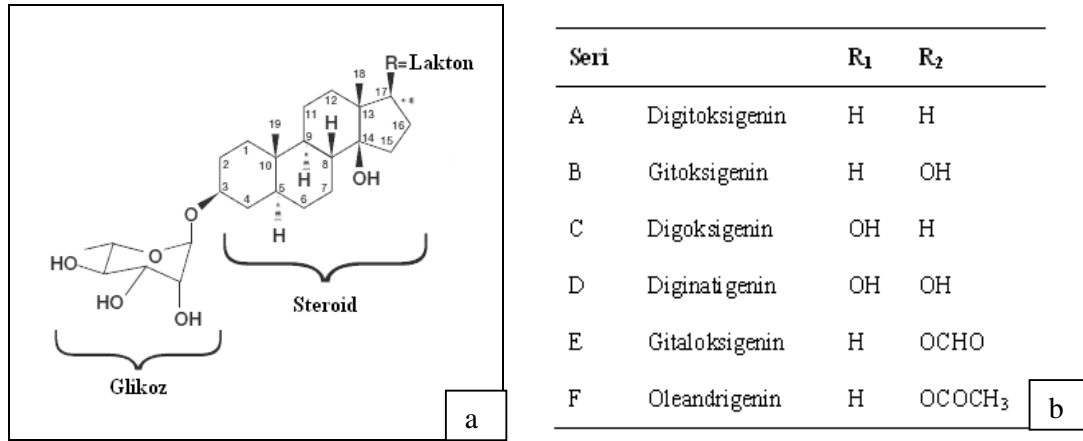
1.2.1. *Digitalis trojana* türünün tıbbi önemi

Digitalis türleri, içerdikleri kardiyoaktif glikozitler (kardenolitler) nedeni ile tıbbi öneme sahiptirler (Clemente ve ark., 2011). Sekonder metabolitlerin en geniş sınıfı olan terpenler içerisinde yer alan kardiyoaktif glikozitler, bitkilerle beslenen birçok memeli ve böcekler üzerinde caydırıcı etki gösteren toksik bileşiklerdir (Taizz ve Zeiger, 2007).

Kardenolitler farmakolojik etkilerinden dolayı kalp hastalarında ve ritim bozukluğu tedavisinde en etkili ilaç olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır (Dec, 2003; Pervaiz ve ark., 2006; Rising ve ark., 2006; Tanker ve ark., 2007). Glikozitlerin temel farmakolojik etkileri, Na^+/K^+ -ATPaz'a bağlanarak çalışmasını inhibe etmeleridir. Na^+/K^+ -ATPazın inhibe olması sonucunda hücre içinde Na^+ konsantrasyonunda artış meydana gelmektedir. Böylece glikozitler sodyumun hücre içerisine geçişini ve Ca^{+2} 'un sitoplazmadan hücre dışına verilmesini azaltmaktadır. Sonuç olarak sarkoplazmik retikulumda daha fazla Ca^{+2} depolanması sonucu miyokard kontraksiyonu gerçekleşmektedir (Langford ve Boor, 1996; Farr ve ark., 2002; Wasserstrom ve Aistrup 2005; Pervaiz ve ark., 2006). Yapılan çalışmalara göre kardenolitler ayrıca nörohormonal ve otonomik rollere sahip olmaları ile de kalp rahatsızlıklarını engellemektedir (Kuate ve ark., 2008). Kardenolitler, kardiyoaaktif etkilerinin yanı sıra anti-kanserojenik, akarsidal ve anti bakteriyel gibi geniş spektrumlu biyolojik aktiviteye sahiptir (Haux, 1999; Huq ve ark., 1999; Al-Rajhy ve ark., 2003; Wiebe ve ark., 2005; Mijatovic ve ark., 2006; Padua ve ark., 2008; Newmann ve ark., 2008).

1.2.2. *Digitalis* kardenolitlerin yapısı ve biyosentezleri

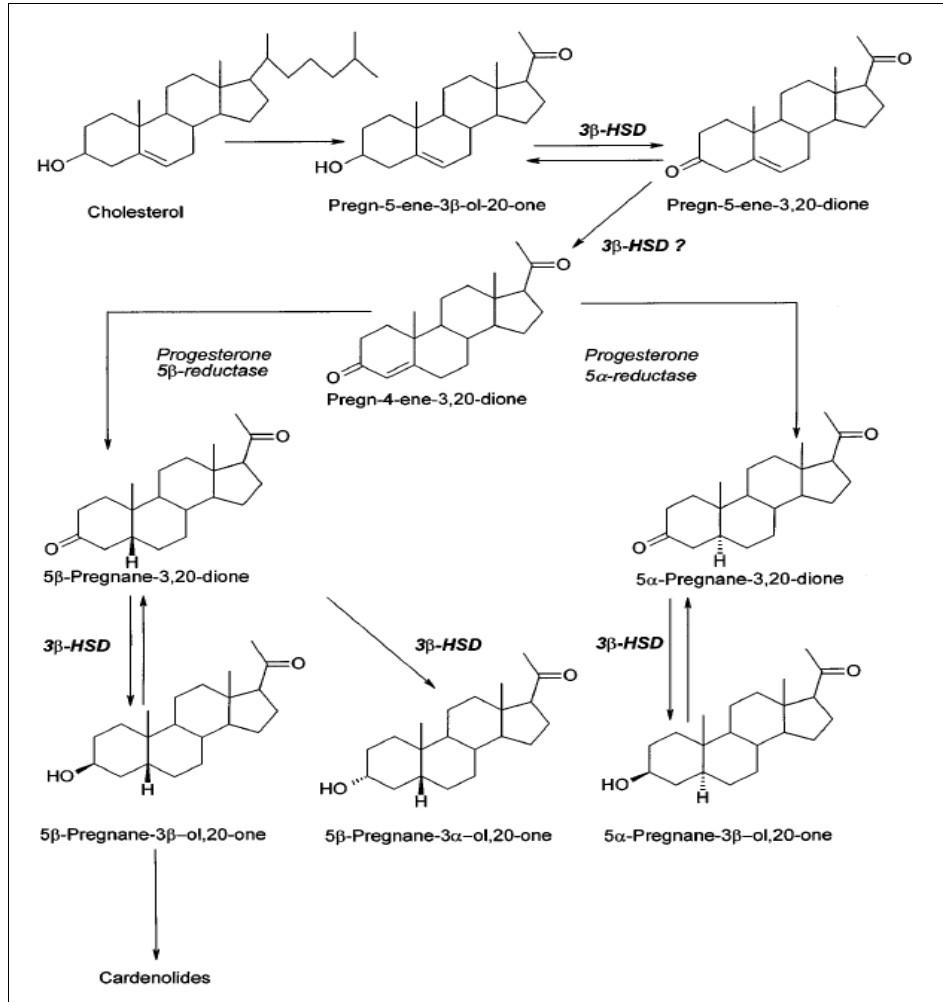
Kardenolitler, steroid halkası, steroid halkasına C17 pozisyonunda cis-trans durumunda bağlı lakton halkalarından ve C3 pozisyonunda bağlanan şeker grubundan oluşmaktadır (Kreis ve ark., 1998; Mijatovic ve ark., 2007; Newman ve ark., 2008). *Digitalis* kardenolitleri C3, C5 ve C17'de β yapısına sahiptirler. *Digitalis* kardenolitleri steroid kısımlarına göre A'dan F'ye kadar 6 seriye (Şekil 3) ayrılmaktadır (Kreis ve ark., 1998).



Şekil 3. Kardiyoaaktif glikozitlerin kimyasal formülü (Newman ve ark., 2008) ve *Digitalis* kardenolit serileri (Kreis ve ark., 1998).

Digitalis türlerinde β -kardenolit biyosentezini katalizleyen yaklaşık 20 enzim tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Lindemann ve Luckner, 1997; Kreis ve ark., 1998). Karakterize edilen bu enzimlere, kardenolit-16'-*O*-glukohidrolaz (Schöninger ve ark., 1998; Framm ve ark., 2000), lanatosit-15'-*O*-asetilesteraz (Kandzia ve ark., 1998) ve Δ^5 - 3β -hidroksisteroid dehidrogenaz (Finsterbusch ve ark., 1999; Lindemann ve ark., 2000) ve progesteron 5β -reduktaz (Roca-Perez ve ark., 2004) örnek verilebilmektedir (Herl ve ark., 2006).

Digitalis kardenolitleri, glikozitik yapıda olan triterpen olup biyosentezleri asetil-CoA ya da glikolitik ara ürünler üzerinden gerçekleşmektedir. Kolesterolün pregn-5-en-3,20-dione daha sonra pregn4-ene-3,20-dione oluşumdan sonra α veya β kardenolitlerin sentezi için biyosentez yolu iki farklı yola ayrılmaktadır (Şekil 4).



Şekil 4. Kolesterolen başlayarak kardenolit biyosentezinin yolu (Finsterbusch ve ark., 1999).

Tıpta tedavi amaçlı kullanılan kardenolitler β formundadır. Singh ve Rastogi, 1970; Melero ve ark., 2000; Kreis ve Müller-Uri, 2010'ye göre 5 β -kardenolitler angiospermilerin 60 cinsinde bulunmaktadır (Bauer, 2010). Tıpta kullanılan kardenolitlerin eldesi için günümüzde de *Digitalis* türleri güvenilir bir kaynak olarak kullanılmaktadır.

Primer glikozitlerde şeker halkası bulunurken, sekonder glikozitlerde şeker halkası hidroliz sonucu yer almamaktadır (Theurer ve ark., 1994). Tedavi edici özellikleri sadece farklı steroid halkasına değil aynı zamanda C3 konumunda bağlanan şekerlerin çeşit ve sayısına da bağlıdır (Pérez-Bermúdez ve ark., 2010).

1.2.2.1. Progesteron 5 β -Reduktaz geni (*P5 β R*)

Kardenolit biyosentezinde görev alan enzimlerden biri de progesterone 5 β -reduktaz enzimidir. Biyosentezde progesteronun 5 β -prenane-3,20-dione dönüşümünü kataliz etmektedir. Biyosentezde kilit role sahip progesterone 5 β -reduktaz enzimi, biyosentez yolunun iki yola ayrıldığı aşamayı katalizleyip β formda kardenolitlerin üretiminde görev almaktadır (Gärtner ve Seitz, 1993; Lindemann ve Luckner, 1997).

Son yapılan çalışmalarda *P5 β R* geni angiospermilerin birçok cinsinde tanımlanmış ve *P5 β R* aminoasit dizilerinin yüksek oranda korunduğu belirlenmiştir. Ayrıca *Digitalis* cinsi içerisinde *P5 β R* geninin dizi analizi ve aminoasit dizileri karşılaştırıldığında yüksek oranda (%95-99) korunduğu belirlenmiştir (Herl ve ark., 2006).

Bitki progesteron *P5 β R* enzimi, kısa zincirli dehidrogenaz/reduktaz (SDR) ailesi içerisinde yer almakta ve Rossman katlamasına sahiptir. Rossman katlamada, tabakanın her iki tarafı heliks yapısına sahiptir (Gavidia ve ark., 2007). 7 korunmuş aminoasit bölgesi ve substrat bağlanma bölgesi içermektedir (Bauer ve ark., 2010).

P5 β R, kardenolitlerin biyosentezinde tanımlanan ilk stereospesifik enzimdir. Kardenolit miktarı ve kardenolit sentez yeteneği, farklılaşma seviyesi ile ilişkili olduğu için, bu enzimin biyosentez yolunun düzenlenmesinde özgün fizyolojik rol oynamakta olduğu belirtilmiştir (Gärtner ve ark., 1994). Ayrıca *P5 β R* enziminin aktivitesi doğrudan kardenolit biyosentezi ile ilişkilendirilmektedir (Gärtner ve ark., 1994; Stuhlemmer ve Kreis, 1996).

Doktora tez çalışmamızda, Kazdağları endemiği olan, kırmızı kitaba göre zarar görebilir kategorisinde yer alan, tıbbi öneme sahip kardenolitleri sentezleyen *Digitalis trojana* türünde kardenolitlerin biyosentezinde rol alan *P5βR* geninin ifade düzeylerinin doğal ortamda yayılış gösteren ve mikroçoğaltım ile üretilen bitkilerde belirlenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bitki örneklerindeki lanatosit C, digoksin, digitoksin ve gitoksigenin gibi kardenolit çeşitlerinin miktarlarının belirlenmesi ve *P5βR* geni ile kardenolit üretimi arasındaki ilişkinin ortaya çıkartılması hedeflenmiştir. Ayrıca türün genetik kaynağının koruma altına alınması amacı ile *in vitro* kültüre alınarak mikroçoğaltımının sağlanması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2**ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

Ülkemizde bitki gen kaynaklarının öneminin anlaşılması ve yok olmamaları için koruma altına alınma çalışmaları ilk aşamada, bireysel çalışmalarla özellikle kültür bitkilerinin gen kaynaklarının belirlenmesi ve toplanması ile başlamıştır. Daha sonra 1963 yılında, koruma çalışmalarının uluslararası standartlara göre yapılabilmesi için gen kaynaklarının belirlenmesi, toplanması ve muhafaza edilmesini düzenlemek amacıyla Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ile bir anlaşma imzalanmış ve 1964 yılında İzmir-Menemen’de bugünkü adı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü olan merkezde koruma çalışmalarına başlanmıştır.

1992 yılında ise ülkemizdeki bitki gen kaynaklarının toplanması, muhafaza ve kullanılması ile ilgili bir yönetmelik çıkarılmıştır. Bu yönetmelik çerçevesinde ülkemizdeki bitki genetik kaynaklarının toplanmasında görev alacak kuruluşlar ve görevleri ile yönetmeliğin uygulama esasları belirlenmiştir (Balkaya ve Yanmaz, 2001). Daha sonra ise, Orman ve Su İşleri Bakanlığı tarafından “Ulusal Biyolojik Çeşitlilik Stratejisi ve Eylem Planı” yayınlanmış (2007) ve bu eylem planında ülkemizdeki biyoçeşitliliği koruma stratejileri ve alanları belirtilmiştir.

Kazdağları ana kütesinin güneyinde, Balıkesir sınırları içerisinde yer alan ve batıda Mıhlı çayı, doğuda Zeytinli Çayı, kuzeyde Karamenderes Çayı ve güneyde Edremit Körfezi arasında bulunan 21.463 hektarlık alan Bakanlar Kurulu’nun 17.04.1993 tarih ve 1993/4243 Sayılı Kararı ile Milli park ilan edilmiş ve 2873 Sayılı Milli Parklar Yasası’na göre koruma altına alınmıştır. Yasa gereği hiçbir üretim faaliyetine izin verilmemekte, ekosistem kendi doğal işleyişine bırakılmaktadır (Anonim, 2011).

Kazdağlarının önemli bitki alanlarından biri olması ve endemizm oranı yüksek bir dağ silsilesi olması sebebiyle bitki türleri üzerine *ex situ* koruma çalışmaları ve doku kültürü çalışmaları yapılmaktadır.

Kazdağlarında yayılış gösteren bitki türlerinin *in situ* koruma çalışmaları, 1993 yılında “Genetik Çeşitliliğin Yerinde Korunma Projesi” ile başlatılmıştır. Birçok tıbbi bitki ve süs bitkilerinin yabancı formları ile ağacı türlerinin (Kazdağı göknarı, karaçam, kızılçam, Toros sediri, Toros göknarı, kestane ve yabancı erik vb.) doğal ekosistemlerinde tespitinin

yapılması ve muhafaza edilmesi amacıyla başlatılan bu proje kapsamında Kazdağları pilot bölgelerden biri olarak seçilmiştir. 1998 yılında tamamlanan proje ile hedef türleri içeren toplam 3232 hektarlık 52 ayrı alan, Gen Koruma ve Yönetim Alanları (GEKYA) olarak belirlenmiş ve yönetim planları hazırlanmıştır. Bu özelliği sonucu Kazdağları Avrupa kıtasının en önemli bitki alanı statüsüne alınmıştır (Velioğlu ve ark., 1999; Gül ve ark., 2006).

1998 yılında çıkan bir yasa ile endemik Kazdağı göknarı (*Abies nordmanniana* subsp. *equi-trojana*) koruma altına alınmış ve yayılış gösterdiği 240 hektarlık alan “Kazdağı Göknarı Tabiatı Koruma Alanı” olarak belirlenmiştir. Bu alanlarda ayrıca kızılçam, karaçam, kestane, meşe ve kayın türleri de koruma altına alınmıştır.

Karabacak ve ark., (2012) Kazdağının pseudo-alpin bölgesinde yayılış gösteren 8 taksonun *ex situ* koruma çalışmasını gerçekleştirmiştir. *Achillea fraasii*, *Allium kurtzianum*, *Allium sibthorpiatum*, *Festuca ustulata*, *Hypericum kazdaghense*, *Iris kerneriana*, *Sideritis trojana* ve *Thymus longicaulis* türlerinin tohumları toplanıp -20°C’de depolanmıştır. Yapılan çalışmada belirli aralıkla tohum canlılık testleri ile kontrollerinin yapıldığı ve çimlendirme deneylerinin yürütüldüğü belirtilmiştir. Ayrıca bitki türlerinin koruma bahçesine aktarımları gerçekleşmiş ve canlılıklarının devamı sağlanmıştır.

Akı ve Çördük (2008), yaptıkları bir çalışmada Kazdağı endemik bitkisi ve CR (çok tehlikede) kategorisinde yer alan *Sideritis trojana* Bornm. türünün *in vitro* çoğaltımını amaçlamışlardır. Bu amaç doğrultusunda, bitkinin yaprak eksplantları farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren (NAA, 2,4-D, BAP, K) MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamında kültüre alınmıştır. Bu ortamlarda kültüre alınan eksplantlardan sürgün farklılaşması meydana gelmiştir. Fakat eksplantların kesik bölgelerinden salınan fenolik bileşiklerin sebep olduğu doku ve ortam kararması sonucunda elde edilen sürgünler gelişim göstermemiştir.

Aynı araştırmacılar (2011), *S. trojana* türünün mikroçoğaltımı sırasında, doku ve ortam kararmasının engellenmesi üzerine askorbik asit, sitrik asit, 4-Morpholineethane sulfonic acid (MES) ve aktif karbonun MS besin ortamına ilave edilmesinin, karanlıkta ön kültüre almanın ve alt kültüre alma süresinin kısa tutulmasının ayrı ayrı etkilerini araştırmışlardır. Araştırmada her bir deneme ayrı ayrı değerlendirildiğinde en etkili uygulamanın, 100 mg/l askorbik asit + 50 mg/l sitrik asitin birlikte MS ortamına ilave edilmesinin olduğu belirlenmiş, ancak kararmanın tamamen önlenemediği belirtilmiştir. Bu yüzden, bu

uygulamaların tek başına yeterli olmadığı bu yüzden farklı uygulamaların birlikte kullanılması gerektiği ortaya konmuştur. Ayrıca türün mikroçoğaltımının başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için ilk aşamada kararma sorunun çözülmesi gerektiği ve böylece etkili bir şekilde gerçekleştirilen mikroçoğaltım ile türün *ex situ* koruma altına alınacağı belirtilmiştir.

Türkmen (2009), Kazdağı florasında bulunan tıbbi ve aromatik bitki türlerinden *Melissa*, *Oreganum*, *Salvia*, ve *Thymus* türlerinin doku kültürüne yanıtlarının belirlenmesi amacı ile yürüttükleri araştırmada, MS temel besin ortamını kullanarak farklı bitki büyüme düzenleyicilerin bu bitki türleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Kekik, oreganum ve oğulotu bitkisinin yetiştiği en uygun ortamın büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besin ortamı olduğu bulunmuştur. Çalışmada bitki türlerinin *in vitro* kültüre alınması ve çoğaltılması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bayram (2010), Kazdağı florasında yetişen oğulotu bitkisinin (*Melissa officinalis* L.) doku kültürüne aktarılması ve doku kültüründe bazı büyüme düzenleyicilerine olan yanıtının saptanması amacı ile yaptığı bir araştırmada eksplant olarak aksiller meristem kullanmıştır. Araştırma sırasında bitki boyu, boğum sayısı, kullanılabilir boğum sayısı, yeşil sürgün ağırlığı, klorofil indeksi, kök gelişim skoru ve uçucu yağ oranı gibi özellikler ölçülmüştür. Bitki büyüme düzenleyicileri karşılaştırıldığında, Benziadenin (BA) ve Kinetin uygulamalarında ise sürgün gelişiminin daha fazla olduğu, Indol-3-bütirik asit (IBA) ve Indol-3-asetik asit (IAA) kullanılan besin ortamlarında ise köklenmenin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Araştırma sonunda, farklı oğulotu genotipleri doku kültürüne başarı ile aktarılmış, çoğaltılmış ve bu *in vitro* bitkiler *in vivo* koşullara aktarılmıştır.

Türkiye’de yetişen *Digitalis* türlerinde glikozitlerin eldesi ve maliyet unsurlarının belirlenmesini amacı ile Tanker ve arkadaşları 1983-1985 yılları arasında bir TÜBİTAK projesi yürütmüşlerdir. Projede Türkiyede yetişen, *D. cariensis*, *D. davisiana*, *Digitalis ferruginea* L. subsp. *schischkinii* (Ivan.) Werner, *D. lamarkii* ve *D. trojana* türlerinin kardenolid içerikleri analiz edilmiştir. Analizler sonucunda ilaç hammaddesi olarak kullanılan kardenolit eldesi için bu türlerin kullanılabilirliği, bir tesis kurulması durumunda üretim maliyeti değerlendirilmiştir. Çalışmada tüm analizler değerlendirildiğinde bu türlerin üretim için henüz yeterli olmadığı bu yüzden üretimde *D.lanata* türünün kullanımının devamının daha uygun olacağı belirlenmiştir (Tanker ve ark., 1985).

Besin ortamlarına aktarılan bitki dokularından rejenerasyonun, seçilen bitkinin türüne, seçilen bitki eksplantı, kültürün çevresel koşulları, besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri gibi birçok faktöre bağlı olduğu ve bu faktörler arasında başlıca role sahip olan bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonları ve kombinasyonlarının bitki rejenerasyonunu yönettiği birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Molnár ve Ördög, 2005; Khanam ve ark., 2000). Özellikle oksin/sitokin oranı *in vitro* morfojenik işlemlerde rejenerasyonu sağlayan en önemli faktör olarak görülmektedir (Christianson ve Warnick, 1983). Yüksek oksin/sitokin oranı genellikle kök oluşumunu teşvik ederken, düşük oksin/sitokin oranı ise sürgün oluşumunu teşvik etmektedir. Diğer taraftan eşit oksin sitokin oranının organize olmamış hücrel çoğalmaya ve kallus oluşumu sağladığı belirtilmiştir (Yamaguchi ve ark., 2003).

Perez- Bermudez ve ark. (1985), *Digitalis obscura* L. türünün kotiledon, hipokotil ve kök eksplantlarını kullanarak *in vitro* organ farklılaşması ve rejenere olan bitkilerin *in vitro* çoğaltımını gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmada, bitki büyüme düzenleyicilerinden özellikle BA'nin NAA veya IAA ile kombinasyonunun, bitkinin kök ve hipokotil eksplantlarından yüksek oranda bitki rejenerasyonunu teşvik ettiği ortaya konmuştur.

Herrera ve ark. (1990), yaptıkları bir çalışmada *Digitalis thapsi* L. türünün sürgün çoğaltımı ve köklendirilmesini tek aşamada gerçekleştirmişlerdir. Sürgün çoğaltımının ve köklendirilmenin aynı oranda bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS ortamında meydana gelmesi için, oksininin (2,4 D, NAA ve IAA) tek başına ve ya sitokin (kinetin, BA) ile farklı kombinasyonlarını denemişlerdir. Yapılan denemeler sonucunda en iyi oranda sürgün çoğaltımı ve oluşan sürgünlerin 4 hafta sonra köklendirilmesi 0,5 mg/l NAA ve 0,1 ya da 0,5 mg/l K içeren MS ortamında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ayrıca bu şekilde yüksek oranda sürgün oluşumu ve kısa sürede türün mikroçoğaltımının gerçekleştirilmesinin kardenolit üretimi için bir sistem olarak kullanılabilir olduğu belirtilmiştir.

Cacho ve ark. (1991), yaptıkları çalışmada *Digitalis thapsi* türünün farklı eksplantlarından (yaprak, kök ve hipokotil) morfojenetik farklılaşma meydana gelmesi için MS ortamına ilave edilen 0, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/l oksinlerin (2,4 D, NAA ve IAA) tek başına ve ya 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mg/l sitokin (kinetin, BA) ile kombinasyonlarının etkilerini araştırmışlardır. Ortama BA'nın 3, 4, 5 mg/l gibi yüksek oranda ilavesi ile yaprak eksplantından kallus oluşumu ve sürgün oluşumu gerçekleşmiştir. Besin ortamına BA'nın 3, 4, 5 mg/l gibi yüksek oranda ilavesi sonucunda kök ve hipokotil eksplantlarından sürgün

oluşumu gerçekleşmiştir. Rejenere olan sürgünlerin köklendirilmesi bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS ortamında gerçekleştirilmiş ve toprağa aktarılan bitkilerin %70'nin canlılıklarını korudukları ve dış ortama uyum sağladıkları belirtilmiştir.

Hoelz ve ark. (1992), *Digitalis lanata* türünün mezofil hücrelerindeki vakuollerde kardenolit birikimini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada, yapraklardan elde edilen protoplast kültüründeki vakuollerdeki glikozit miktarı Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile analiz edilmiş ve lanatosit A ve C gibi temel kardenolitlerin mezofil protoplastlarında ve vakuollerinde depo edildiği belirtilmiştir. Ancak, digitoksin, α -asetildigitoksin ve α -asetildigoksin gibi sekonder metabolitler, yapraklarda tespit edilmesine rağmen protoplastlarda ve vakuollerde tespit edilememiştir. *Digitalis* yapraklarında yalnızca birincil kardenolitlerin depo edildiği, ikincil kardenolitlerin ise biyosentetik aralarda ya da indirgenme ürünü olarak yaprak ekstraktlarında bulunduğu belirtilmiştir.

Gärtner ve ark. (1994), yaptıkları çalışmada, *Digitalis purpurea* sürgün kültüründe progesteron 5 β -reduktaz geninin kısmi protein dizisi ve karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Protein mikrosekanslanması, SDS jelden saflaştırılmış enzimin triptik fragmenti ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kardenolit biyosentezinin düzenlenmesini araştırmak için 5 β -reduktaz enziminin saflaştırılmasının gerekli olduğu belirtilmiştir.

Lindemann ve Luckner. (1997), *Digitalis lanata* türünün somatik embriyogenezisi sırasında farklı gelişim dönemlerinde progesteron ve kolestrol beslemesinin pregnan türevlerinin oluşumu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Ayrıca biyosentezde yer alan kolestrol monooksijenaz, Δ^5 -3 β -hidroksisteroiddehidrogenaz/ Δ^5 - Δ^4 -ketosteroid izomeraz, progesteron 5 β -reduktaz, 3 β -hidroksisteroid 5 β -oksidoreduktaz, 3 α -hidroksisteroid 5 β -oksidoreduktaz, progesteron 5 β -reduktaz ve 3 α -hidroksisteroid 5 β -oksidoreduktaz enzimlerinin aktivitesi belirlenmiştir. Bütün enzimler küresel ve bipolar embriyoların yanı sıra preembriyonik aşamada da bulunmuştur. Progesteron 5 β -reduktaz enzimi, yaprak ve embriyoda 2 mkat kg⁻¹ protein, proembriyonik aşamada ise 4 mkat kg⁻¹ protein oranında GC-MS ile ölçülmüştür. Çalışmada progesteron ile besleme sonucunda 5 α - and 5 β -pregnandione, progesteron, 5 β -pregnane-3 α -ol,20-one, 5 α -pregnane-3 β -ol,-20-one pregnan türevlerinin miktarlarında artış görülmüştür. Kolestrol beslemesi ile ise sadece pregnenolone miktarında çok az artış gözlenmiştir.

Gavida ve Perez-Bermudez (1997), yaptıkları çalışmada *Digitalis obscura* türünün T4 genotipinin sürgün tipi kültüründe, farklı ortam bileşenlerinin kardenolit üretimi ve *in vitro* morfogenez üzerine etkisini belirlemişlerdir. Çalışmada, bitkinin aksiller tomurcukları, 1 µM BA içeren MS makro ve mikro elementleri içeren bazal besin ortamında kültüre alınmıştır. Oluşan sürgünler, ½ ve ¼ oranında MS makro elementler içeren bazal besin ortamında ve farklı NO₃/NH₄⁺ oranı içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Kültürde gelişen sürgünlerde sekonder metabolit miktarları kültürden 4 ay sonra ölçülmüştür. Makro elementlerin azaltılmış seviyelerini içeren ortamda büyüyen sürgünlerde kardenolit birikiminde artış gözlenmiştir. NO₃/NH₄⁺ oranının 2/1 ve 4/1 olarak ortama ilave edilmesi sonucunda ise sürgünlerdeki kardenolit miktarı kontrol ile benzer oranda olduğu bulunmuştur. 1/1 NO₃/NH₄⁺ oranında ise kardenolit miktarında yüksek oranda azalma gözlenmiştir.

Gavida ve Perez-Bermudez (1997), yaptıkları bir diğer çalışmada, *Digitalis obscura* T4 genotipinin MS bazal besin ortamına 2x, 3x oranında ilave edilen fosfat konsantrasyonunun ve 10 ve 100 oranında ilave edilen mangan konsantrasyonunun kardenolit içeriğine etkilerini araştırmışlardır. Türün sürgün rejenerasyonun gerçekleştirilmiş ve üretilen 9 ve 24 aylık *in vitro* bitkilerin ve doğal bitkilerin kardenolit içerikleri HPLC ile karşılaştırılmıştır. Fosfat ve mangan konsantrasyonunun değiştirilmesinin üretilen bitkilerin kardenolit içerikleri üzerine önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Braga ve ark. (1997), *Digitalis lanata* türünde bitki yaşının (12 ve 18 aylık bitkiler) temel kardenolit içerikleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Dış ortamda yetiştirilen çiçeklenme dönemindeki 12 aylık bitkilerin ve çiçeklenme dönemi sonrası 18 aylık bitkilerin rozet yapraklarındaki kardenolit içeriklerinin HPLC ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda genel olarak analiz edilen kardenolitlerin 12 aylık bitkilerdeki içeriklerinin 18 aylık bitkilere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Lanatosit C ve digoksinin her iki bitkide temel kardenolit olduğu belirlenmiştir.

Eisenbeiß ve ark. (1999), *Digitalis lanata* türünün sürgün kültürünün ışık ve karanlıkta gerçekleştirilmesinin kardenolid birikimi üzerine etkisini araştırmışlardır. *D. lanata* sürgün kültürü 1 mg/l BAP ve 0,1 mg/l IAA içeren MS ortamında devamlı ışık koşullarında ya da karanlıkta büyütülmüştür. Sürgünlerin içerdikleri kardenolitlerin analizi HPLC ile gerçekleştirilmiştir. Devamlı ışık koşullarında kültüre alınan sürgünlerde kuru ağırlık başına 0.6 µmol'den fazla biriktiği tespit edilmiştir. Bu sürgünlerin devamlı

karanlık ortama aktarılması ile kardenolit miktarlarında dereceli olarak azalma görülmüş ve 12 hafta sonra tespit edilemez düzeye indiği belirlenmiştir. Bu sürgünlerin tekrardan ışık koşullarına aktarılması ile kardenolit birikimi başlamış ve 4 hafta sonra devamlı ışık koşullarında kardenolit düzeyinin kültüre alınan kontrol sürgünlerle aynı seviyeye ulaştığı ortaya konmuştur.

Rothe ve ark. (1999), yaptıkları bir çalışmada floem spesifik kardenolitlerin alımını araştırmak için *Cuscuta sp.* (küsküt) parazit bitkisi kullanmışlardır. Çalışmada *D. purpurea* ve *D. lanata* türleri yüksek bitkiler üzerinde parazit olarak yaşayan *Cuscuta europaea*, *C. platyloba* and *C. reflexa* türleri ile enfekte edilmiştir. Parazit bitkiler ile *D. purpurea* bitkisinin ilk yıl petiolleri, ikinci yıl ise *Digitalis lanata* and *Digitalis purpurea* bitkilerinin gövdesi enfekte edilmiştir. 4 hafta sonra parazit bitki, konakçı bitkiden dikkatli bir şekilde alınmıştır. Parazit bitkinin kısımları ve konakçı bitkinin enfekte olan bölgesi ve enfekte olmayan bölgesi alınıp kardenolit içerikleri HPLC ve TLC ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre konakçı ve parazit bitkilerinin kardenolit içeriklerinin farklı olduğu belirlenmiştir. *D. lanata* bitkisinin gövdesinde temel kardenolit olarak glikodigifukosid, odorobiyosid G, glikoverodoksin, lanatosit C ve lanatosit A belirlenmiştir. *D. purpurea* türünün yaprak ve gövdesinde ise en fazla rastlanan kardenolit olarak purpureaglikosid A ve digitoksin ile birlikte purpureaglikosid B, gitoksin, glikogitaloksin ve gitaloksine rastlanmıştır. Parazit bitkinin sürgünlerinde ise en fazla miktarda strospesid ve verodoksin kardenolitlerine rastlanmıştır.

Framm ve ark. (2000), yaptıkları çalışmada kardenolit biyosentezinde görev alan 16'-*O*-glikohidrolaz (*CGHI*) geninin cDNA'sının izolasyonunu ve klonlanmasını gerçekleştirmişlerdir. 16'-*O*-glikohidrolaz enzimi kardenolit biyosentezinde primer glikozitlerin sekonder glikozitlere dönüşümünü katalizlemektedir. Çalışmada *Digitalis lanata* türünden izole edilen *CGHI* geninin cDNA'sının *E.coli*'de klonlanması ve fonksiyonel ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, *CGHI* glikohidrolaz familyasının yüksek homoloji gösterdiği belirtilmiştir.

Sales ve ark. (2002), endemik *Digitalis minor* türünün mikroçoğaltımı üzerine yaptıkları araştırmada, bitkinin aksiller ve adventif tomurcuk eksplantlarından sürgün oluşumunu farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda gerçekleştirmişlerdir. Eksplantlar 0, 4.4, 8.9 ve 22.2 µM BA; 0,0.06 ve 0.6 µM IAA'nın tek ya da kombinasyonlarını içeren MS bazal besin ortamında kültüre alınmıştır. BA tek başına adventif tomurcuk farklılaşmasını yönettiği belirtilmiş ve IAA ile BA'nın her ikisinde

ortamda bulunmasının ise eksplantlardan tomurcuk oluşma kapasitesini önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir.

Gavidia ve ark. (2002), *Digitalis purpurea* türünde kardenolid biyosentezinde görev alan *DpAR1* ve *DpAR2* genlerinin klonlaması ve ekspresyonunun belirlenmesi ile ilgili yaptıkları araştırma sonucunda, her iki genin %98.4 oranında benzerlik gösterdiğini ve 315 aminoasit kodladıklarını belirlemişlerdir. Araştırmada ayrıca yaralanma, yüksek tuz konsantrasyonu, kuraklık stresi ve ısı şoku uygulamasının *DpAR* genlerinin ekspresyon seviyelerini değiştirdiği ortaya konmuştur.

Gavidia ve ark. (2002), çalışmalarında *Digitalis* türleri dışında kardenolit içeren *Isoplexis* türlerinin kardenolit içeriklerinin belirlenmesi için LCN-MR analizini kullanmışlardır. Çalışmada *in vitro* üretilen *Isoplexis canariensis*, *I. chalcantha* and *I. isabelliana* türlerine ait bitki örneklerindeki kardenolit miktarları LCN-MR analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonucunda üç türdeki ürün miktarları benzer bulunmuş ve temel olan uzarigenin, digitoksigenin, xysmalogenin ve kanarigenin belirlenmiştir.

Roca-Perez ve ark. (2004), tarafından yapılan bir çalışmada, İspanya İber Yarımadası'nın 3 ayrı biyoklimatik bölgesinde yayılış gösteren 10 ayrı *Digitalis obscura* doğal populasyonlarının kardenolit üretimleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca bu populasyonların kardenolit üretimlerinin mevsimsel değişimi de belirlenmiştir. Bunun yanı sıra *P5βR* geninin mevsimsel ifadesine bakılmıştır. 10 ayrı *Digitalis obscura* doğal populasyonlarının kardenolit üretimleri karşılaştırıldığında toplam kardenolit içeriği en yüksek Ayora populasyonu (2257 µg/g KA), en düşük ise Camporrobles (964 µg/g KA), Olocau (895 µg/g KA) ve Toro (704 µg/g KA) populasyonları olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada *P5βR* geninin mevsimsel ifadesini belirlemek için 10 ayrı populasyon içerisinden en yüksek (Ayora) ve en düşük (Toro) kardenolit üreten populasyonlarına ait bitki örnekleri Şubat, Mayıs, Temmuz ve Ekim aylarında toplanmıştır.

Herl ve ark. (2006), tarafından yapılan bir çalışmada ilk kez *Digitalis lanata* Ehrh. türünde *P5βR* geninin moleküler klonlanması ve heterolog ekspresyonu rapor edilmiştir. Çalışmada bitkinin yapraklarından tam uzunlukta cDNA klonu izole edilerek okuma çerçevesinin 1170 nukleotid içerdiği ve 389 aminoasit kodladığı belirlenmiştir. *D. lanata* türünün *P5βR* cDNA ve protein dizisi *D. purpurea* ve *D. obscura* türlerinin dizileri ile karşılaştırıldığında *P5βR* geninin *Digitalis* cinsi içerisinde yüksek oranda korunduğu belirtilmiştir.

Gavidia ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada, *D. purpurea* türünde *P5βR* geninin saflaştırılmasını ve bu genin kodladığı polipeptid dizisini belirlemişlerdir. *D. purpurea* türünde *P5βR* geninin 5'RACE PCR reaksiyonu ile tam uzunlukta cDNA elde edilmiştir. Elde edilen cDNA'nın, 1357 bç okuma çerçevesi, 389 aminoasit kodladığı, moleküler ağırlığının 43,963 Da olduğu, 76 bç uzunlukta intron içerdiği belirlenmiştir. Yaprak, kök, gövde, çiçek ve iletim demetlerinde gen anlatım seviyesinin kardenolit birikimi ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca BLAST 2 programı ile karşılaştırıldığında, bitki progesteron *P5βR* enziminin SDR ailesine ait olduğu bunun yanı sıra hayvanlarda bulunan *P5βR* enziminin ise Aldo keto reduktaz (AKR) süper familyasına ait olduğundan dolayı yapısal homoloji göstermedikleri belirtilmiştir.

Herl ve ark. (2008), 21 *Digitalis* ve *Isoplexis* türünün filogenetik analizlerini progesteron 5β-reduktaz genini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Progesteron 5β-reduktaz geninin markör olarak kullanılabilirliği nükleer ITS ve plastid trnL-F sekansları ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Çalışmada filogenetik analiz için *P5βR* gen dizisini değerlendirilmesi, daha önce sistematik olarak test edilen cins ve gruplar arasındaki filogenetik ilişkinin ortaya çıkarılması ve doğruluğunun kanıtlanması amaçlanmıştır. Progesteron 5β-reduktaz geninin okuma çerçevesinin yaklaşık 1170 nükleotid uzunluğunda, yaklaşık 389 aminoasit kodladığı belirlenmiştir. Çalışmada, progesteron 5β-reduktaz geninin yüksek korunduğu sadece *Digitalis* cinsinde değil, *Arabidopsis* türünde de belirlenmiştir. Sonuçlar toplu bir şekilde değerlendirildiğinde, *P5βR* geninin kuvvetli filogenetik hipotez verecek düzeye ulaşmadığı belirtilmiştir.

Kuate ve ark. (2008), *Digitalis purpurea* türünde kardenolit biyosentezinde yer alan 21-hydroxypregnane 21-O-malonyltransferase (Dp21MaT) enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmişlerdir. Yaprak, hücre süspansiyonu gibi farklı materyallerden enzimin eldesi karşılaştırılmış ve en iyi kaynağın yapraklar olduğu belirlenmiştir. Jel filtrasyonu ve doğal SDS-PAGE ile enzimin monomer olduğu ve 27kDA moleküler ağırlığa sahip olduğu belirlenmiştir. Enzimin en fazla aktiviteyi, 42°C'de pH 6.5'da gösterdiği ortaya konmuştur.

Pérez-Bermúdez ve ark. (2009), yaptıkları bir çalışmada *P5βR2* geninin fonksiyonunu ve düzenlenmesini *P5βR* geni ile karşılaştırılarak ortaya koymuşlardır. *Digitalis purpurea* cDNA kütüphanesinden *P5βR2* izole edilmiş ve biyokimyasal, yapısal ve fizyolojik düzeyde karakterize edilmiştir. Çalışmada yaralanma, ısı şoku, soğuk şoku ve tuz stresi ve kimyasal uygulaması gibi stres koşullarında *P5βR* geninin ekspresyon

seviyesinde bir değişiklik gözlenmezken, *P5βR2* geninin soğuk, yüksek tuz, ısı şoku ve yaralanmaya karşı duyarlı olduğu belirtilmiştir. Salisilik asit, H₂O₂, etilen ve metil jasmonat gibi elisitörler kullanılması ile *P5βR* ve *P5βR2* geninin ekspresyonu karşılaştırıldığında, *P5βR* geninin ekspresyonunun devamlı olduğu görülürken *P5βR2* geninin ekspresyonunun ise H₂O₂ ve etilen ile düzenlendiği belirtilmiştir.

Pérez-Alonso ve ark. (2009), *Digitalis purpurea* türünde geçici daldırma biyoreaktör sistemi (TIS) kullanarak kültürdeki sürgünlerdeki digitoksin, digoksin ve lanatosit C içeriklerini belirlemişlerdir. En fazla biyokütle artışının 4 saatte bir daldırma yapılması olduğu bulunmuştur. HPLC analizi sonucunda digoksin ve digitoksin bütün uygulamalarda belirlenirken, lanatosit C'ye rastlanmamıştır. Çalışmada geçici daldırma sisteminin kardenolitlerin sürekli üretimi için kullanılabilir bir yöntem olduğu belirtilmiştir.

Bauer ve ark. (2010), Brassicales, Gentianales, Lamiales, Malvales, Solanales sınıflarından *P5βR* geninin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada *P5βR* genine ait polipeptid dizisi karşılaştırıldığında yüksek oranda korunduğu belirtilmiştir. Ayrıca protein modelinin 7 korunmuş aminoasit bölgesi ve substrat bağlanma bölgesi içerdiği belirlenmiştir.

Ghanem ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada *D. lanata*, sürgün uçlarını *in vitro* bitki rejenerasyonu için NAA ve Kinetinin farklı konsantrasyonlarını içeren MS ortamında kültüre almışlardır. *In vitro* ve *in vivo* iki aylık bitkilerin digitoksin ve digoksin içerikleri karşılaştırılmıştır. Bunun yanı sıra rejenere olan bitkilerdeki kardenolit içeriklerine salisilik asit, polisakkarit ve kalsiyum klorid farklı konsantrasyonlarının etkisi belirlenmiştir. 0.5 mg/l NAA ve 0.1 mg/l K içeren MS ortamının en iyi ortam olduğu belirlenmiştir. Digitoksin içeriği *in vitro* bitkilerde en yüksek seviyede iken, digoksin miktarı *in vivo* 2 aylık bitkilerde daha yüksek miktarda içerdiği belirlenmiştir. Özellikle % 0.1 polisakkarit ilavesi, toplam kardenolit miktarının yükselmesine neden olmuştur. 200mM kalsiyum klorit ilavesi ile en yüksek digitoksin ve digoksin miktarı HPLC ile tespit edilmiştir.

Gürel ve ark. (2011), *Digitalis davisiana* Heywood türünün *in vitro* rejenerasyonunu geliştirerek üretilen *in vitro* bitkilerin lanotosit C ve digoksin içeriklerini doğal bitkilerle karşılaştırmışlardır. Sürgün rejenerasyonu için ilk aşamada bitki büyüme düzenleyicilerinden TDZ ve IAA'in B5 ortamında en uygun kombinasyonları belirlenmiştir. İkinci aşamada bazal besin ortamlarını karşılaştırmak için bitkinin hipokotil,

yaprak, kök, flamingo gagası eksplantları ve 0,5 mg/l TDZ ve 0,25 mg/l IAA ilave edilmiş 6 farklı ortamda (B5, MS, MM, CP, LS ve SH) kültüre alınmıştır. Sürgün rejenerasyonu için 0,5 mg/l TDZ ilavesinin, TDZ ortama tek başına ilavesi ya da IAA ile birlikte düşük oranda ilavesinden (0,10 ya da 0,25 mg/l) daha etkili olduğu belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca sürgün rejenerasyonunun, 0,5 mg/l TDZ ve 0,25 mg/l IAA içeren LS ortamında kültüre alınan flamingo gagası ve hipokotil eksplantlarında daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Verma ve ark. (2011), *Digitalis lamarckii* Ivan. türünün kotiledon yapraklarından indirekt somatik embriyogenesis ve sürgün rejenerasyonu gerçekleştirmişlerdir. Bu doğrultuda, embriyonik ve organogenik kallus teşviki için 3 haftalık *in vitro* çimlendirilen bitkilerden alınan kotiledonları, 0,54 µM NAA ve 2,22 µM BAP, 2,69 µM NAA ve 2,22 µM BAP içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Somatik embriyo ve adventif sürgün oluşumu için NAA ve BAP'ın farklı kombinasyonları denenmiştir. Somatik embriyo sayısı en fazla 1,34 µM NAA ve 8,87 µM BAP ilave edilmiş MS ortamında belirlenmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonu ise, 2,69 µM NAA ve 8,87 µM BAP ilave edilmiş MS ortamında elde edilmiştir. Rejenere edilen bitkiler saksılara aktarılması ve dış ortama uyum sağlayarak canlılıklarını korumaları başarılmıştır.

Munkert ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada progesteron 5β-reduktaz geninin ve enziminin *Brassicaceae* familyasında yer alan *Erysimum crepidolium* türünde tanımlanmasını gerçekleştirmişlerdir. Bu doğrultuda progesteron 5β-reduktaz geninin cDNA'sı 5'/3' RACE ile elde edilmiş ve çoğaltılmıştır. cDNA'sının 1170 bp uzunluğunda olduğu ve 389 aminoasit kodladığı belirlenmiştir. cDNA'nın PCR2.1-TOPO klonlama vektörüne yerleştirilmiş, *E.coli* Top 10 hücrelerine klonlanmıştır.

Verma ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada *Digitalis trojana* Ivan. hipokotil eksplantlarından somatik embriyo eldesini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada, somatik embriyogenezis için sitokin (BAP, kinetin, TDZ, zeatin) tek başına veya IAA, IBA ve NAA kombinasyonları denenmiştir. Bitki büyüme düzenleyicileri karşılaştırıldığında 1 mg/l thidiazuronun (TDZ) besin ortamına ilave edilmesi ile eksplant başına düşen embriyo sayısı 10,7 olarak hesaplanmıştır. 1 mg/l TDZ'nin 0,5 mg/l IAA ile birlikte ortama ilave edilmesi ile eksplant başına düşen embriyo sayısının 13,8 olduğu belirlenmiştir. Somatik embriyoların gelişimi ½ MS ortamında meydana gelmiş ve somatik embriyoların gelişmesiyle elde edilen bitkiler başarılı bir şekilde dış ortama aktarılmış ve çevre koşullarına uyum sağlamıştır.

Perez-Alonso ve ark. (2012), *Digitalis lanata* türünde kardenolit biyosentezi için elisitorlerin etkisi araştırmışlardır. Chitoplant, silioplant ve metil jasmonat elisitörlerinin geçici daldırma yönteminde *D. lanata* sürgün kültüründe biyokütle ve kardenolit birikimine etkisi araştırılmıştır. HPLC ile analiz sonucunda 0.1 g/l chitoplant uygulanması ile 316 µg/g KA, 0.01 g/l silioplant uygulaması ile 310 µg/g KA lanatosit C belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca elisitör uygulaması ile sürgünlerdeki lanatosit C içeriğinin kontrole göre 2,2 kat arttırdığı belirlenmiştir.

BÖLÜM 3**MATERYAL ve YÖNTEM****3.1. Bitkisel Materyalin Toplanması**

Digitalis trojana türüne ait bitki örneklerinin toplanması için, Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nden alınan izin ile 2011 yılının Mayıs ve Temmuz aylarında birer kere olmak üzere Kazdağları Milli Parkına arazi çalışması yapılmıştır. Yapılan arazi çalışmaları sırasında deneme bitkileri, dört farklı yükseklikten (836m, 961m, 1047m ve 1191m) her bir lokaliteden 5'er adet olacak şekilde toplanmış ve laboratuvara getirilene kadar zarar görmemeleri için nemli ortamda muhafaza edilmiştir.

Bitkilerin toplandığı yükseklikler ve koordinatlar GPS (Garmin eTrex Venture HC) cihazı ile belirlenmiş ve kayıt altına alınmıştır. Bitki örnekleri yayılış gösterdikleri alanlarda Olympus (SP-800UZ) fotoğraf makinesi ile fotoğraflandırılmıştır.

3.2. Yöntem**3.2.1. Doku kültüründe kullanılacak malzemelerin sterilizasyonu**

Doku kültürü çalışmalarının aseptik koşullar altında gerçekleştirebilmesi için kullanılacak tüm malzemeler, hazırlanan besin ortamları, kullanılacak bitki tohumları uygun sterilizasyon yöntemleri ile sterilize edilmiştir.

Çalışma sırasında kullanılacak tüm cam malzemeler, kültür kapları, petri kapları ve fayanslar öncelikle deterjan ve sodyum hipoklorit ilave edilen su ile yıkanarak organik maddelerden arındırılmıştır. Daha sonra aliminyum folyo ile etrafları sarılarak otoklavda (SANYO) 121°C'de 1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Kullanılacak pensler ve bisturiler cam boncuklu sterilizatör (Steri 350) ile steril edilmiş ve aktarım işlemi sırasında % 70'lik etil alkole batırılıp alevden geçirilerek steril koşulların devamı sağlanmıştır.

3.2.2. Besin ortamlarının hazırlanması ve sterilizasyonu

Besin ortamı olarak, 4,4 g/l Murashige ve Skoog (1962) bazal besin ortamı (Sigma-S5519) ve 3,2 g/l Gamborg B5 (Gamborg, 1968) bazal besin ortamı kullanılmıştır. Besin ortamı içerikleri ekler bölümünde verilmiştir (Ek 1). Bazal besin ortamları ve %3 (w/v) sükröz (Sigma-5391), dH₂O içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde çözündürülmüştür. Ekler

bölümünde belirtildiği gibi 1mg/ml olacak şekilde stok olarak hazırlanan bitki büyüme düzenleyicileri uygun miktarlarda ortama ilave edilmiştir. Ortama ayrıca 2 mg/l PVP (polivinilprolidon) eklenmiştir. Daha sonra ortamın pH'ı 1N NaOH veya 1N HCl ile 5.75 ayarlanmıştır. %0,7 (w/v) agar ilave edilmiş ve son hacim dH₂O ile tamamlanmıştır. Hazırlanan besin ortamı, 121°C'de 1 atmosfer basınçta 15 dakika boyunca otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Büyük hacimli şişelerde hazırlanan ve sterilize edilen besin ortamları petri kaplarına 20 ml, kültür kaplarına ise 25-30 ml olacak şekilde eşit miktarda dağıtılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız besin ortamlarının tümüne otoklavlamadan önce agar eklendiğinden dolayı, ortam henüz sıcak halde iken (55-60°C) daha önceden steril edilmiş olan kültür kaplarına kabin içerisinde aktarılmıştır. Eksplantlar ve sürgünler petrilere aktarıldıktan sonra petrilerin etrafı streçfilm ile kuşatılarak dış ortamdan izole edilmiştir.

3.2.3. Genel doku kültürü şartları

Doku kültürü uygulamalarının tümü aseptik koşullar altında yapılabilmesi için *in vitro* kültür çalışmalarının tümü Dan-Laf (VFSS-1206) steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya başlamadan 30 dakika önce, kabinin iç kısmı %70'lik etanol ile silinmiştir. Kabinin UV lambası açılarak 15 dk bekletilmiştir. Daha sonra kabin 30 dakika boyunca içerisinde malzeme olmadan çalıştırılmıştır. Kullanılacak steril malzemeler kabin içerisine yüzeylerine %70'lik etil alkol püskürterek alınmıştır.

Çalışma esnasında eksplantların ya da sürgünlerin kültür kaplarına aktarımı sırasında kullanılacak steril pensler ve bisturiler, etil alkole batırıldıktan sonra kabin içerisinde sürekli yanan alkol ocağının alevine tutularak yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Kültür kaplarının ve petri kaplarının etrafı alevden geçirilerek aktarım yapılmıştır.

Hazırlanan bütün *in vitro* kültür denemeleri, 16/8 saat fotoperiyoda, 25±2°C ve 72 µmol m⁻²s⁻¹ ışık yoğunluğuna ayarlanmış ve %55-60 nem oranına sahip bitki yetiştirme odasında gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan kültür ortamlarına aktarılan eksplantlardaki değişimler Olympus (SZ51) stereo mikroskop ile günlük olarak incelenmiş ve Olympus (SP-800UZ) fotoğraf makinesi ile fotoğraflandırılmıştır.

3.2.4. *Digitalis trojana* türünün *in vitro* mikroçoğaltım aşamaları

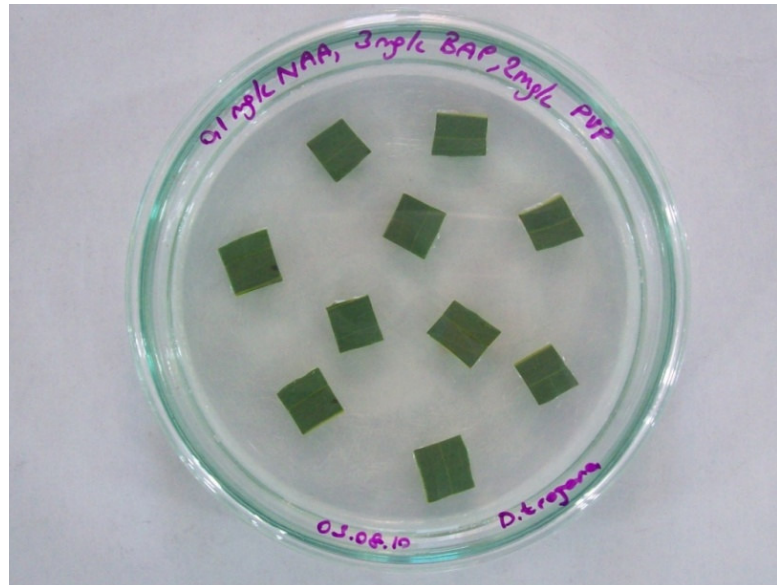
Çalışmamızda *D.trojana* türünün mikroçoğaltımı, hazırlık aşaması, kültür başlangıç aşaması, sürgün çoğaltım aşaması, sürgün gelişimi ve köklendirme olarak 4 ayrı aşamada gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1. Hazırlık aşaması

Çalışmamızın hazırlık aşamasında, eksplant kaynağı eldesi gerçekleştirilmiştir. Araziden toplanan bitkilerin tohumların *in vitro* çimlenmesi ve steril bitki elde edilmesi gerçekleştirilmiştir. Bitkinin tohumları, yüzey sterilizasyonundan önce tohum kabuğunun inceltilmesi için sıfır numaralı zımpara ile zımparalanmıştır. Zımparalanan tohumlar yüzey sterilizasyonu için, bir iki damla Tween 20 içeren % 3'lük sodyum hipokloritte 20 dakika muamele edilmiştir. Süre sonunda 4 kez saf sudan geçirilip sodyum hipokloritin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Steril tohumlar, MS bazal besin ortamı, % 3 (w/v) sükröz, % 0,7(w/v) agar içeren ortama aktarılmıştır. Petrilerde çimlendirilen bitkiler, daha iyi gelişebilmeleri için belirli periyotlarda taze besin ortamları içeren daha büyük kültür kaplarına aktarılmıştır. Kontrollü kültür koşullarında yetiştirilen bitkilerden sağlıklı bir şekilde gelişen 20 haftalık bitkiler eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.2.4.2. Kültür başlangıç aşaması

Eksplant çeşidi olarak 20 haftalık bitkinin yaprakları ve kökleri kullanılmıştır. Sürgün rejenerasyon ortamı olarak MS bazal besin ortamı, %3 sükröz, 2 mg/l polivinilprolidon (PVP), % 0,7 (w/v) agar ve Çizelge 1'de belirtilen miktarlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren 30 farklı ortam kullanılmıştır. Yaprak eksplantları yaklaşık 0,5x0,5 cm boyutunda, kök eksplantları ise 0,5 cm boyutunda kesilip her bir petriye 10'ar adet aktarılmış ve her bir deneme 5 tekrarlı olarak kurulmuştur (Şekil 5).



Şekil 5. Sürgün rejenerasyon ortamlarına kültür başlangıç aşamasında aktarılan yaprak eksplantları.

Çizelge 1. Yaprak ve kök eksplantlarının kültüre alındığı MS besin ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyon ve kombinasyonları

Ortam	NAA (mg/l)	BAP (mg/l)	Ortam	2,4 D (mg/l)	K (mg/l)
1		0.1	16		0.1
2		0.5	17		0.5
3	0.1	1.0	18	0.1	1.0
4		3.0	19		3.0
5		5.0	20		5.0
6		0.1	21		0.1
7		0.5	22		0.5
8	0.5	1.0	23	0.5	1.0
9		3.0	24		3.0
10		5.0	25		5.0
11		0.1	26		0.1
12		0.5	27		0.5
13	1	1.0	28	1	1.0
14		3.0	29		3.0
15		5.0	30		5.0

Kültür sırasında eksplantlarda meydana gelebilecek kararmaları önlemek için eksplantlar ve eksplantlardan gelişen sürgünler 10 günde bir alt kültüre alınmıştır.

3.2.4.3. Sürgün çoğaltım aşaması

Kültür başlangıç aşamasında 30 farklı sürgün rejenerasyon ortamına aktarılan eksplantlardan oluşan adventif sürgünler çoğalmaları için aynı oranda bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS bazal besin ortamına aktarılmıştır.

3.2.4.4. Sürgün gelişimi ve köklendirme

Çoğaltılan sürgünler birbirlerinden tek tek ayrılarak gelişmeleri için bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS bazal besin ortamına aktarılmışlardır.

Gelişen sürgünlerin köklenmeleri için köklenme ortamı olarak, 1 mg/l NAA, 0,5 mg/l IAA ve % 0.1 aktif karbon içeren MS besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS bazal besin ortamı ayrı ayrı denenmiştir.

3.2.4.5. İstatistiksel analizler

Tüm eksplantların kültüre alınmasından 12 hafta sonra, sürgün oluşturan eksplant sayısı ve eksplant başına düşen sürgün sayısı belirlenmiştir. Tüm veriler MINTAB kullanılarak karşılaştırılan varyans ve ortalama değerlerinin analizi ile değerlendirilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileri ise MSTAT ile analiz edilmiştir. ($Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \Sigma_{ijk}$) istatistik modeli ile bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonlarının etkileri belirlenmiştir.

3.2.5. Bitki yaprak dokusundan total RNA izolasyonu

Bitkilerin yaprak dokusundan total RNA izolasyonu öncesi, izolasyon sırasında kullanılacak olan havanlar, havan elleri, spatül ve pensler RNaz sterilizasyonu için %0,1'lik Dietilpirokarbonat (DEPC) solüsyonunda (Ek 3) 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 121°C'de 15 dakika sürede yüksek basınç ve sıcaklıkta otoklavlanmıştır. Ardından 200°C'de pasteur fırınında 4 saat bekletilmiştir.

Bitki örneklerine ait yaprak dokusu eppendorf tüplerine alınmış ve strafor kutu içerisinde bulunan sıvı azota daldırılmış ve izolasyon başlayana kadar bekletilmiştir. Eppendorflar içerisindeki yaprak dokuları, eppendorf tüp pestili ile dokunun çözünmesine izin verilmeden toz haline gelene kadar ezilmiştir. Toz haline getirilen örneklerden RNA izolasyonu, Invitrogen Purelink RNA Mini Kit (Kat. No.12183018A) ile yapılmıştır. İzole edilen RNA'lar -86°C'ye ayarlı derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.5.1. İzole edilen total RNA'ların elektroforezi**10X TAE (Tris EDTA Asetat) Tamponu:**

10X TAE Tamponu hazırlamak için; 48,44 g trizma base, 3,72 g EDTA 900 ml dH₂O içerisinde çözdürülmüş ve glasiyel asetik asit ile tamponun pH'sı 8,0'e ayarlanmıştır. Tamponun son hacmi dH₂O ile 1l'ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

1XTAE Tamponu hazırlamak için 10XTAE tamponundan 100 ml alınarak 900 ml dH₂O ile 1l'ye tamamlanmıştır.

Etidyum Bromür Stok Çözeltisinin Hazırlanması:

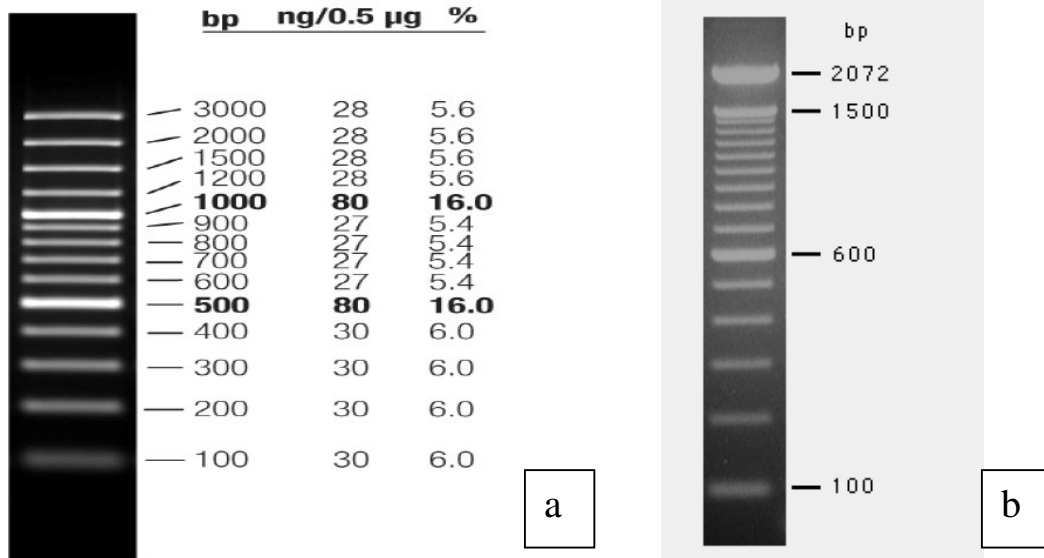
0,1 g etidyum bromür 10 ml dH₂O içerisinde karıştırılarak çözdürülmüş ve 10 mg/ml'lik stok çözelti elde edilmiştir. Şişenin etrafı alüminyum folyo ile kaplanıp +4°C 'de karanlıkta saklanmıştır.

%1'lik Agaroz Jel Hazırlanması:

1 g agaroz (Prona Biomax 104514PR) tartılıp 100 ml 1XTAE tamponu içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde 120°C'de çözdürülmüştür.

Hazırlanan ve çözdürülen jelin sıcaklığı 50-55°C'ye düştüğünde 10 mg/ml etidyum bromür stok çözeltisinden 12 µl eklenmiş ve karıştırılmıştır. Ardından, jel katılaşmadan hemen önce içerisinde tarak bulunan jel tepsisine dökülmüştür. Jel katılaştıktan sonra taraklar çıkartılmış ve elektroforez tankının (ATTO) içerisine yerleştirilmiştir. Elektroforez tankı, jel tepsisinin yüzeyini örtücek kadar 1XTAE tamponu ile doldurulmuştur.

İzole edilen total RNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış ve ultraviyole transilluminator tablasında (UV) görüntülenmiştir. 10 µl izole edilen RNA örnekleri, 2 µl 6X yükleme tamponu (Fermentas 00066723) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Ayrıca GeneRuler™ 100bp Plus (SM0321) DNA markırı da jele yüklenmiştir (Şekil 6). Örnekler 8V/cm'de 60 dakika boyunca yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonrasında Quantum ST4-1100 Jel Dokümantasyon ve Analiz Sistemi (VL-1011-4173-1) ile görüntülenmiştir.



Şekil 6. Kullanılan GeneRuler™ 100bp Plus (Fermentas, SM0321) DNA markırı (a) ve 100bp Plus (Invitrogen -15628-019) DNA markırı (b).

3.2.5.2. İzole edilen total RNA'ların miktarlarının spektrofotometre ile belirlenmesi

Yapraklardan izole edilen total RNA miktarları WPA Biowave DNA spektrofotometre (18WDC) ile µg/ml düzeyinde ölçülmüştür. Saflık kontrolünde 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerinin oranı (A_{260}/A_{280}) kullanılmıştır. Bu oran 1.8-2.0 değer aralığında hesaplandığında RNA molekülleri saf olarak kabul edilmiş ve bu örnekler çalışmanın devamında kullanılmıştır.

3.2.6. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

cDNA sentezi, izole edilen total RNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak, Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1621) ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için, miktarları spektrofotometrede ölçülen RNA örneklerinin her biri uygun miktarda nükleaz free dH₂O ile seyreltilmiştir. Eşit miktarda RNA kalıp olarak kullanılarak cDNA sentezi ince cidarlı 200 µl'lik PCR tüplerinde Çizelge 2'te miktarları belirtilen reaksiyon bileşenleri ile kurulmuştur.

Çizelge 2. cDNA reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Miktar
Total RNA	0.025 µg
Oligo (dT) ₁₈ Primer	1 µl
Nuclease free H ₂ O	6 µl
5X Reaksiyon Tamponu	4 µl
RiboLock™RNase Inhibitor (20u/ µl)	1 µl
10mM dNTP Karışımı	2 µl
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/ µl)	1 µl
	20 µl

Reaksiyon, thermal cycler (BIO-RAD) cihazında 42°C'de 60 dakikada gerçekleştirilmiş ve sonrasında 70°C'de 5 dakika inkübe edilerek sonlandırılmıştır. cDNA sentez reaksiyonunun doğru bir şekilde gerçekleştiğinden emin olmak için Reverse

transcriptase enzimi içermeyen negatif kontrol, kalıpsız negatif kontrol ve pozitif kontrol (*GAPDH* geni) kullanılmıştır. RT ürünleri PCR’da kullanılmak üzere -20°C’ye ayarlı derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.7. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile cDNA’ların çoğaltılması

First Strand cDNA Synthesis Kit ile gerçekleştirilen cDNA eldesi sonrasında cDNA’ların PCR ile çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonların tümü, buz üzerinde kurulmuştur.

PCR reaksiyonu High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas) ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda kullanılan ve optimize edilen PCR bileşenleri, miktarları ve reaksiyondaki son konsantrasyonları Çizelge 3’te belirtilmiştir. PCR’da kalıp cDNA miktarının reaksiyon hacminin %10’unu geçmemesine dikkat edilmiştir.

Çizelge 3. PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)	Son Konsantrasyon
10X High Fidelity PCR buffer with 15 mM MgCl ₂	2,5	1X
10 mM dNTP mix	0,5	0,2 mM
10 pmol/µl forward Primer	1	0,4 pmol/µl
10 pmol/µl reverse Primer	1	0,4 pmol/µl
RT ürünü (cDNA)	2,5	
High Fidelity PCR Enzyme Mix	0,125	1,25 unit
dH ₂ O	17,375	
Toplam hacim	25	

PCR reaksiyonunda kullanılacak olan progesteron *P5βR* ve *Act2* genleri için dizayn edilen primerler ve baz dizilişleri Çizelge 4’de belirtilmiştir. Thermal cycler cihazında reaksiyon için ayarlanan koşullar Çizelge 5’te belirtilmiştir.

Çizelge 4. PCR reaksiyonunda kullanılan primerler ve baz dizilişleri

Primer	Baz dizilişi
<i>VH07b</i>	5'-AAAAAATGAGCTGGTGGTGG-3'
<i>VH1188</i>	5'-AACCATGTCAAGGAACAATC-3'
<i>Act2</i>	5'-TCGGTAAGAAGAACAGGGTGC-3'
<i>Act2</i>	5'-TGGTGAAGGCTGGATTGC-3'

Çizelge 5. *P5βR* ve *Act2* için optimize edilen PCR koşulları

Segment	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94	5 dk	1
Denatürasyon	94	20 sn	
Primerlerin bağlanması	50	1 dk	30
Uzama	72	2 dk	
Son uzama	72	10 dk	1

3.2.7.1. PCR ürünlerinin elektroforezi

cDNA PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde ayrılmış ve U.V. tablasında görüntülenmiştir. 10 µl cDNA PCR ürünü, 2 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Ayrıca GeneRuler™ 100bp Plus (SM0321) DNA markırı da jele yüklenmiştir. Örnekler 8V/cm'de 60 dakika boyunca yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonrasında jel görüntüleme cihazında U.V. ışık altında görüntülenmiştir ve görüntüler bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

3.2.8. cDNA'nın jelden geri kazanılması

PCR ürünleri jel elektroforezinde yürütülmüştür. Yürütme işlemi bittikten sonra UV tablası üzerine alınmış ve steril bistüri ile ilgili bantlar kesilmiştir. Kesilen bantlar daha önceden tartılan ve ağırlığı belirlenen steril eppendorf tüpleri içerisine alınmıştır. Hassas terazi ile tartılarak ağırlıkları belirlenmiştir. Purelink Quick Gel Extraction kiti (K2100-12) kullanılarak protokole uygun olarak saflaştırılmıştır.

3.2.9. RT-PCR ürününün dizi analizi

P5βR geninin cDNA'sının baz dizilişinin ve uzunluğunun belirlenmesi için dizi analizi, hizmet alımı yoluyla Sanger metodu ile analiz yapan BioBasic (Kanada) firmasına yaptırılmıştır.

3.2.10. Biyoinformatik analizler

Dizi analizi sonucunda elde edilen *D. trojana* türünün *P5βR* geninin cDNA'sına ait dizi, The National Center for Biotechnology Information (NCBI) sitesinde yer alan Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN) programı (nükleotid için) kullanılarak diğer türlerdeki diziler ve bölgesel benzerlikleri belirlenmiştir. BLASTN kullanılırken veri tabanı olarak diğerleri (others) seçilmiş, algoritma olarak ise Highly Similar Sequences (megablast) programı kullanılmıştır.

Elde edilen cDNA nükleotid dizisine karşılık gelen muhtemel polipeptid dizisi oluşturmak ve karşılaştırmak için Transeq programı (http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/) kullanılmıştır. Programda çerçeve 6 ve standart kod seçilerek cDNA nükleotid dizisi polipeptid dizisine çevrilmiştir.

Elde edilen polipeptid dizisi, NCBI sitesinde yer alan protein BLAST programında non-redundant protein sequences (nr) veri tabanı ve protein protein BLAST algoritması kullanılarak BLAST yapılmıştır.

3.2.11. Progesteron 5β- Reduktaz gen ifadesinin belirlenmesi

Bitki örneklerindeki Progesteron 5β-Reduktaz geninin ifadesi Gelpro3 programı kullanılarak belirlenmiştir. Referans gen olarak *Act2* geni kullanılmıştır. İfade miktarı *P5βR/Act2* oranı ile elde edilmiştir.

3.2.12. Taban yapraklardaki kardenolitlerin ekstraksiyonu ve miktarının yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analizi**3.2.12.1. Kardenolitlerin katı faz ekstraksiyonu**

Bitki yapraklarındaki kardenolit miktarlarını belirlemek için Roca-Pérez ve arkadaşlarının (2004) Wiegrebe ve Wichtl (1993) tarafından tanımlanan ve değiştirilerek uyguladıkları yöntem değiştirilerek uygulanmıştır.

1. Bitkilerin rozet yaprakları, 0,5 g tartılıp sıvı azot ile toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen yaprakların üzerine 12 ml %70'lik metanol ilave edilip 10 dk boyunca çalkalanmıştır.
2. Bu karışım 95°C'ye ayarlanmış su banyosunda 10 dk inkübe edilmiş ve bu süre içerisinde belirli aralıklarla çalkalanmıştır.
3. Süre sonunda hızlı bir şekilde oda sıcaklığına soğutulmuştur. 11.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Süpernatant yeni bir tüpe alınmıştır. Daha sonra üzerine 2 ml %15'lik kurşun asetat solüsyonu eklenmiştir.
5. Elde edilen ekstrakt iyi bir şekilde karıştırıldıktan sonra üzerine 2 ml %4'lük monosodyum fosfat eklenip karıştırılmıştır ve 11.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Süpernatant yeni bir tüpe aktarılmış ve dH₂O ile seyreltilerek 24 ml'ye tamamlanmıştır.

Bitki taban yapraklarının kardenolit içeriklerinin HPLC analizi ile belirlenmesi için katı faz ekstraksiyonu (SPE) yapılmıştır. Çalışmada PKN-200-C18 kolonu kullanılmıştır. Kolon, SPE vakum manifolduna (Agilent) yerleştirilmiş ve örneklerin geçirilmesinden hemen önce şartlandırılmıştır. Şartlandırma için ilk aşamada 4 ml metanol vakum uygulanmadan kolondan geçirilmiştir. Daha sonra ise 4 ml H₂O geçirilerek şartlandırma işlemi tamamlanmıştır. 24 ml hacimli örneklerin tamamı vakum uygulanarak kolondan geçirilmiştir. Ardından 2 ml H₂O geçirilerek kolon yıkanmıştır. Son olarak kolonda tutulan kardenolitlerin 2 ml metanol ile ayrıştırılması gerçekleştirilmiştir. Örnekler, ilk birkaç damlası atılarak viyallere alınarak, enjeksiyona hazır hale getirilmiştir.

3.2.12.2. HPLC analizi

Kazdağlarından Mayıs ve Temmuz aylarında farklı yüksekliklerden toplanan ve *in vitro* üretilen bitkisel materyallerin yapraklarındaki kardenolit miktarları, kardenolit analizinde standart bir yöntem olan HPLC ile analiz edilmiştir. Analizde, HPLC analizine uygun saflıktaki kimyasallar ve malzemeler kullanılmıştır.

Analizlerin tamamı Agilent HPLC (seri 1200) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Analizler 40°C sıcaklıkta, 230 nm dalgaboyunda, 10 µL enjeksiyon ve 1 ml/dk akış hızı altında, Eclipse XDB-C18 (250-4-5µm) kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Dereceli ayırıştırma asetonitril CH₃CN(A) ve H₂O (B) mobil fazı kullanılmıştır. Zamana bağlı olarak artan düzeylerde CH₃CN (A) ayırıştırması yapılmıştır. Dereceli ayırıştırma; başlangıç %20'lik CH₃CN, %32'lik CH₃CN (35 dk), %40'lik CH₃CN (45 dk) %50'lik CH₃CN (55 dk), %55'lik CH₃CN (59 dk), %60'lik CH₃CN (65 dk) olarak yapılmıştır.

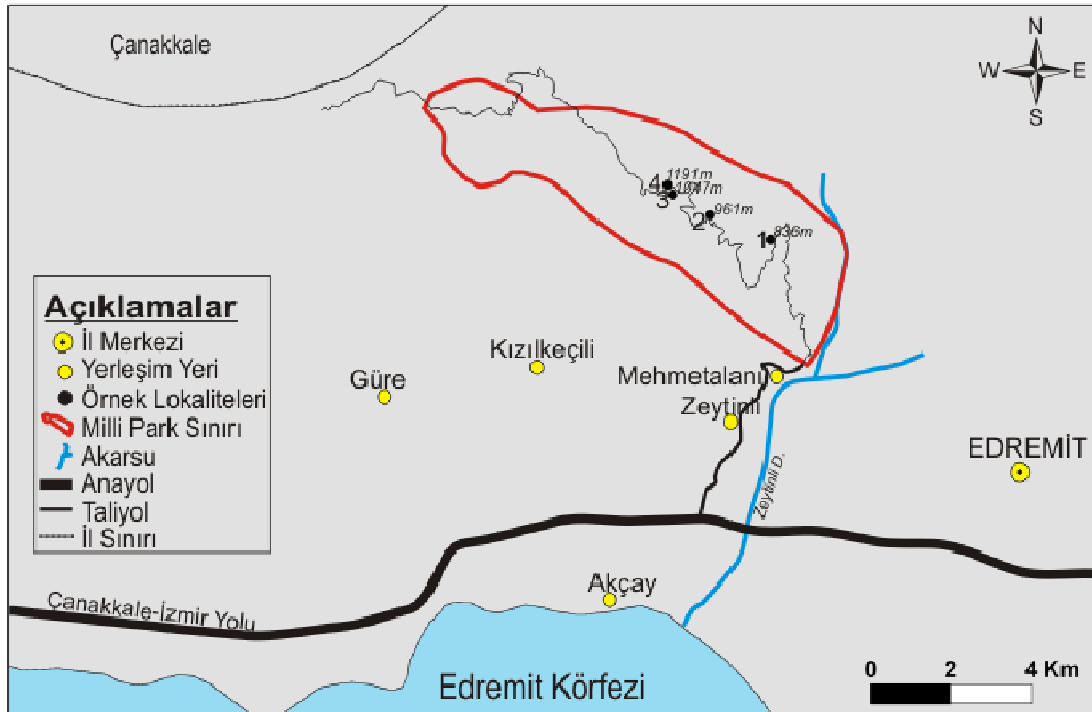
Lanatosit C (Sigma-L2261), digoksin (Fluka-D6003), digitoksin (Sigma-D9026) ve gitoksigenin (Fluka- 48940) standart olarak kullanılmıştır. Her bir örnek üç tekrarlı analiz edilmiştir. Bitki örneklerinin içerdikleri kardenolitlerin miktarları, 1 gram kuru yaprak ağırlığının içerdığı µg cinsinden hesaplanmıştır.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Bitkisel Materyalin Toplanması ile İlgili Bulgular

Araştırmamız kapsamında 2011 yılının Mayıs ve Temmuz aylarında Kaz Dağı Milli Parkı'na arazi çalışması yapılmıştır. *D. trojana* türüne ait bitki örnekleri zirveye giden güzergah üzerinde yayılış gösterdikleri yol kenarlarından farklı yüksekliklerden toplanmıştır (Şekil 7).



Şekil 7. *Digitalis trojana* Ivan. bitki örneklerinin Kazdağı Milli parkı sınırları içerisinde toplandığı lokaliteler.

Bitki örneklerinin toplandıkları yükseklikler ve koordinatlar Çizelge 6'de belirtilmiştir.

Laboratuvar ortamına getirilen bitkilerin taban yaprakları kesildikten sonra musluk suyu altında yıkanarak temizlenmiştir. Temizlenen yapraklar 1 dakika süre ile sıvı azot içerisine daldırılmıştır. Moleküler analizlerde ve kardenolit analizlerinde kullanılmak üzere -80°C'deki derin dondurucu içerisinde saklanmıştır.

Bunun yanı sıra *D.trojana* türüne ait olan bitkilerin tohumları da toplanarak mikroçoğaltım çalışmaları için kullanılmak üzere +4 °C’de depolanmıştır.

Çizelge 6. Doğal ortamda yayılış gösteren *D. trojana* bitkilerinin toplandığı lokalitelerin yükseklik ve koordinatları

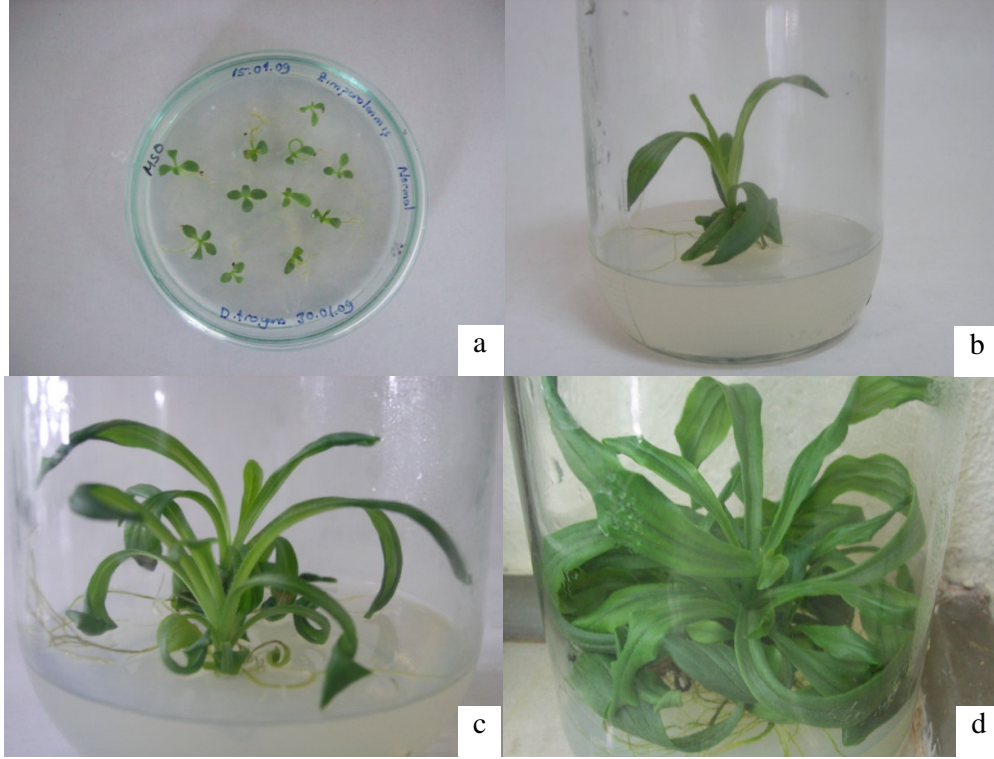
Lokalite	Yükseklik	Koordinatlar	
1	836m	26° 56' 29.98"	39° 39' 59.48"
2	961m	26° 56' 11.20"	39° 40' 19.61"
3	1047m	26° 55' 41.17"	39° 40' 35.91"
4	1191 m	26° 55' 37.02"	39° 40' 44.06"

4.2. *D. trojana* Türünün Mikroçoğaltımı ile İlgili Bulgular

4.2.1. Hazırlık aşaması ile ilgili bulgular

Araziden toplanan bitkilerden alınan eksplantların *in vitro* denemeler için yetersiz olması ve sterilizasyonlarında zorluklar yaşanacağı için bitkinin tohumları *in vitro* kültüre alınıp eksplant kaynağı olarak kullanılacak olan bitkiler yetiştirilmiştir.

Tohumlar kültüre alınmadan önce çimlenmenin etkili bir şekilde gerçekleşmesi için tohum kabuğunun zımparalanması ile dormansinin kırılması işlemi yapılmıştır. Zımparalanan bitki tohumlarının %3'lük sodyum hipoklorit ile 20 dakika muamelesinin tohumların yüzey sterilizasyonu için yeterli olduğu belirlenmiştir. Tohumlar yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra MS bazal besin ortamı içeren petri kaplarında kültüre alınmış ve çimlendirilmiştir. Çimlendirilmesi gerçekleştirilen bitkiler, daha iyi gelişebilmeleri için belirli periyotlarda taze besin ortamları içeren hacim olarak daha büyük kültür kaplarına aktarılmıştır. Kontrollü kültür koşullarında yetiştirilen bitkilerden sağlıklı ve hastaliksız olarak gelişen 20 haftalık bitkiler eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır (Şekil 8).



Şekil 8. a) *in vitro* çimlendirilen, b) 5 haftalık, c) 10 haftalık *D.trojana* bitkisi, d) eksplant kaynağı olarak kullanılan 20 haftalık *D.trojana* bitkisi.

4.2.2. Kültür başlangıç aşaması ile ilgili bulgular

Kültür başlangıç aşamasında, 20 haftalık bitkilerden alınan yaprak ve kök eksplantları bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. İlk aşamada, bu ortamlarda kültüre alınan yaprak ve kök eksplantları, rejenerasyon kapasiteleri bakımından karşılaştırılmış ve *D. trojana* türünün mikroçoğaltımı için yaprak ve kök eksplantının kullanılabilirliği belirlenmiştir.

Bunun yanı sıra seçilen eksplant çeşidinden en etkili sürgün rejenerasyonunu teşvik eden en uygun bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyon ve kombinasyonları bulunmuştur.

Ayrıca uygun besin ortamının belirlenmesi için MS ortamının yanı sıra seçilen en etkili bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonu ve kombinasyonu ilave edildiği B5 besin ortamı da kullanılmış ve MS ortamı ile karşılaştırılmıştır.

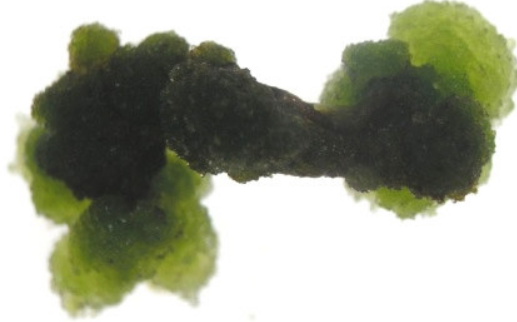
4.2.2.1. Kök eksplantı ile ilgili bulgular

Bitkilerin kök eksplantları farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınmıştır. Eksplantlarda meydana gelen morfolojik farklılaşmalar günlük olarak gözlenmiştir. Sürgün rejenerasyon ortamları karşılaştırıldığında, tüm ortamlardaki kök eksplantlarında kültüre alınmalarından bir hafta sonra kallus oluşumu gözlenmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinden Naftalen asetik asit (NAA) ve 6-Benzilaminopürin (BAP) kombinasyonu değerlendirildiğinde, NAA'nın tek başına ilave edildiği veya NAA'nın BAP'a göre daha yüksek oranda ilave edildiği ortamlarda kültüre alınan eksplantlarda kök oluşumu gözlenmiştir (Şekil 9).



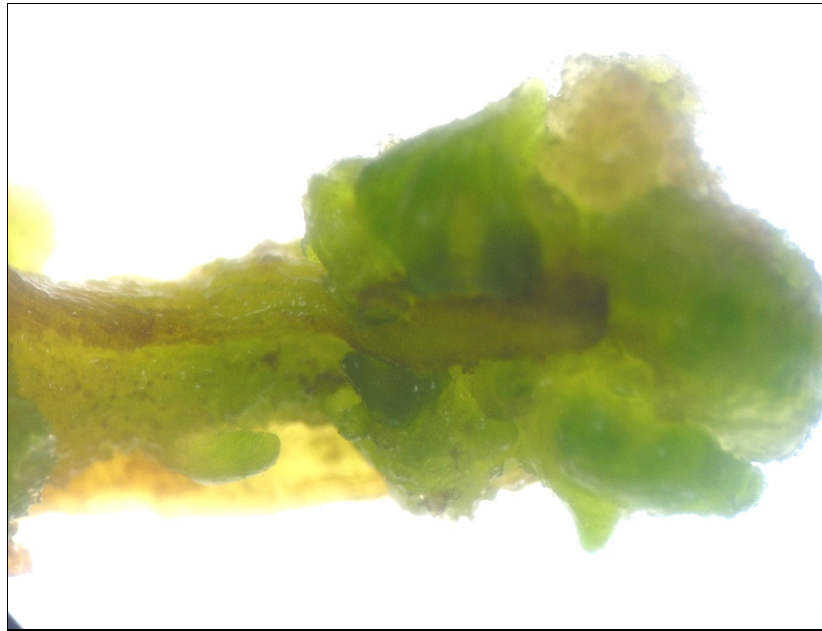
Şekil 9. 1 mg/l NAA ve 0,5 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre alınan kök eksplantı.

0,1 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP ilave edilen MS ortamında kültüre alınan eksplantlarda kültüre alınmalarından 3 hafta sonra sadece kallus oluşmuştur. Oluşan kallusun devam eden kültür süresince sürgün ve ya köke farklılaşması gerçekleşmemiştir (Şekil 10).



Şekil 10. 0,1 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP ilave edilen MS ortamında kültüre alınan eksplantlardan gelişen kallus.

Kök eksplantlarından sürgüne farklılaşma ise sadece 0,1 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP içeren ortamda kültüre alınan eksplantlarda gözlenmiştir (Şekil 11). Kök eksplantında oluşan sürgün taslaklarının kültür süresi boyunca gelişmeleri ve çoğalmaları gerçekleşmemiştir. Bu yüzden mikroçoğaltım için yaprak eksplantları ile kültür aşamalarına devam edilmiştir.



Şekil 11. 0,1 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre alınan kök eksplantlarından gelişen sürgün taslağı (kültürün 3. haftası).

4.2.2.2. Yaprak eksplantı ile ilgili bulgular**4.2.2.2.1. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine etkisinin araştırılması ile ilgili bulgular**

MS0 besin ortamında kültüre alınan eksplantlarda sadece sınırlı hücre bölünmesine bağlı olarak kabarmalar gözlenmiştir. MS0 ortamında endojen bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün rejenerasyonu için yeterli olmamasından dolayı ekzojen bitki büyüme düzenleyicilerinin besin ortamına ilave edilmesinin gerekli olduğu belirlenmiştir.

Bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS besin ortamındaki eksplantlarda ise ilk aşamada hücre sayısındaki artışa bağlı olarak eksplantlarda kabarmalar ve hacimce büyüme gerçekleşmiştir. Daha sonra ise eksplantların kesik bölgelerinde kallus oluşmuştur.

Oksin ve sitokinin oranının eşit ya da düşük olduğu ortamlarda kültüre alınan eksplantlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Kalluslar aynı oranda oksin ve sitokinin içeren ortama aktarıldığında kallusta morfolojik farklılaşma meydana gelmemiştir. Oksin miktarının sitokinine göre daha yüksek oranda ilave edildiği besin ortamındaki eksplantlarda ise kesik bölgelerinde kallus oluşmuş ve köke farklılaşma meydana gelmiştir.

2,4 D ve K kombinasyonu içeren ortamlarda kültüre alınan eksplantlardan kallus oluşmuş ve morfolojik farklılaşmalar gözlenmiştir. Köke farklılaşma 0,1 mg/l 2,4 D ve 0,5 mg/l K eklenmiş ortamdaki eksplantlarda gözlenmiştir (Şekil 12).

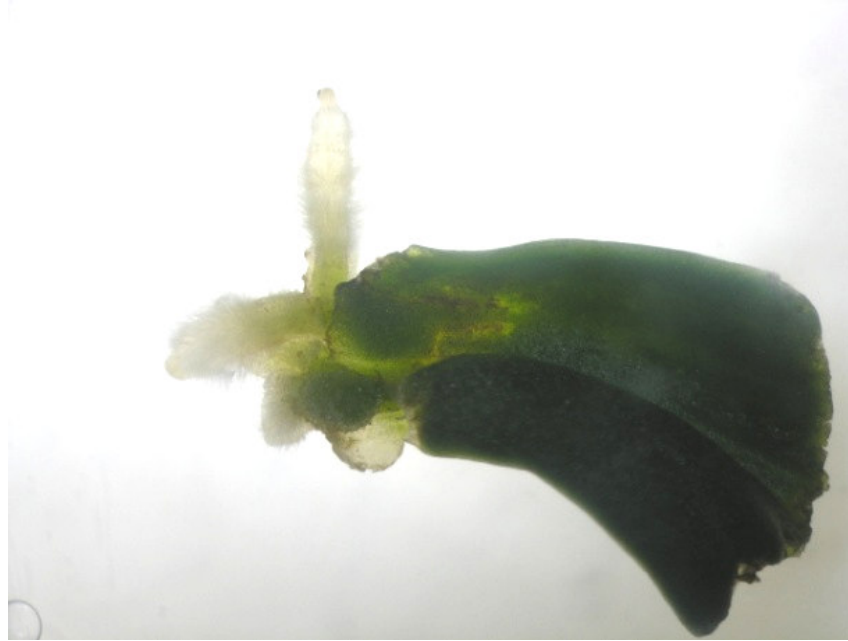


Şekil 12. a) 0,1 mg/l 2,4 D, 0,1 mg/l K, b) 0,1 mg/l 2,4 D, 0,5 mg/l K, c) 0,1 mg/l 2,4 D, 3,0 mg/l K, d) 1,0 mg/l 2,4 D, 3,0 mg/l K, e) 0,1 mg/l 2,4 D, 3,0 mg/l K, f) 0,5 mg/l 2,4D, 5,0 mg/l K ilave edilen MS besin ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarında meydana gelen morfolojik farklılaşmalar.

Sürgün rejenerasyonu için kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonları karşılaştırıldığında, NAA ve BAP kombinasyonunun 2,4-D ve K kombinasyonundan daha etkili olduğu gözlenmiştir. MS ortamına NAA ve BAP kombinasyonu ilavesi değerlendirildiğinde, NAA'ın tek başına (Şekil 13) besin ortamına ilave edildiği ya da BAP'a göre besin ortamına daha yüksek oranda ilave edildiği ortamlarda (Şekil 14) kök oluşumu meydana gelmiştir.



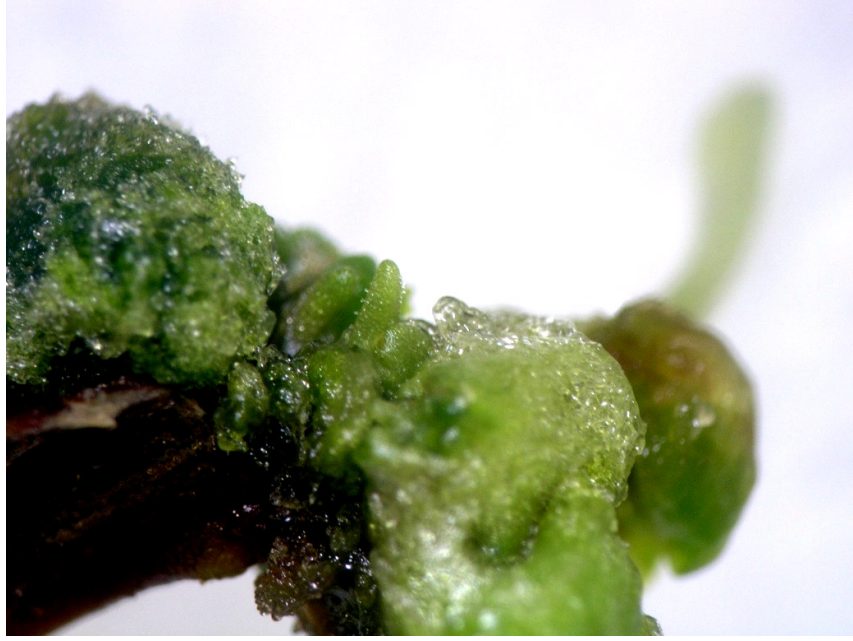
Şekil 13. 0,5 mg/l NAA içeren ortamda kültüre alınan yaprak eksplantından gelişen kök.



Şekil 14. 1 mg/l NAA, 0,1 mg/l BAP içeren ortamda kültüre alınan yaprak eksplantından gelişen kökler (kültürün 3.haftası).

Besin ortamında BAP miktarının NAA'ya göre daha yüksek oranda bulunduğu ortamlarda sürgün rejenerasyonu meydana gelmiştir. NAA ve BAP'ın birlikte bulunduğu

farklı besin ortamlarında kültüre alınan eksplantlar ve kültürün 3.-4. haftasında oluşan sürgünler Şekil 15 ve Şekil 16'de verilmiştir.

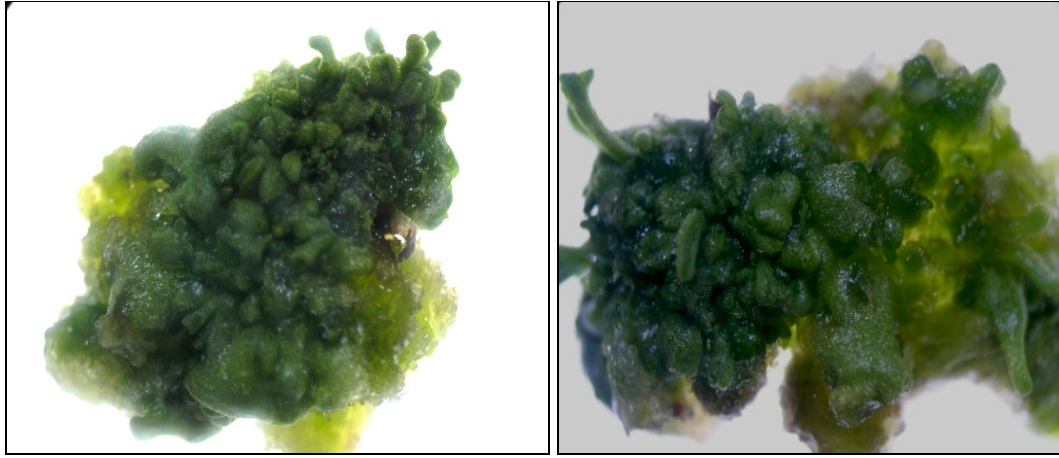


Şekil 15. 0,1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP, 2 mg/l PVP, %0,7 agar içeren MS besin ortamında kültürün 4. haftasında yaprak eksplantlarından gelişen sürgünler.



Şekil 16. 0,5 mg/l NAA, 3 mg/l BAP, 2 mg/l PVP, %0,7 agar içeren MS besin ortamında kültürün 4. haftasında yaprak eksplantlarından gelişen sürgünler.

Hazırlanan 30 farklı ortam karşılaştırıldığında, 0,1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA + 3,0 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA + 5,0 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAA + 3,0 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAA + 5,0 mg/l BAP, 1 mg/l NAA + 5,0 mg/l BAP oranına sahip ortamlarda sürgün rejenerasyonu meydana gelmiştir. Eksplant başına düşen sürgün sayısı dikkate alındığında ise *D. trojana* için en uygun rejenerasyon ortamının 0,1 mg/l NAA + 3,0 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamı olduğu belirlenmiştir (Şekil 17 ve Şekil 18).



Şekil 17. 0,1 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP içeren MS besin ortamında gelişen sürgün primordiyumları.



Şekil 18. 0,1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP, 2 mg/l PVP, %0,7 agar içeren MS besin ortamında kültürün 4. haftasında eksplantlarda gelişen sürgünler.

Kültür başlangıç aşamasında yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonunu gerçekleştirebilmesi için her bir deneme 5 tekrarlı kurulmuş ve her bir petri kabına 10 eksplant aktarılmıştır. Farklı ortamlara aktarılan eksplantlarda oluşan sürgünlerin sayısı, eksplant başına düşen sürgün sayısı kültür başlangıcından 12 hafta sonra hesaplanmıştır. Tüm veriler MINTAB kullanılarak karşılaştırılan varyans ve ortalama değerlerinin analizi ile değerlendirilmiştir (Çizelge 7). *D.trojana* türünün mikroçoğaltımı için en uygun sürgün rejenerasyon ortamının belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 7. Farklı ortamlarda kültüre alınan yaprak eksplantından gelişen sürgün sayısı

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/l)		Sürgün oluşturan eksplant sayısı	Eksplant başına düşen sürgün sayısı
NAA	BAP		
-	-	0.0	0.0
0.1	0.1	4.0	0.3± 0.1 ^{Da}
0.1	0.5	16.0±0.3	2.3±0.5 ^{CDa}
0.1	1.0	20.0±1.4	10.3±0.3 ^{BCa}
0.1	3.0	32.0±0.1	28.0±1.8 ^{Aa}
0.1	5.0	45.0±0.5	16.3±0.1 ^{Bb}
0.5	0.1	0.0	0.0 ^{Ba}
0.5	0.5	0.0	0.0 ^{Ba}
0.5	1.0	0.0	0.0 ^{Bb}
0.5	3.0	32.0±0.9	17.3±0.3 ^{Ab}
0.5	5.0	12.0±0.7	2.3±0.6 ^{Bc}
1.0	0.1	0.0	0.0 ^{Ba}
1.0	0.5	13.3±1.6	0.6±0.1 ^{Ba}
1.0	1.0	12.0±1.8	1.6 ±0.5 ^{Bb}
1.0	3.0	4.0±0.2	0.3 ±0.1 ^{Bc}
1.0	5.0	14.6±0.5	26.3±3.0 ^{Aa}

* BAP miktarının değişikliği her NAA miktarında önemlidir ve NAA miktarının değişikliği her BAP miktarında önemlidir (Aynı harflerin anlamı P < 0.01 anlamlı derecede farklı değildir).

Eksplant başına düşen sürgün sayısı dikkate alındığında, 1 mg/l NAA ve 5mg/l BAP içeren MS ortamındaki eksplantlarda da yüksek sayıda sürgün meydana gelmiştir (Şekil 19). *D. trojana* türünün mikroçoğaltımı için bu iki ortamda gelişen sürgünlerin çoğaltımı, gelişimi ve köklendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca moleküler ve kardenolid analizlerinde kullanılmak üzere bu iki ortamda üretilen bitkiler kullanılmıştır.



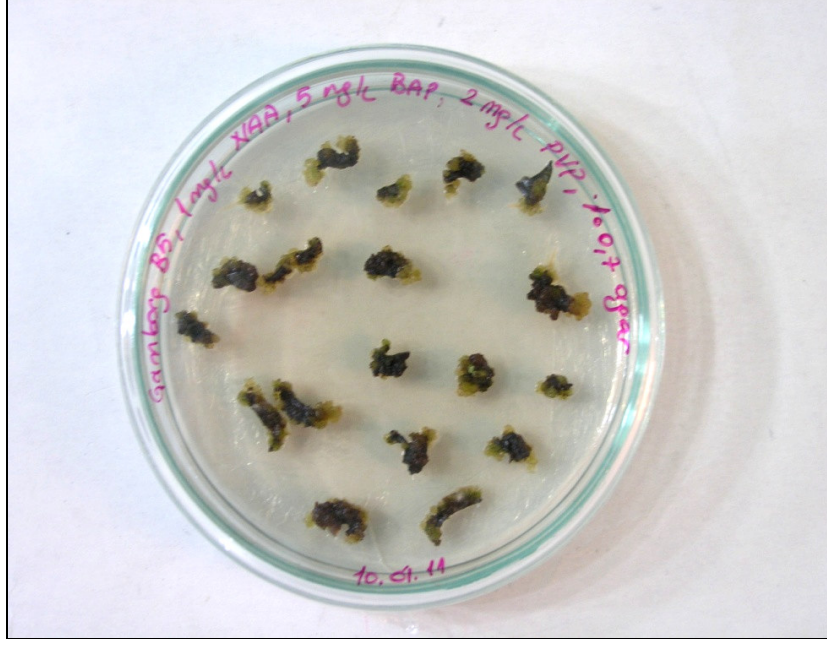
Şekil 19. 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP içeren MS besin ortamda kültüre alınan yaprak eksplantından gelişen sürgünler (3. hafta).

4.2.2.2. Sürgün rejenerasyonu için uygun besin ortamının seçimi ile ilgili bulgular

D. trojana türünün ilk aşamada yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonun teşviki için bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyon ve kombinasyonlarının etkileri araştırılmış ve 0,1 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP, 1 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP içeriğinin en uygun kombinasyon ve konsantrasyon olduğu belirlenmiştir.

Daha sonra ise sürgün rejenerasyonu için uygun besin ortamının seçimi için MS ve B5 ortamı belirlenen bu bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak karşılaştırılmış ve *D. trojana* türünün çoğaltımı için kullanılacak en uygun besin ortamı belirlenmiştir.

Yaprak eksplantından sürgün rejenerasyonu için B5 ve MS ortamları karşılaştırıldığında MS ortamının daha uygun olduğu belirlenmiştir. B5 ortamında kültüre alınan eksplantlarda kallus dokusu meydana gelmiş ancak kararma oranının çok yüksek olması nedeniyle rejenerasyon gerçekleşmemiştir (Şekil 20).



Şekil 20. B5 besin ortamında alt kültüre alınan yaprak eksplantlarından gelişen ve sürgüne farklılaşmayan kallus.

Kültür sırasında eksplantlarda meydana gelebilecek kararmaları önlemek için ortama 2 mg/l PVP ve %0,7 (w/v) agar ilave edilmiştir. Ayrıca eksplantlar ve eksplantlardan gelişen sürgünler 10 günde bir alt kültüre alınmıştır.

4.2.3. Sürgün çoğaltım aşaması ile ilgili sonuçlar

D. trojana türünün mikroçoğaltımının başlangıç aşamasında en fazla sürgün oluşumunun meydana geldiği, 0,1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP içeren ortamda ve 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP içeren ortamda 3-4 hafta sonra meydana gelen sürgünler çoğalmaları için alt kültüre alınmışlardır. Oluşan sürgünler, kültür başlangıç aşamasında kullanılan ortamlar ile aynı oranda bitki büyüme düzenleyici içeren MS besin ortamında kültüre alınmış ve çoğaltımları gerçekleştirilmiştir (Şekil 21 ve Şekil 22).



Şekil 21. 1 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında oluşan sürgünlerin, bazal besin ortamında kültüre alınması ile çoğalan sürgünler.



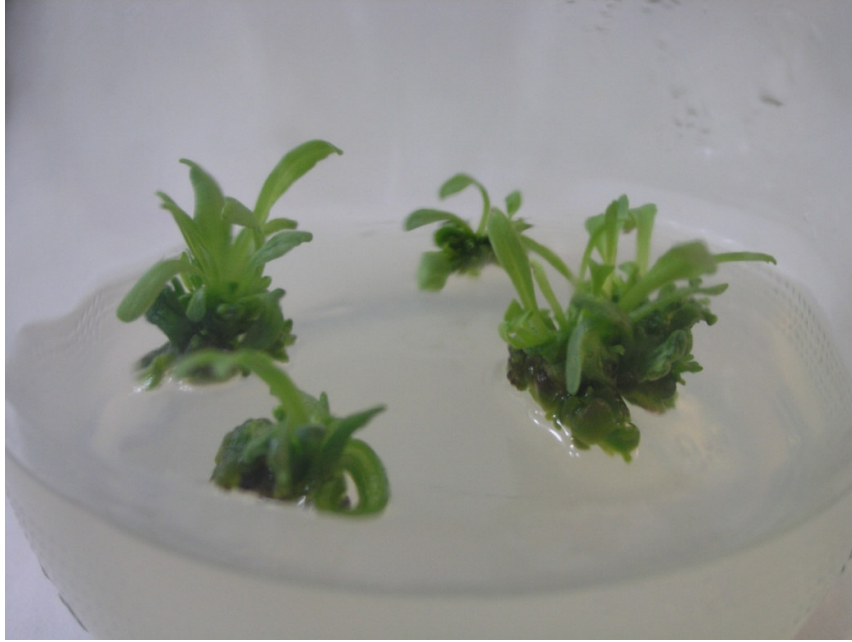
Şekil 22. 0,1 mg/l NAA ve 3,0 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında oluşan sürgünlerin, bazal besin ortamında kültüre alınması ile çoğalan sürgünler.

4.2.4. Sürgün gelişimi ve köklendirme ile ilgili bulgular

Çoğaltılan sürgünler tek tek ayrılarak gelişmeleri için MS0 besin ortamına aktarılmışlardır (Şekil 23 ve Şekil 24). Oluşan sürgünlerin köklenmelerinin gerçekleşebilmesi için, MS0, % 0,1 g aktif karbon, 1 mg/l NAA+ 0,1 mg/l BAP ve 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamının etkisi araştırılmıştır. Ancak sürgünlerin etkili bir şekilde köklenmeleri MS0 ortamında gerçekleştirilmiş ve aktif karbon veya oksin ilavesinin sürgünlerin köklenmesi için gerekli olmadığı görülmüştür.



Şekil 23. 0,1 mg/l NAA ve 3,0 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında oluşan ve gelişmeleri için MS bazal besin ortamına aktarılan sürgünler.



Şekil 24. 1 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında oluşan ve gelişmeleri için MS bazal besin ortamına aktarılan sürgünler.

Sürgünler köklenme ortamına aktarılmış (Şekil 25 ve Şekil 26) ve köklenmeleri gerçekleştirilerek tam bitki elde edilmiştir.



Şekil 25. 0,1 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında oluşan ve gelişmeleri için MS bazal besin ortamına aktarılan sürgünler.

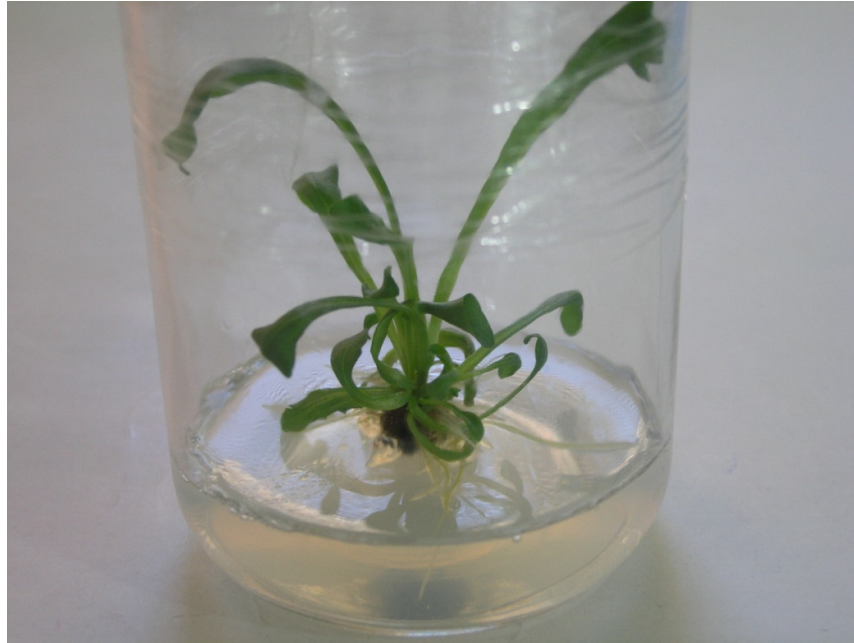


Şekil 26. 1 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında oluşan ve gelişmeleri için MS bazal besin ortamına aktarılan sürgünler.

Mikroçoğaltımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilen, 12 ve 17 haftalık bitkiler saksılara aktarılmadan kardenolit analizleri ve moleküler analizlerde kullanılmıştır (Şekil 27, 28, 29, 30).



Şekil 27. 0,1 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında oluşan *In vitro* geliştirilen ve köklendirilen 12 haftalık bitkiler.



Şekil 28. 1 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında oluşan *in vitro* geliştirilen ve köklendirilen 12 haftalık bitkiler.



Şekil 29. 0,1 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP ilave edilen MS ortamında üretilen 17 haftalık bitkiler.



Şekil 30. 1 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP ilave edilen MS ortamında üretilen 17 haftalık bitkiler

Çalışmamızda *Digitalis trojana* türünün sürgün rejenerasyonu ile mikroçoğaltımı gerçekleştirilmiştir (Çördük ve Akı, 2010). Çalışmada türün mikroçoğaltımı üzerine, eksplant çeşidi (yaprak, kök), besin ortamı çeşidi (B5, MS) ve NAA, 2,4-D, BAP, K gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarının etkileri araştırılmıştır.

Araştırmamızda kullandığımız yaprak ve kök eksplantları rejenerasyon yetenekleri karşılaştırıldığında yaprak eksplantının rejenerasyon yeteneğinin daha fazla olduğu saptanmıştır. MS ve B5 ortamı karşılaştırıldığında ortamların her ikisinde de kültüre alınan eksplantlarda karar meydana gelmiştir. Kararmanın engellenmesi için ortamlara 1mg/l PVP ilave edilmiştir. PVP ilavesi ile MS ortamındaki eksplantlarda kararmalar engellenmesine rağmen B5 ortamındaki eksplantlarda karar engellenmemiştir. Bu yüzden türün *in vitro* kültüre alınmasında MS ortamının daha uygun olduğu belirlenmiştir. Sürgün rejenerasyonunun uyarılması açısından bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonlarının etkisi değerlendirildiğinde, NAA ve BAP kombinasyonunun 2,4-D, K kombinasyonuna göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar, Cacho ve arkadaşlarının 1991 yılında yaptıkları çalışma ile benzerlik göstermektedir. Yapılan çalışmada, *Digitalis thapsi* türünün farklı eksplantlarından (yaprak, kök ve hipokotil) morfolojik farklılaşmanın meydana gelmesi için MS ortamına ilave edilen NAA'nın IAA göre daha etkili olduğunu ortaya konmuştur. Yapılan çalışmada ayrıca kinetin bütün eksplant denemelerinde farklılaşma için etkili olmadığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra yaprak eksplantlarından organogenezin teşvikinde NAA'nın kinetin veya BA ile kombinasyonunun daha etkili olduğu belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca en yüksek oranda sürgün rejenerasyonunu IAA'nın BA ile kombinasyonunun teşvik ettiği gözlenmiştir.

Digitalis obscura L. türü ile yapılan bir çalışmada, kotiledon, hipokotil ve kök eksplantlarının kullanılarak bitki büyüme düzenleyicilerinden özellikle BA'nın NAA veya IAA ile kombinasyonlarının, bitkinin kök ve hipokotil eksplantlarından yüksek oranda bitki rejenerasyonunu teşvik ettiği ortaya konmuştur (Perez- Bermudez ve ark.,1985).

Çalışmamızda, bitki büyüme düzenleyicilerinden oksin ve sitokin oranı değerlendirildiğinde, BAP miktarının NAA'ya göre besin ortamına daha yüksek miktarda ilave edilmesinin sürgün oluşumu için daha etkili olduğu belirlenmiştir. Besin ortamına özellikle 3 ya da 5 mg/l BAP'ın ilave edilmesi ile sürgün rejenerasyonun meydana geldiği

gözlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, *Digitalis thapsi* türü ile yapılan bir çalışma ile benzerlik göstermektedir (Cacco ve ark., 1991). Çalışmada yaprak eksplantının kültüre alındığı ortamda sitokin ve oksinin bir arada bulunmasının sürgün miktarını arttırdığı belirtilmiştir. Besin ortamına 3, 4, 5 mg/l BA'nın ilavesi ile kök ve hipokotil eksplantlarından sürgün oluşumu gerçekleşmiştir. Yüksek miktarda BAP'ın (3, 4, 5 mg/l), IAA, 2,4-D ya da NAA ile kombinasyonlu şekilde besin ortamına ilave edilmesi sonucunda ise yaprak eksplantından kallus oluşumu ve sürgün organogenezisinin meydana geldiği belirtilmiştir.

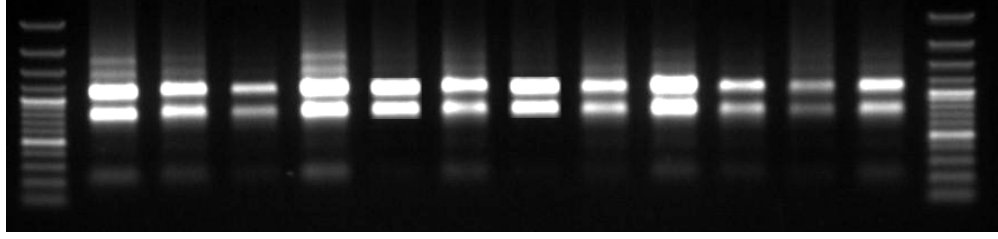
Çalışmamızda kullandığımız 30 farklı sürgün rejenerasyon ortamı karşılaştırıldığında, eksplant başına düşen sürgün sayısı dikkate alındığında *D. trojana* için en uygun rejenerasyon ortamının 0,1 mg/l NAA+3,0 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamı olduğu belirlenmiştir. 2002 yılında yapılan bir çalışmada, BA'nın tek başına *Digitalis minor* L. yaprak eksplantından adventif tomurcuk farklılaşmasını yönettiği ancak besin ortamına oksin ilavesinin önemli derecede tomurcuk oluşum kapasitesini arttırdığı belirlenmiştir (Sales ve ark., 2002). Herrera ve arkadaşları 1990 yılında *Digitalis thapsi* L. türünün tek aşamada sürgün çoğaltımını ve köklendirilmesini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada, sürgün çoğaltımının ve köklendirilmenin aynı oranda bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS ortamında teşviki için, oksininin (2,4 D, NAA ve IAA) tek başına ve ya sitokin (BA, K) ile farklı kombinasyonlarının etkileri araştırılmıştır. Araştırmacılar yaptıkları denemeler sonucunda en iyi sürgün çoğaltımının ve köklendirmenin 0.5 mg/l NAA ve 0.1 ya da 0.5 mg/l K içeren MS ortamında tek aşamada gerçekleştiğini belirlemişlerdir.

4.3. Moleküler Analizlere Ait Bulgular

4.3.1. RNA izolasyonu ile ilgili bulgular

Doğal ve *in vitro* bitki örneklerinin yapraklarından Invitrogen Purelink RNA Mini Kiti ile total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA'ların miktarları ve kalitesi spektrofotometre ve agaroz elektroforezi ile belirlenmiştir. %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülen total RNA'ya ait bantlar Şekil 31'de gösterilmiştir.

Elektroforezde görüntülenen RNA'lar spektrofotometre ile ölçülmüştür. Her iki ölçüm sonucunda RNA örneklerinin yeterli miktarda ve kalitede olduğu ve cDNA sentezi için kalıp olarak kullanılabilir olduğu belirlenmiştir.



Şekil 31. İzole Edilen Total RNA'ların Elektroforezi.

4.3.2. cDNA sentezi ile ilgili bulgular

Kalitesi ve miktarları uygun görülen RNA örnekleri ile cDNA sentezi Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda kalıp olarak kullanılan tüm RNA miktarları 0,025 µg/µl olarak kullanılmıştır. Reaksiyon hacmi 20 µl olarak ayarlanmıştır. mRNA'lardan cDNA sentezinin gerçekleşmesi için özellikle poly-A kuyruklu mRNA'lara bağlanan oligo-dT primerler tercih edilmiştir. Reaksiyon sonrası sentez edilen cDNA'lar doğrudan Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kalıp olarak kullanılmıştır.

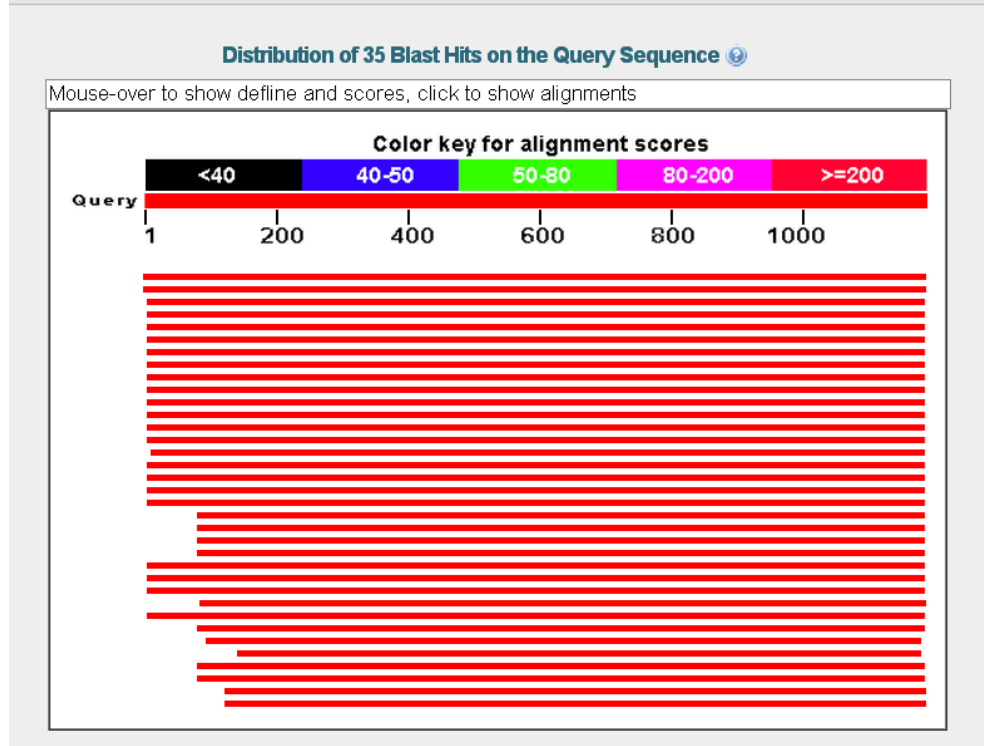
4.3.3. Biyoinformatik analizi ile ilgili bulgular

Progesteron 5β-reduktaz genine ait cDNA baz dizilişi, zincir sonlandırma yöntemi kullanılarak ortaya çıkarılmıştır. 3 tekrarlı olarak elde edilen diziler Sequencher 4.1.4. programı ile birleştirilmiş ve muhtemel dizi oluşturulmuştur. Dizi analizi sonucunda *D. trojana* türü P5βR genine ait 1170 baz çifti uzunluğunda bir cDNA dizisi belirlenmiştir (Şekil 32).

1	CAAGGTAATA	AGTTAACATT	TATCGCATAA	TTGCAACAAT	CCTAGCTATT	TATGTGTAAT
61	CTGACTGGTA	ATTGGTTGAA	ATAGAAAAGG	TTGGAAGAAG	ATGACGCACA	GCCAAAGCAT
121	TCGAGCGTGG	CGTTGATAGT	TGGGGTAACC	GGAATCATCG	GCAACAGCCT	GGCGGAGATC
181	CTGCCACTGG	CCGACACCCC	CGGCGGTCCG	TGGAAGGTAT	ACGGCGTCGC	CCGCCGCACC
241	AGACCCGCCT	GGCATGAGGA	TAATCCGTTC	AATTACGTCC	TGTGCGACAT	ATCCGATCCA
301	GATGACTCCC	AAGCCAAGCT	GTCACCTCTG	ACTGATGTTA	CCCACGTGTT	CTACGTTACC
361	TGGGCTAATC	GATCCACCGA	ACAAGAAAAC	TGTGAAGCCA	ATAGCAAAAT	GTTTCAGGAAC
421	GTGCTTGATG	CAGTTATCCC	TAATTGCCCC	AATTTGAAGC	ACATCTCATT	GCAGACTGGG
481	AGGAAGCATT	ACATGGGACC	ATTTGAATCC	TACGGGAAAA	TAGAATCCCA	TGATCCACCC
541	TACACTGAGG	ATTTGCCCAG	GTTGAAGTAC	ATGAACTTTT	ACTATGATTT	AGAGGATATT
601	ATGCTTGAGG	AGGTGGAGAA	GAAGGAGGGG	TTGACTTGGT	CTGTTTCATCG	CCCAGGGAAT
661	ATATTTGGGT	TTTCTCCATA	TAGTATGATG	AATTTGGTGG	GTACCCTTTG	TGTTTATGCA
721	GCTATTTGCA	AACACGAGGG	AAAGGTTTTG	AGGTTTACTG	GTTGTAAGGC	TGCGTGGGAT
781	GGGTACTCGG	ATTGCTCTGA	TGCGGATTTG	ATAGCGGAGC	ATCATATTTG	GGCTGCAGTT
841	GATCCTTATG	CAAAAACGA	GGCCTTTAAT	GTGAGTAATG	GAGATGTGTT	TAAATGGAAG
901	CATTTTTGGA	AGGTGTTGGC	AGAGCAGTTT	GGAGTAGAGT	GTGGAGAGTA	TGAAGAAGGG
961	GTGGATTTGA	AATTGCAGGA	TTTAATGAAG	GGGAAGGAGC	CGGTTTGGGA	GGAAATCGTG
1021	AGGGAGAATG	GATTGACACC	TACGAAACTG	AAGGATGTCG	GAATTTGTG	GTTTGGTGAT
1081	GTTATACTTG	GGAATGAGTG	TTTCTGGAT	AGTATGAACA	AGAGCAAGGA	GCATGGCTTT
1141	TTGGGATTTA	GAACTCCAAG	AATGCGTTCA			

Şekil 32. Progesteron 5 β - reduktaz geninin bir cDNA'sına ait baz dizilişi.

Dizi analizi sonucunda elde edilen *D. trojana* türünün *P5 β R* geninin cDNA'sına ait dizi, BLASTN programı kullanılarak diğer türlerdeki diziler ve bölgesel benzerlikleri belirlenmiştir (Şekil 33 ve Şekil 34). *D. trojana P5 β R* genine ait cDNA dizisi NCBI sitesinde BLAST programı ile diğer *Digitalis* türlerine ait *P5 β R* gen dizisi ile karşılaştırıldığında *D. lanata*, *D. cariensis* gibi *Digitalis* türleri ile yüksek oranda (%99) benzer olduğu bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu sonuçların, Herl ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan çalışmanın sonuçları ile benzer olduğu bulunmuştur. Çalışmada ilk kez *Digitalis lanata* Ehrh. türünde progesteron 5 β -reduktaz geninin bitkinin yapraklarından tam uzunlukta cDNA klonu izole edilmiş ve okuma çerçevesinin 1170 nükleotid içerdiği ve 389 aminoasit kodladığı belirlenmiştir. *D. lanata* türünün *P5 β R* cDNA ve protein dizisi *D.purpurea* ve *D. obscura* türlerinin dizileri ile karşılaştırıldığında *P5 β R* geninin *Digitalis* cinsi içerisinde yüksek oranda korunduğu belirtilmiştir.



Şekil 33. Progesteron 5 β -reduktaz geninin bir cDNA'sının BLASTN sonuçlarının grafik ile gösterimi.

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY385867.1	Digitalis lanata progesterone 5-beta-reductase gene, complete cds	2104	2104	99%	0.0	99%	
DQ213016.1	Digitalis cariensis progesterone 5-beta-reductase gene, complete cds	2060	2060	99%	0.0	98%	
DQ213018.1	Isoplexis sceptrum progesterone 5beta-reductase gene, complete cds	2058	2058	99%	0.0	99%	
DQ213017.1	Digitalis laevigata progesterone 5-beta-reductase gene, complete cds	2036	2036	99%	0.0	98%	
AY738711.1	Digitalis ferruginea progesterone 5-beta-reductase gene, complete cds	2030	2030	99%	0.0	98%	
AJ555127.1	Digitalis obscura p5Br gene for putative progesterone 5-beta-reductase	2030	2030	99%	0.0	98%	
DQ213016.1	Isoplexis chalcantha progesterone 5beta-reductase gene, complete cds	2025	2025	99%	0.0	98%	
DQ213015.1	Isoplexis canariensis progesterone 5beta-reductase gene, complete cds	2019	2019	99%	0.0	98%	
DQ466889.1	Digitalis minor putative progesterone 5 beta reductase gene, complete cds	2019	2019	99%	0.0	98%	
AY750898.1	Digitalis subalpina progesterone 5 beta reductase gene, complete cds	2013	2013	99%	0.0	98%	
DQ213017.1	Isoplexis isabelliana progesterone 5beta-reductase gene, complete cds	1997	1997	99%	0.0	98%	
AY385865.1	Digitalis grandiflora progesterone 5-beta-reductase gene, complete cds	1997	1997	99%	0.0	98%	
DQ263619.1	Digitalis nervosa progesterone 5-beta-reductase gene, complete cds	1997	1997	99%	0.0	98%	
DQ213022.1	Digitalis sibirica progesterone 5-beta-reductase gene, complete cds	1991	1991	99%	0.0	98%	
DQ213020.1	Digitalis davisiana progesterone 5-beta-reductase gene, complete cds	1986	1986	99%	0.0	98%	
DQ213018.1	Digitalis viridiflora progesterone 5-beta-reductase gene, complete cds	1986	1986	99%	0.0	98%	
DQ213021.1	Digitalis lutea progesterone 5-beta-reductase gene, complete cds	1980	1980	99%	0.0	97%	
DQ213019.1	Digitalis ciliata progesterone 5-beta-reductase gene, complete cds	1975	1975	99%	0.0	97%	
AY385866.1	Digitalis parviflora progesterone 5-beta-reductase gene, complete cds	1965	1965	99%	0.0	97%	
JN406519.1	Digitalis trojana putative progesterone 5-beta-reductase mRNA, complete cds	1960	1960	92%	0.0	99%	
AY574950.1	Digitalis lanata progesterone 5-beta-reductase mRNA, complete cds	1954	1954	92%	0.0	99%	
JN406517.1	Digitalis lamarkii voucher IKER 1790 putative progesterone 5-beta-reductase mRNA, complete cds	1927	1927	92%	0.0	99%	
JN406516.1	Digitalis cariensis voucher IKER 1727 putative progesterone 5-beta-reductase mRNA, complete cds	1921	1921	92%	0.0	99%	
DQ499643.1	Digitalis minor var. minor progesterone 5-beta-reductase gene, complete cds	1914	1914	99%	0.0	96%	
AY738710.1	Digitalis mariana subsp. heywoodii progesterone 5-beta-reductase gene, complete cds	1892	1892	99%	0.0	96%	
AY738712.1	Digitalis thapsi progesterone 5-beta-reductase gene, complete cds	1881	1881	99%	0.0	96%	
JN406518.1	Digitalis ferruginea subsp. schischkini putative progesterone 5-beta-reductase mRNA, complete cds	1879	1879	92%	0.0	98%	
AY385868.1	Digitalis purpurea putative progesterone 5-beta-reductase gene, complete cds	1869	1869	99%	0.0	96%	
AJ310673.1	Digitalis purpurea mRNA for progesterone 5-beta-reductase (p5Br) gene	1783	1783	92%	0.0	96%	
GU451677.1	Mentha x piperita progesterone 5-beta-reductase mRNA, complete cds	706	706	91%	0.0	79%	
GU354232.1	Nerium oleander progesterone 5-beta-reductase mRNA, complete cds	623	623	87%	1e-174	78%	
JF504670.1	Solanum lycopersicum putative steroid 5beta-reductase mRNA, complete cds	556	556	92%	1e-154	76%	
AK321416.1	Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1024BG08, HTC in leaf	556	556	92%	1e-154	76%	
XM_002326941.1	Populus trichocarpa predicted protein, mRNA	244	244	89%	9e-61	71%	U G M
AC215851.1	Populus trichocarpa clone POP032-F08, complete sequence	244	244	89%	9e-61	71%	

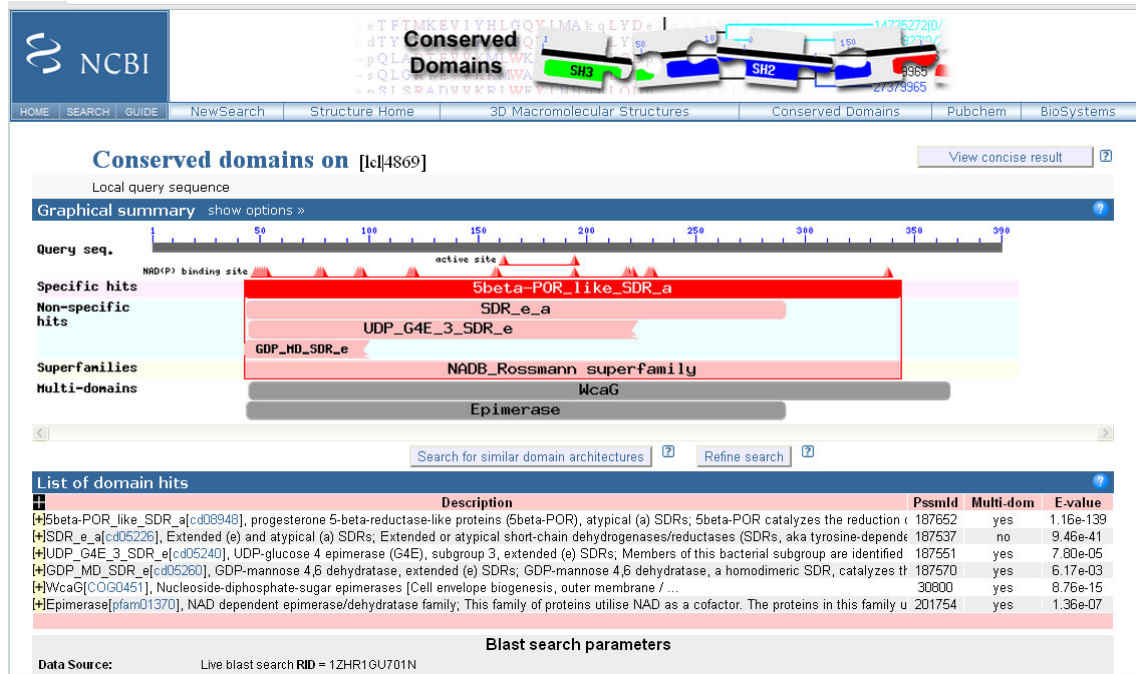
Şekil 34. Progesteron 5 β -reduktaz geninin bir cDNA'sının BLASTN sonuçlarının diğer türler ile karşılaştırılması.

Elde edilen cDNA nükleotid dizisine karşılık gelen muhtemel polipeptid dizisi Transeq programı kullanılarak oluşturmuş ve 390 uzunluğunda bir polipeptid dizisi elde edilmiştir (Şekil 35).

```
QGNKLTFFIA* LQQS*LFMCN LTGNWLK*KR LEEDDAQPKH SSVALIVGVT GIIGNSLAEI 60
LPLADTPGGP WKVYGVARRT RPAWHEDNPF NYVLCDISDP DDSQAKLSPL TDVTHVIFYVT 120
WANRSTEQEN CEANSKMFRN VLDVIPNCP NLKHISLQTG RKHYMGPFES YGKIESHDPP 180
YTEDLPRPKY MNFYDLEDI MLEEVEKKEG LTWSVHRPGN IFGFSPYSMM NLVGTLCVYA 240
AICKHEGKVL RFTGCKAAWD GYSDCSADL IAEHHIWA AV DPYAKNEAFN VSNGDVFKWK 300
HFWKVLAEQF GVECGEYEEG VDLKLQDLMK GKEPVWEEIV RENGLTPTKL KDVGILWFGD 360
VILGNECFLD SMNKSKEHGF LGFRTPRMRS
```

Şekil 35. Progesteron 5β- reduktaz geninin bir cDNA'sına ait muhtemel polipeptid dizisi.

Daha sonra progesteron 5β- reduktaz geninin bir cDNA'sına ait muhtemel dizi protein BLAST programı ile diğer diziler ile karşılaştırılmıştır Protein BLAST sonuçlarına göre *D. trojana* türünün *P5βR* genine ait muhtemel polipeptid dizisinin progesteron 5β reduktaz benzeri protein olduğu ve SDR familyasına ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 36).



Şekil 36. Progesteron 5β-reduktaz geninin bir cDNA'sına ait muhtemel polipeptid dizisinin BLASTP sonuçları.

BLASTP sonuçlarına göre, muhtemel polipeptid dizisinin (NADB) domaine bağlanan NAD(P)H/NAD(P) Rossmann katlamasına sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

2007 yılında yapılan bir çalışmada *D. purpurea* türünün *P5βR* geninin 5'RACE PCR reaksiyonu ile tam uzunlukta cDNA'sı elde edilmiştir. Elde edilen cDNA'nın, 1357 bç okuma çerçevesi, 389 aminoasit kodladığı, moleküler ağırlığının 43,963 Da olduğu, 76 bç uzunlukta intron içerdiği belirlenmiştir. Yaprak, kök, gövde, çiçek ve iletim demetlerinde gen anlatım seviyesinin kardenolit birikimi ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca BLAST 2 programı ile karşılaştırıldığında, bitkilerdeki progesteron *P5βR* enziminin SDR ailesine ait olduğu bunun yanı sıra hayvanlarda bulunan *P5βR* enziminin ise AKR süper familyasına ait olduğundan dolayı yapısal homoloji göstermedikleri belirtilmiştir (Gavidia ve ark., 2007).

2008 yılında yapılan bir çalışmada progesteron 5β-reduktaz geninin okuma çerçevesinin yaklaşık 1170 nükleotid uzunluğunda, yaklaşık 389 aminoasit kodladığı belirlenmiştir. Çalışmada, progesteron 5β-reduktaz geninin yüksek korunmuş olduğu sadece *Digitalis* cinsinde değil, *Arabidopsis* türünde de belirlenmiştir (Herl ve ark., 2008).

Bauer ve ark. (2010), tarafından yapılan bir çalışmada Brassicales, Gentianales, Lamiales, Malvales, Solanales sınıflarına ait 5β kardenolit üreten ve üretmeyen bitkilerden 11 adet 5β-reduktaz ortoloğu izole edilmiştir. Çalışmada *P5βR* aminoasit dizilerinin yüksek oranda korunduğu, belirli bir motif içerdiği, 7 korunmuş aminoasit bölgesi ve substrat bağlanma bölgesi içerdiği ortaya konmuştur.

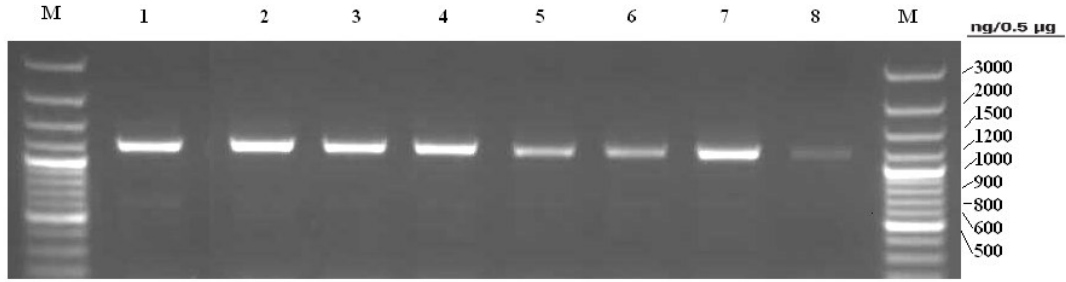
4.3.4. *P5βR* geninin ifadesi ile ilgili bulgular

Her bir bitki örneğinin yapraklarındaki *P5βR* geninin ifadesinin doğru bir şekilde belirlenmesi için cDNA reaksiyonları eşit miktarda kalıp RNA ile kurulmuştur. cDNA'ların PCR ile çoğaltılması için eşit miktarda cDNA kalıp olarak kullanılarak *P5βR* geni için dizayn edilen primerler ile optimize edilen PCR koşullarında *P5βR* geninin çoğaltımı gerçekleştirilmiştir.

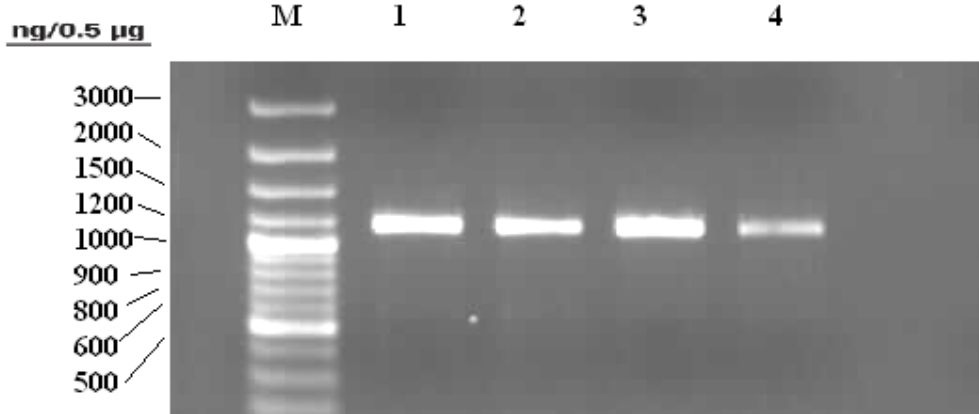
DNA polimeraz enziminin 3'→5' ekzonükleaz proofreading aktivesi nedeni ile primer degradasyonuna sebep olmaması için buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Tüm PCR örnekleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 37 ve Şekil 38). Jele yüklenen marker boyutları ile karşılaştırıldığında genin cDNA uzunluğunun

yaklaşık 1170 bç olduğu belirlenmiştir. Reaksiyonda kontaminasyon olup olmadığı negatif kontrol ile belirlenmiştir.

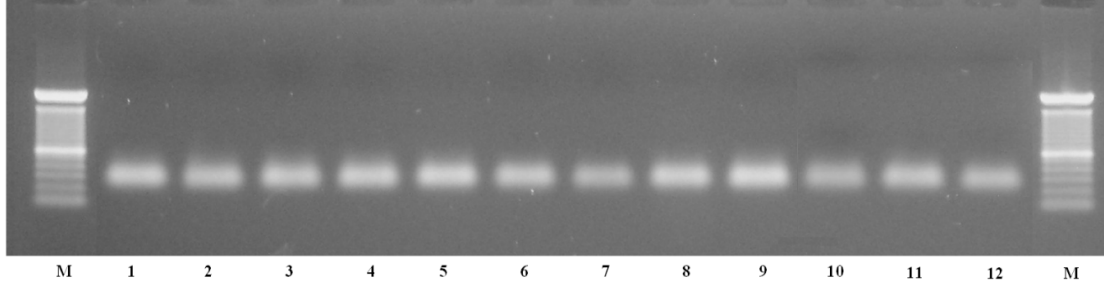


Şekil 37. 836 m (1), 961 m (2), 1047 m (3), 1191 m (4) Mayıs ayında ve 836 m (5), 961 m (6), 1047 m (7), 1191 m'den (8) Temmuz ayında toplanan bitkilerdeki *P5βR* geninin ifadesi.



Şekil 38. 0,1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP ortamında üretilen 12 haftalık (1), 0,1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP ortamında üretilen 17 haftalık (2), 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP ortamında üretilen 12 haftalık (3), 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP ortamında üretilen 17 haftalık bitkilerdeki (4) *P5βR* geninin ifadesi.

Progesteron 5β-reduktaz geninin ifadesinin belirlenmesi için kontrol olarak housekeeping gen olarak kullanılan hücrelerde her zaman ifade edilen *Act2* kullanılmıştır. Yaklaşık 270 bç uzunluğunda elde edilen örneklere ait *Act2* geninin ifadesi Şekil 39'de belirtilmiştir.

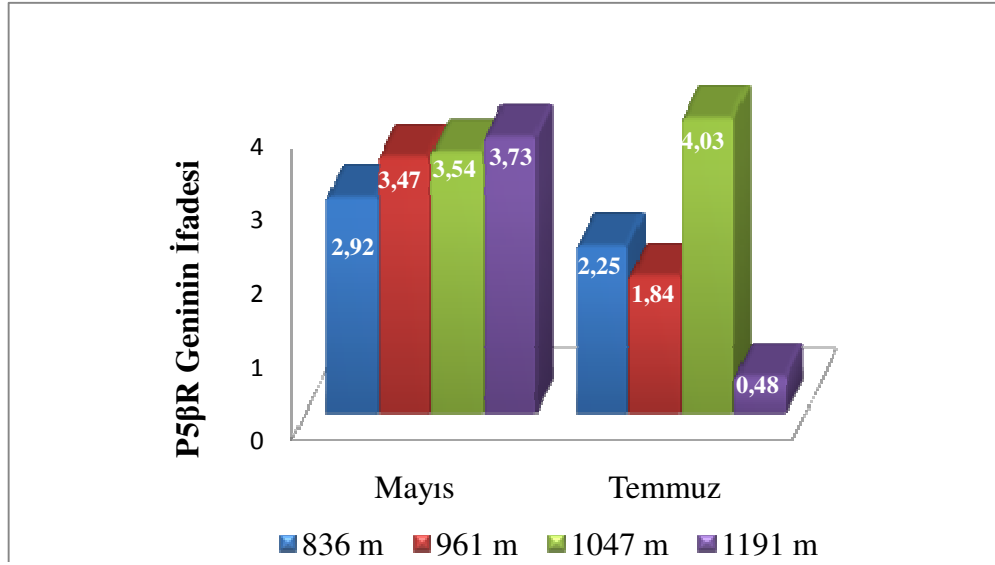


Şekil 39. 836 m (1), 961 m (2), 1047 m (3), 1191 m'den (4) Mayıs ayında toplanan bitkiler, 836 m (5), 961 m (6), 1047 m (7), 1191 m'den (8) Temmuz ayında toplanan bitkiler, 0,1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP ortamında üretilen 12 haftalık bitki (9), 0,1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP ortamında üretilen 17 haftalık bitki (10), 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP ortamında üretilen 12 haftalık bitki (11), 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP ortamında üretilen 17 haftalık bitkideki (12) *Act2* geninin ifadesi.

Bitki örneklerindeki Progesteron 5 β -Reduktaz geninin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için Gelpro3 programından yararlanılmıştır. Programda jel görüntüsü üzerinden yapılan hesaplamalarda bitki örneklerindeki *P5 β R* genin ifadesinin nicel değeri hesaplanmıştır. *P5 β R* gen ifadesinin belirlenmesinde ve örnekler arası karşılaştırılmasında referans gen olarak *Act2* geni kullanılmıştır. Hesaplama *P5 β R* geninin max IOD'nin *Act2* geninin max IOD'ye oranlaması ile yapılmıştır. Elde edilen veriler ile grafik oluşturulmuş, Mayıs ve Temmuz aylarında toplanan bitkiler ile *in vitro* üretilen bitkilerdeki *P5 β R* genin ifadesinin bağıl miktarları belirlenmiştir.

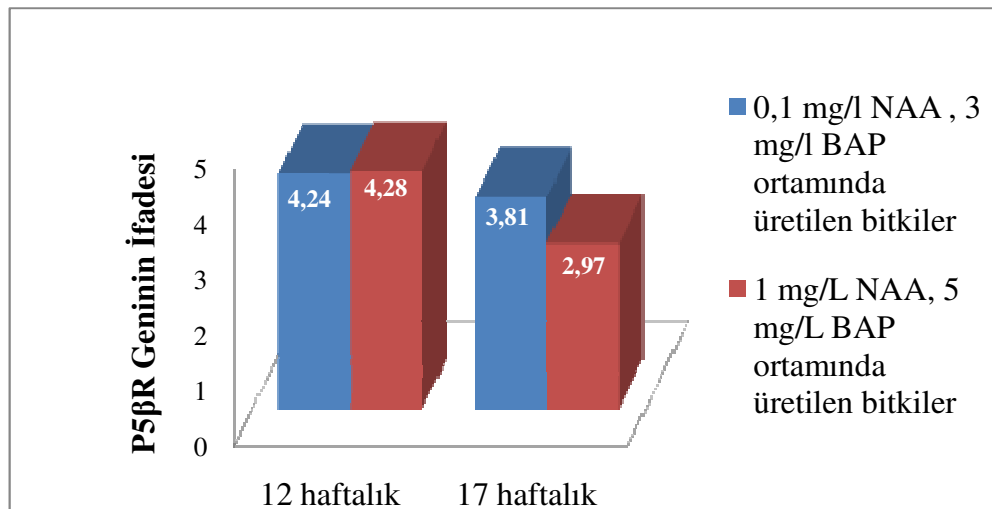
Mayıs ve Temmuz aylarında farklı yükseklikten toplanan bitki örnekleri karşılaştırıldığında *P5 β R* geninin ifadesinin farklı olduğu belirlenmiştir. Mayıs ayında farklı yükseklikten toplanan bitkilerdeki *P5 β R* geninin ifadesinin yüksekliğe paralel olarak arttığı görülmüştür. Ayrıca Mayıs ayında toplanan bitkiler içerisinde en yüksek *P5 β R* gen ifadesi 1191 m'den toplanan bitkilerde belirlenmiştir (Şekil 40).

Temmuz ayında farklı yüksekliklerden toplanan bitkilerdeki *P5 β R* geninin ifadesinin değişkenliğinin fazla olduğu görülmüştür. Temmuz ayında toplanan bitkilerde gen ifadesinin yüksekliğe göre değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca Temmuz ayında 1047 metreden toplanan bitkilerdeki *P5 β R* gen ifadesinin (4,03) diğer yüksekliklere göre en yüksek olduğu belirlenmiştir. Temmuz ayında toplanan bitkiler içerisinde *P5 β R* genin en az ifadesi ise 1191 metreden toplanan bitkilerde görülmüştür (Şekil 40).



Şekil 40. Mayıs ve Temmuz aylarında Kazdağlarından farklı yüksekliklerden toplanan bitkilerdeki $P5\beta R$ geninin ifadesinin bağıl miktarı.

0,1 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP ortamında üretilen 12 haftalık bitkiler, 0,1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP ortamında üretilen 17 haftalık bitkiler, 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP ortamında üretilen 12 haftalık bitkiler ve 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP ortamında üretilen 17 haftalık bitkilerdeki $P5\beta R$ geninin ifadesi belirlenmiştir. *In vitro* üretilen 12 ve 17 haftalık bitkilerdeki $P5\beta R$ geninin ifadesi karşılaştırıldığında 12 haftalık bitkilerde (genç bitkilerde) 17 haftalık bitkilere göre $P5\beta R$ geninin ifadesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 41).



Şekil 41. *In vitro* üretilen bitkilerdeki gen ifadesinin bağıl miktarı.

Çalışmamızda doğal ortamdan toplanan bitkilerdeki ve *in vitro* bitkilerdeki *P5βR* gen ifadesinin bağıl miktarları ile karşılaştırıldığında *P5βR* gen ifadesinin *in vitro* üretilen bitkilerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

2004 yılında Roca-Perez ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, İspanya İber Yarımadası'nın 3 ayrı biyoklimatik bölgesinde yayılış gösteren 10 ayrı *Digitalis obscura* doğal populasyonlarının kardenolit üretimleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca bu populasyonların kardenolit üretimlerinin mevsimsel değişimi de belirlenmiştir. Bunun yanı sıra progesteron 5β redüktaz geninin mevsimsel ifadesine bakılmıştır. Ayora ve Toro populasyonlarında *Dop5βr* gen ekspresyonunun Şubat ayından Temmuz ayına kadar arttığı gözlenmiştir. Ancak genin ekspresyon seviyesi Toro populasyonunda daha düşük olduğu belirtilmiştir. Ayora ve Toro populasyonlarında *Dop5βr* gen ekspresyonunun Şubat ayından Temmuz ayına kadar arttığı gözlenmiştir. Çalışılan populasyonlarda *Dop5βr* gen ekspresyonunun ve toplam kardenolit miktarının birbirine paralel olarak artış gösterdiği belirlenmiştir.

4.4. Yapraklardaki Kardenolit Miktarının HPLC ile Analizi ile İlgili Bulgular

4.4.1. Katı faz ekstraksiyonu ile ilgili bulgular

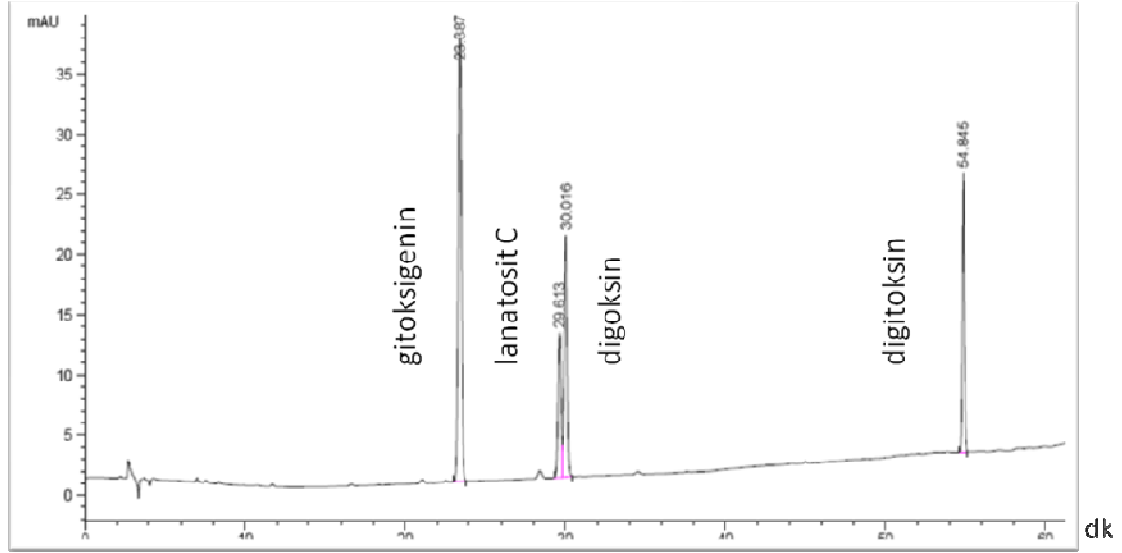
Bitki örneklerinin içerdikleri kardenolit miktarının belirlenmesi için SPE yöntemi uygulanmıştır. İlk aşamada metanol ile ekstraksiyon yapılmıştır. Daha sonra monosodyum fosfat ve kurşun asetat ile istenmeyen diğer bileşiklerin ayrıştırılmaları sağlanmıştır. Kartuş içerisindeki tutucu maddenin aktif hale getirilmesi ve etkileşim için gerekli ortamın oluşması amacıyla kartuşların şartlandırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler kartuştan geçirilerek dolgu maddesine kardenolitlerin tutunmaları sağlanmıştır. İstenmeyen bileşiklerin ise kartuştan yıkanarak uzaklaşmaları sağlanmıştır. Son aşamada ise uygun çözücü olarak metanol kullanılarak kartuşa tutunan tüm bileşikler ayrıştırılmıştır.

SPE ile ekstrakte edilen örneklerin HPLC kromatogramları incelendiğinde baseline kirliliğinin olmadığı, piklerde sorun olmadığı belirlenmiş ve bu yüzden kardenolidlerin ekstraksiyonunda SPE'nin uygun yöntem olduğu belirlenmiştir.

4.4.2. HPLC ile analizi ile ilgili bulgular

Örnek analizi öncesi standartlar hazırlanmıştır. Standart olarak lanatosit C, gitoksigenin, digoksin, digitoksin kullanılmıştır. Standartların her biri ayrı ayrı stok olarak hazırlanmıştır. Her biri cihazda enjeksiyonları ayrı ayrı yapılmış ve geldikleri zamanlar kaydedilmiştir. Tek tek hazırlanan standart çözeltilerinden uygun miktarlarda alınarak tüm

standartları içeren ana stok standart solüsyonları hazırlanarak enjeksiyonları yapılmıştır (Şekil 42).



Şekil 42. Standartlara ait kromatogram.

HPLC analizi sonucunda her bir standartın gelme zamanı ve pik alanı belirlenmiştir (Çizelge 8). Standart solusyondan sonra sırasıyla SPE kolondan geçirilen ve metanolla ayrıştırılan tüm örneklerin enjeksiyonu yapılmış ve her bir örneğe ait kromatogram alınmıştır. Örneklerin içerdiği kardenolidlerin zamanları ve pik alanlarına ait rapor alınmıştır.

Çizelge 8. Kardenolit standartlarına ait bilgiler.

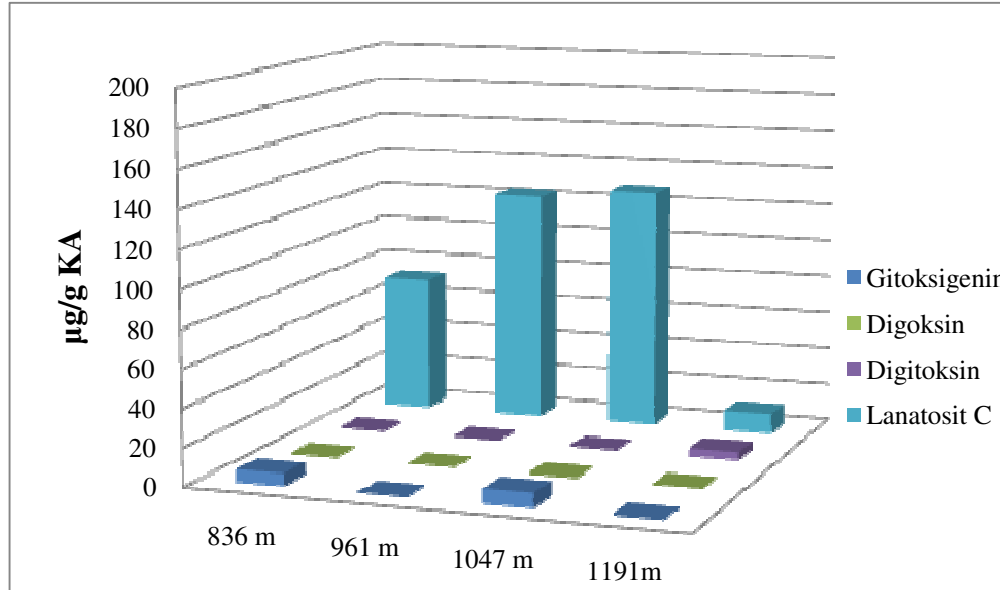
Standart	Geldiği Dakika	Pik Alanı	Miktar
Gitoksigenin	23.387	127.46731	0.00002538 g
Lanatosit C	29.613	57.69128	0.00002952 g
Digoksin	30.016	69.20162	0.00002652 g
Digitoksin	54.845	74.67268	0.00003442 g

Standartlara ait kromatogramda her bir örneğin verdiği pik alanı kullanılarak Mayıs ve Temmuz aylarında toplanan bitki örnekleri ve *in vitro* üretilen bitkilerin yapraklarındaki lanatosit C, gitoksigenin, digoksin ve digitoksin miktarları pik alanları kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir örnekteki kardenolid miktarları, 1 gram kuru yaprak ağırlığında mikro gram düzeyinde belirlenmiştir.

HPLC analizi sonucunda, bitkilerdeki kardenolit içeriğinin yüksekliğe ve aylara göre değiştiği belirlenmiştir. Mayıs ayındaki bitkilerin gitoksigenin, lanatosit C, digoksin ve digitoksin içerikleri karşılaştırıldığında bitkilerin gitoksigenin, lanatosit C, digitoksin içerdiği ancak digoksin içermediği belirlenmiştir (Çizelge 9). Mayıs ayında toplanan bitkilerde en fazla miktarda lanatosit C'ye rastlanmış ancak digoksin hiçbir örnekte tespit edilememiştir. Kardenolit içeriği bakımından farklı yüksekliklerdeki bitkiler karşılaştırıldığında Mayıs ayında 1047 metreden toplanan örneklerde lanatosit C içeriği (128 µg/g KA) daha fazla bulunmuştur (Şekil 43).

Çizelge 9. Mayıs ayında toplanan bitki örneklerine ait HPLC sonuçları

Yükseklik	Gitoksigenin (µg/g KA)	Digoksin (µg/g KA)	Lanatosit C (µg/g KA)	Digitoksin (µg/g KA)
836 m	6,7±0,98	0	72±11,31	0
961 m	0	0	123±12,72	0
1041 m	7,5±1,76	0	128±13,43	0
1191 m	0	0	10,7±1,99	4±1,41



Şekil 43. Mayıs ayında toplanan bitkilere ait kardenolit içerikleri.

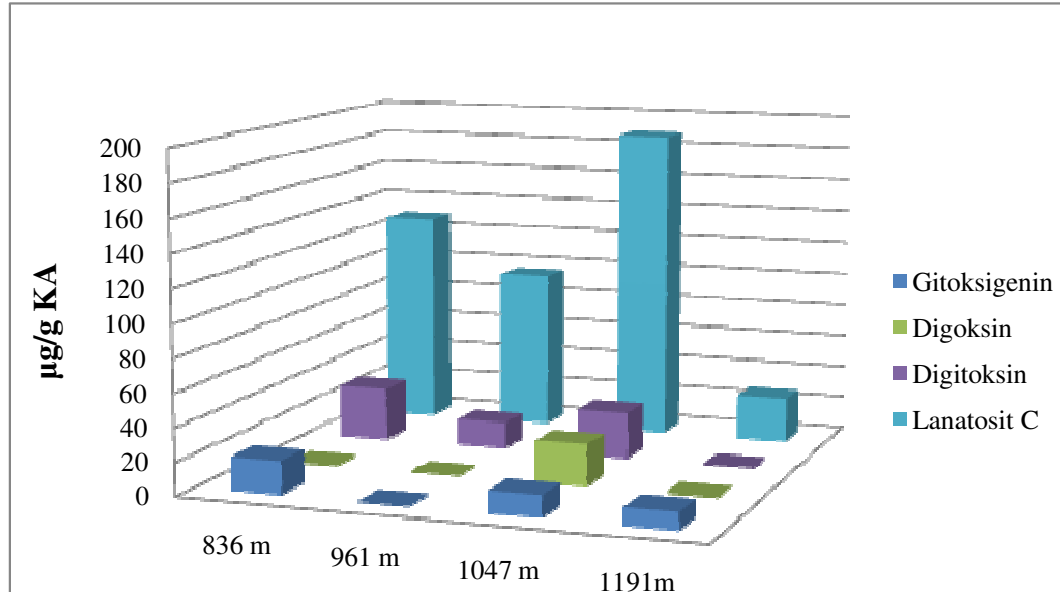
Temmuz ayında farklı yüksekliklerden toplanan bitkilerde gitoksigenin, lanatosit C, digoksin ve digitoksin tespit edilmiştir (Çizelge 10). Temmuz ayındaki örneklerde en fazla miktarda rastlanan kardenolitin lanatosit C olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Temmuz ayında 1191 metreden toplanan örneklerde ise en düşük kardenolit içeriği tespit edilmiştir.

Çizelge 10. Temmuz Ayında Toplanan bitki örneklerine ait HPLC sonuçları

Yükseklik	Gitoksigenin (µg/g KA)	Digoksin (µg/g KA)	Lanatosit C (µg/g KA)	Digitoksin (µg/g KA)
836 m	20±4,78	0	129±10,36	32± 7,6
961 m	0	0	96±4,24	16±4,94
1041 m	13± 2,12	25±3,53	188± 14,16	28±5,65
1191 m	10,4±0,98	0	27±2,12	0

Temmuz ayında 1047 metreden toplanan bitkilerde gitoksigenin, lanatosit C, digoksin ve digitoksine rastlanmıştır. Kardenolit içeriği bakımından farklı yüksekliklerdeki

bitkiler karşılaştırıldığında Temmuz ayında 1047 metreden toplanan bitki örneklerinde lanatosit C içeriği (188 $\mu\text{g/g KA}$) diğer yükseklikten toplanan örneklere göre daha fazla bulunmuştur (Şekil 44).



Şekil 44. Temmuz ayında toplanan bitkilere ait kardenolit içerikleri.

Mayıs ve Temmuz ayında toplanan bitkiler kardenolit içerikleri bakımından karşılaştırıldığında, Temmuz ayında toplanan bitkilerde gitoksigenin, lanatosit C, digoksin ve digitoksin içeriklerinin ($\mu\text{g/g KA}$) Mayıs ayında toplanan bitkilerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kardenolit içerikleri bakımından farklı yüksekliklerden toplanan bitkiler karşılaştırıldığında Mayıs ve Temmuz aylarının her ikisinde de 1047 metreden toplanan bitkilerin kardenolit içeriklerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan HPLC analiz sonucunda 0,1 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP ortamında üretilen 12 haftalık bitkiler, 0,1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP ortamında üretilen 17 haftalık bitkiler, 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP ortamında üretilen 12 haftalık bitkiler ve 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP ortamında üretilen 17 haftalık bitkilerden sadece 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP ortamında üretilen 12 haftalık bitkilerde kardenolit tespit edilebilmiştir.

Çizelge 11. 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP ortamında üretilen 12 haftalık bitkilerin kardenolid içerikleri.

Kardenolid	Miktar ($\mu\text{g/ g KA}$)
Lanatosit C	10,288 \pm 1,52
Digoksin	2,068 \pm 0,04

Doğal ortamda yayılış gösteren bitkiler ile *in vitro* üretilen bitkiler çalışmamızda analiz edilen dört kardenolid içeriği bakımından karşılaştırıldığında, doğal ortamdan toplanan bitkilerdeki kardenolit içeriğinin *in vitro* üretilen bitkilere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Mayıs ayında toplanan bitkilerde *P5 β R* gen ifadesi ve kardenolid üretimi arasında 1191 metreden toplanan bitkiler hariç paralellik görülmüştür. Temmuz ayında toplanan bitkilerde *P5 β R* gen ifadesinin kardenolid üretimi ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir. *In vitro* bitkilerde *P5 β R* gen ifadesinin kardenolid üretimi arasındaki ilişki belirlenememiştir.

Braga ve ark. (1997), *Digitalis lanata* türünde dış ortamda yetiştirilen çiçeklenme dönemindeki 12 aylık bitkilerin ve çiçeklenme dönemi sonrası 18 aylık bitkilerin rozet yapraklarındaki kardenolit içeriklerinin analiz sonucunda genel olarak analiz edilen kardenolitlerin 12 aylık bitkilerdeki içeriklerinin 18 aylık bitkilere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. 18 aylık bitkilerde 12 aylık bitkiye göre lanatosit A içeriğinin azaldığı bunun yanı sıra lanatosit C miktarının arttığı görülmüştür. Digitoksin miktarı 18 aylık bitkilerde daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Lanatosit C ve digoksin miktarı 12 aylık bitkilerde 1820 \pm 900 nmol/g, 18 aylık bitkilerde ise 2040 \pm 840 nmol/g olarak ölçülmüştür.

Roca-Perez ve ark. (2004), tarafından yapılan bir çalışmada, İspanya İber Yarımadası'nın 3 ayrı biyoklimatik bölgesinde yayılış gösteren 10 ayrı *Digitalis obscura* doğal populasyonlarının kardenolit üretimleri karşılaştırıldığında toplam kardenolit içeriğinin en yüksek Ayora populasyonunda (2257 $\mu\text{g g}^{-1}$), en düşük ise Camporrobles

(964 $\mu\text{g g}^{-1}$), Olocou (895 $\mu\text{g g}^{-1}$) ve Toro (704 $\mu\text{g g}^{-1}$) populasyonlarında olduğu belirlenmiştir.

Gürel ve ark. (2010), yürüttükleri projede, Türkiye'ye endemik dört yüksükotu türünde (*Digitalis davisiana*, *D. cariensis*, *D. trojana* ve *D. lamarckii*) *in vitro* rejenerasyon ve kardenolit analizi çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Projede *D. trojana* türünde lanatosit C miktarı açısından en fazla kardenolit 400-435 metre yükseklikteki bitkilerde tespit edilmiştir (50.3 mg/kg KA). Ayrıca lanatosit C, diğer endemik türlere nazaran bu türde en fazla miktarda *D. trojana* türünde belirlenmiştir. Bu türde digitoksine ve gitoksigenine rastlanmamış ve digoksin (çiçeklenme, Haziran dönemi için, en düşük 43.7, en yüksek 146.31 mg/kg KA). miktarı da genel olarak diğer türlere göre daha az miktarda tesbit edilmiştir.

Gürel ve ark., 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada *Digitalis davisiana* Heywood türünün flamingo gagası ve hipokotil eksplantlarından 0,5 mg/l TDZ ve 0,25 mg/l IAA içeren LS ortamında oluşan 6 haftalık bitkilerin kardenolit içeriklerini analiz etmişlerdir. Bitkilerin digoksin içeriklerinin 12,59 mg/kg, lanatosit C içeriklerinin 2,45 mg/kg olduğu belirlenmiştir. Doğal ortamdan toplanan bitkilerde ise en yüksek digoksin içeriği (246,58 mg/kg) Temmuz ayında çiçeklenme periyodunda toplanan bitkilerde belirlenmiştir. Lanatosit C içeriği ise Eylül ayında toplanan bitkilerde 3,36 mg/kg belirlenmiş diğer aylarda (Haziran, Temmuz, Eylül) ise iz miktarda olduğu belirlenmiştir.

Roca-Perez ve ark. (2004), tarafından yapılan araştırmada *Digitalis* türlerinde kardenolit biyosentezinin temel olarak morfolojik farklılaşma (Eisenbeiß ve ark., 1999) ve genotipe bağlı olduğu (Gavidia ve ark., 1996; Nebauerve ark., 1999) belirtilmiştir. Tıbbi amaçlı sekonder metabolitlerin üretiminin artırılması için bu sekonder metabolitlerin sentezini kontrol eden ve etkileyen faktörleri anlamak ve belirlemenin gerekli olduğu belirtilmiştir.

2004 yılında Roca-Perez ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Temmuz ayında kardenolit üretiminin yüksek olması, yüksek sıcaklık ve ışık yoğunluğu, fotoperiyodun uzaması gibi yaz mevsiminin tipik çevresel koşullarında genç yaprakların gelişimini bu dönemde tamamlamaları, olgun yaprakların farklılaşma seviyelerine ulaşmalarının sonucu olarak genç ve yaşlı yaprakların kardenolit içerikleri benzer bulunmuştur.

Çevresel koşulların yanı sıra buna paralel diğer olgular yazın gözlenen yüksek kardenolit üretimini açıklayabilmektedir. Bitkinin büyüme oranının en yüksek seviyeye ulaştığı Mayıs döneminde *D. obscura* yapraklarında kardenolit miktarı düşük bulunmuştur. Bu yüzden yüksek miktarda karbon gerekmektedir. Temmuz ayında yüksek fotosentez oranı ve düşük bitki gelişimi ile üretilen karbonun çoğunun sekonder metabolit üretiminde kullanılması sonucu kardenolit biyosentezi ve birikiminde artış gözleendiği yorumu yapılmıştır. Ayrıca bahar mevsimi sonu ve yaz sırasında çok sayıda böceğin bitki ile etkileşimi sonucu kardenolit üretimi artmaktadır (Roca-Perez ve ark., 2004).

BÖLÜM 5**SONUÇ VE ÖNERİLER**

Bölgemize endemik ve tıbbi öneme sahip sekonder bileşiklerin elde edildiği *Digitalis trojana* türünün genetik kaynağının korunması, doğal ortamdan alınmış olan ve *in vitro* olarak yetiştirilen bitkilerin kardenolit çeşitlerinin ve miktarlarının analizi, kardenolit biyosentezinde görev alan 5 β -reduktaz geninin ifadesi düzeylerindeki değişimlerinin belirlenmesi sağlanmıştır.

Çalışmamızda, kırmızı kitaba göre zarar görebilir kategorisinde yer alan ve günden güne nesli tükenmekte olan *Digitalis trojana* türünün *ex situ* korunması için *in vitro* kültüre alınması ve organogenezis yoluyla mikroçoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Türün mikroçoğaltımında *in vitro* koşulların tamamı optimize edilmiştir.

Bir ülkenin floristik zenginliği ve çeşitliliği, içerdiği nadir ve endemik taksonların fazlalığı ile önem kazanmaktadır. Önemli bitki alanlarımızdan biri olan Kazdağları çok zengin bir bitki çeşitliliğine sahiptir. Ancak Kazdağlarındaki birçok bitki türü Türkiye kırmızı kitabına göre farklı risk kategorilerinde yer almakta ve popülasyonları azaldıkça bir üst kategoriye geçmekte ve yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmaktadırlar. Bu biyoçeşitliliğin yok olmaması, gelecek nesillere aktarılması ve sürdürülebilirliği için bitki türüne göre uygun bir strateji ile koruma altına alınmaları gerekmektedir.

Bitki türlerinin koruma altına alınmasında türün çeşidi, genetik yapısı gibi bir çok faktör dikkate alınarak en uygun koruma alanı belirlenmelidir. Doku kültürü teknikleri, özellikle nadir, endemik ve ekonomik bitki türlerinin koruma altına alınmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca, generatif ve vejetatif çoğaltılmasında zorluklar yaşanan bitki türlerinin, hücre veya dokularının kültüre alınması, yeni bitkilerin üretilmesi ve geliştirilmesi ile klasik bitki ıslahına alternatif hızlı, güvenilir ve kontrollü bir yöntem olarak uygulanabilmektedir. Doku kültürü teknikleri ile materyalin hastalıklardan arındırılması, materyalin toplanması ve çoğaltılması amacıyla da yararlanılmaktadır. Ayrıca bitkisel stokların oluşturulmasında küçük alanlara ihtiyaç duyulması da büyük bir avantaj sağlamaktadır.

Biyoçeşitliliğin korunmasında uygulanan *in situ* ve *ex situ* karşılaştırıldığında *in situ* koruma daha güvenilir ve daha ucuzdur. *In situ* korumada bir tür koruma altına alınırken ekosistemde yer alan diğer türlerinde koruması sağlanmaktadır. Buna karşın *ex situ*

yöntemlerde bir türün popülasyonunun tamamı değil sadece belirli sayıda bireyi koruma altına alınabilmektedir. Sınırlı sayıdaki bu bireyler popülasyonun gen havuzunu tam olarak yansıtamamaktadır. Ayrıca türler yapay ortamda korunduklarında yapay seleksiyona uğramaktadırlar. *Ex situ* koruma için ülkeler yeterli maddi kaynak ayırmamaktadırlar. Ancak tüm bunlara rağmen doku kültürü gibi *ex situ* koruma alanları *in situ* alanların herhangi bir nedenle yok olmasına karşı bir güvence sağlamaktadır. Ayrıca günümüzde bitki türlerinin koruma altına alınma çalışmalarında *in situ* ve *ex situ* korumanın her ikisinin bir arada gerçekleştirilmesi daha etkili olacaktır. Böylece türlerin korunma altına alınması ve gelecek nesillere aktarılması çok daha etkili olarak gerçekleştirilebilir.

Doktora tez araştırmamızda, ilk kez doğadan toplanan ve *in vitro* olarak yetiştirilen *Digitalis trojana* bitkilerinde, tıpta uzun yıllardır kullanılan kardenolitlerin biyosentezinde önemli role sahip olan *P5βR* geninin ifadesi belirlenmiştir. Kardenolit üretiminde kilit role sahip *P5βR* geninin ifadesinin artırılması ve buna bağlı olarak kardenolit üretiminin belirlenmesi için elisitör uygulaması, yaralanma, kuraklık, ısı şoku gibi farklı uygulamaların yapılması etkili olacaktır.

Araştırmamızda *P5βR* gen ifadesi ile lanatosit C, digitoksin, digoksin ve gitoksinin kardenolitlerinin miktarları arasındaki ilişki belirlenmeye çalışılmıştır. Ancak elde edilen sonuçlar doğrultusunda *P5βR* gen ifadesi ile kardenolitlerinin miktarları arasındaki ilişki tam olarak belirlenememiştir. İlişkinin belirlenebilmesi ya da daha net bilgi sahibi olunabilmesi için 4 kardenolitin yeterli olmadığı görülmüştür. Bu yüzden daha fazla kardenolit çeşidinin analizi ya da toplam kardenolit miktarının belirlenmesi ve kullanılmasının daha etkili olacağı düşünülmektedir.

Ayrıca *P5βR* geninin tek başına kardenolid biyosentezinin aydınlatılması ve üretimine ilişkin bilgi için yetersiz olduğu görülmüştür. Bu yüzden kardenolit biyosentez yolunda yer alan diğer enzimleri sentezleyen genlerinde tanımlanması ve karakterizasyonu, kardenolit biyosentez yolunun tamamen aydınlatılması bakımından önemlidir. kardenolit biyosentez mekanizmasının tamamen aydınlatılması kardenolit üretiminin artırılması ve daha fazla ürün elde edilmesi için önem göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Akı C. ve Çördük N., 2008. Callogenesis of Kazdağı Endemic plant *Sideritis trojana*. *Proceedings of the 30th Scientific Conference of Hellenic Association for Biological Sciences*, Thessaloniki, Greece.12-13.
- Albach D.C., Meudt H.M. ve Oxelman B., 2005. Piercing Together the “new” Plantaginaceae. *Amer. J. Bot.*, 92:297–315.
- Al-Rajhy D.H., Alahmed A.M., Hussein H.I. ve Kheir S.M., 2003. Acaricidal Effects of Cardiac Glycosides, Azadirachtin and Neem Oil Against the Camel Tick, *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae). *Pest Manage Sci.*, 59:1250–1254.
- Altamura M.M., Monacelli B. ve Pasqua, G., 1989. The Effect of Photoperiod on Flower Formation *in vitro* in a Quantitative Short-day Cultivar of *Nicotiana tabacum*. *Physiol. Plant*, 76:233-239.
- Anonim., 2007. *Ulusal Biyolojik Çeşitlilik Stratejisi ve Eylem Planı*. www.milliparklar.gov.tr/dkmp/oldversion/bolumler/.../UBSEP.pdf.
- Anonim., 2011. *Kazdağı Milli Parkı*. http://balikesir.ormansu.gov.tr/Balikesir/AnaSayfa/ka/ka_mp_kd.aspx?sflang=tr.
- Anonim., 2011. *Kazdağı Milli Parkı*. <http://www.kazdaglari.com/yeri/yeri.html>
- Anonim., 2011. *Kazdağı Milli Parkı*. <http://www.milliparklar.gov.tr/DKMP/mp/kazdagi/index.htm>.
- Anonim., 2011. *Milli Parkın Genel Özellikleri*. <http://www.kazdagimilliparki.com/ulaim-ve-oezellkler.html>.
- Babaoğlu M., Yorgancılar M. ve Akbulak A.M., 2001. Doku Kültürü: Temel Laboratuar Teknikleri. In: Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S., Eds. *Bitki Biyoteknolojisi: Doku Kültürü ve Uygulamaları*. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.1-35.
- Balkaya A. ve Yanmaz R., 2001. Bitki Genetik Kaynaklarının Muhafaza İmkanları ve Tohum Gen Bankalarının Çalışma Sistemleri. *Çevre ve Ekoloji Dergisi*, 10(19):25-30.
- Bauer P., Munkert J., Brydziun M., Burda E., Müller-Uri F., Gröger H., Müller Y.A. ve Kreis W., 2010. Highly Conserved Progesterone 5 β -reductase Genes (*P5 β R*) from

- 5 β -cardenolide-free and 5 β -cardenolide-producing Angiosperms. *Phytochemistry*, 71: 1495–1505.
- Bayram Ö.T., 2010. Oğulotu (*Melissa officinalis* L.) Genotiplerinin Doku kültürüne Yanıtlarının Belirlenmesi. (Yükseklisans Tezi). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye.
- Braga F.C., Kreis W., Recio R.A. ve Braga de Oliveira A., 1997. Variation of Cardenolides with Growth in a *Digitalis lanata* Brailian Cultivar. *Phytochemistry*, 45 (3): 473-476.
- Bramwell D., 1990. The Role of *in vitro* Cultivation in the Conservation of Endangered species. In: Hernandez Bermejo, J.E., Clement, M. ve Et Heywood, V., Eds. *Conservation Techniques in Botanic Gardens*. Koeltz Scientific Books Koenigstein, Germany. 27-32.
- Bräuchler C., Meinberg H. ve Heubl G., 2004. Molecular Phylogeny of the Genera *Digitalis* L. and *Isoplexis* (Lindley) Loudon (Veronicaceae) Based on ITS- and *trnL-F* Sequences. *Plant Systematics and Evolution*, 248: 111-128.
- Cacho M., Moran M., Herrera M.T., Fernandez-Tarrago J. ve Corchete M.P., 1991. Morphogenesis in Leaf, Hypocotyls and Root Explants of *Digitalis thapsi* L. Cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25:117-123.
- Chaturvedi H.C., Jain M. ve Kidwai N.R., 2007. Cloning of Medicinal Plants Through Tissue Culture-A Review. *Indian J. Exp. Biol.*, 45(11):937-948.
- Christianson M.L. ve Warnick D.A., 1983. Competence and Determination in the Process of *in vitro* Shoot Organogenesis. *Dev. Biol.*, 95: 288–293.
- Christianson M.L. ve Warnick D.A., 1984. Phenocritical Times in the Process of *in vitro* Shoot Organogenesis. *Developmental Biology*, 101:382-390.
- Christianson M.L. ve Warnick D.A., 1985. Temporal Requirement for Phytohormone Balance in the Control of Organogenesis *in vitro*. *Developmental Biology.*, 112: 494-497.
- Clemente E.S., Müller-Uri F., Nebauer S.G., Segura J., Kreis W. ve Arrillaga I., 2011. *Digitalis*, Chapter 5, In: Kole C (ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Plantation and Ornamental Crops*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 73-112.

- Cousson A. ve Tran Thanh Van K., 1981. *In vitro* Control of *de novo* Flower Differentiation from Tobacco Thin Cell Layers Cultured on a Liquid Medium. *Plant Physiol.*, 51:77-84.
- Çördük N. ve Akı C., 2010. Direct Shoot Organogenesis of *Digitalis trojana* Ivan. an Endemic Medicinal Herb of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 9(11):1587-1591.
- Çördük N. ve Akı C., 2011. Inhibition of Browning Problem During Micropropagation of *Sideritis trojana* Bornm., an Endemic Medicinal Herb of Turkey. *Romanian Biotechnological Letters*. 16(6): 6760-6765.
- D'onofrio C. ve Morini S., 2006. Somatic Embryo, Adventitious Root and Shoot Regeneration in *in vitro* Grown Quince Leaves as Influenced by Treatments of Different Length with Growth Regulators. *Scientia Horticulturae*, 107:194-199.
- Davis P.H., 1972. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.6, Edinburg University Press, Edinburg, 680-687.
- Dec G.W., 2003. Digoksin Remains Useful in the Management of Chronic Heart Failure. *Med. Clin. North Am.*, 87(2):317-337.
- Dirmenci T., Satıl F. ve Tümen G., 2007. *Kazdağı Milli Parkı Çiçekli Bitkileri*. Zeytinli Belediyesi, Balıkesir. 182-185.
- Eisenbeiß M., Kreis W. ve Reinhard E., 1999. Cardenolide Biosynthesis in Light- and Dark-Grown *Digitalis lanata* Shoot Cultures. *Plant Physio. Biochem.*, 37(1): 13-23.
- Eken G., Bozdoğan M., İsfendiyaroğlu S., Kılıç D.T. ve Lise Y., 2006. Marmara Bölgesi. *Türkiye'nin Önemli Doğa Alanları*. Doğa Derneği, Ankara.100-103.
- Ekim T., Koyuncu M., Vural M., Duman H., Aytaç Z. ve Adıgüzel N., 2000. *Red Data Book of Turkish Plants (Pteridophyta and Spermatophyta)*. Foundation for Turkish Nature Conservation and Van Centinential University Press, Ankara.
- Emeklier Y., 2001. Germplasm Muhafazası. In: Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S., Eds. *Bitki Biyoteknolojisi: Doku Kültürü ve Uygulamaları*. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya. 282-323.

- Engelmann F. ve Engels J.M.M., 2001. Technologies and Strategies for *ex situ* Conservation. In: Engels, J.M.M., Ramanatha, R., Brown, A.H.D. ve Jackson M.T., Eds. *Managing Plant Genetic Diversity*. CABI Publishing, 91-92.
- Farr C.D., Burd C., Tabet M.R., Wang X., Welsh W.J. ve Ball W.J., 2002. Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Study of the Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase by Cardiotonic Steroids Using Comparative Molecular Field Analysis. *Biochemistry*, 41:1137-1148.
- Finsterbusch A., Lindemann P., Grimm R., Eckerskorn C. ve Luckner M., 1999. D5-3 β -hydroxysteroid Dehydrogenase from *Digitalis lanata* Ehrh. – A Multifunctional Enzyme in Steroid Metabolism. *Planta*, 209: 479–486.
- Framm J.J., Peterson A., Thoeringer C., Pangert A., Hornung E., Feussner I., Luckner M. ve Lindemann P., 2000. Cloning and Functional Expression in *Escherichia coli* of a cDNA Encoding Cardenolide 16'-O-glucohydrolase from *Digitalis lanata* Ehrh. *Plant Cell. Physiol.*, 41:1293–1298.
- Gamborg O.L. ve Eveleigh D.E., 1968. Culture Methods and Detection of Glucanases in Suspension Cultures of Wheat and Barley. *Canadian Journal of Biochemistry*, 46: 417-421.
- Gärtner D.E. ve Seitz H.U., 1993. Enzyme Activities in Cardenolide-accumulating, Mixotrophic Shoot Cultures of *Digitalis purpurea* L. *J. Plant. Physiol.*, 141: 269–275.
- Gärtner D.E., Keilholz W. ve Seitz H.U., 1994. Purification, Characterization and Partial Peptide Microsequencing of Progesterone 5 β -reductase from Shoot Cultures of *Digitalis purpurea*. *Eur. J. Biochem.*, 225: 1125–1132.
- Gavidia I. ve Pérez-Bermúdez P., 1997. Cardenolides of *Digitalis obscura*: The Effect of Phosphate and Manganese on Growth and Productivity of Shoot-tip Cultures. *Phytochemistry*, 45(1): 81-85.
- Gavidia I. ve Pérez-Bermúdez P., 1997. *Digitalis obscura* Cardenolides Effect of Macronutrient Concentration and N Source on Growth and Productivity of Shoot-Tip Cultures. *Phytochemistry*, 46 (2) : 273-238.

- Gavidia I., Pérez-Bermúdez P. ve Seitz U., 2002. Cloning and Expression of Two Novel Aldo-keto Reductases from *Digitalis purpurea* Leaves. *Eur. J. Biochem.*, 269:2842–2850.
- Gavidia I., Seitz H.U. Pérez-Bermúdez P. ve Vogler B., 2002. LC-NMR Applied to the Characterisation of Cardiac Glycosides from Three Micropropagated *Isoplexis* Species. *Phytochem. Anal.*, 13: 266–271.
- Gavidia I., Tarrío R., Rodríguez-Trelles F., Pérez-Bermúdez P. ve Seitz H.U., 2007. Plant Progesterone 5 β -reductase is not Homologous to the Animal Enzyme. Molecular Evolutionary Characterization of P5 β R from *Digitalis purpurea*. *Phytochemistry*, 68:853–864.
- Gavidia, I., Del Castillo Agudo, L. ve Pérez-Bermúdez, P., 1996. Selection and Long-term Cultures of High-yielding *Digitalis obscura* Plants: RAPD Markers for Analysis of Genetic Stability. *Plant Sci.*, 121:197–205.
- George E.F., Hall M.A. ve Klerk G.D., 2007. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd. Edition. Springer, 30-43.
- Ghanem S.A., Aboul-Enein A.M., El-Sawy A., Rady M.R. ve Ibrahim M.M., 2010. *In Vitro* Propagation and Cardiac Glycosides Content. *International Journal of Academic Research*, 2(6)Part II: 348-355.
- Gül A., Doğan B., Özel N., Akkaş M.E. ve Acar İ., 2006. Kazdağları' nda Gen Koruma ve Yönetim Alanlarının (GEKYA) Belirlenmesi, *Ege Ormanlık Araştırma Müdürlüğü Dergisi*, İzmir. 42(1): 48-77.
- Gürel E. ve Türker A.U. 2001 Organogenesis. In: Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S., Eds. *Bitki Biyoteknolojisi: Doku Kültürü ve Uygulamaları*. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya. 36-70.
- Gürel E., Sökmen A., Sökmen M., Eker İ. ve Yücesan B. 2010. Türkiye'nin Endemik *Digitalis* (Scrophulariaceae) Türlerinin *In Vitro* Çoğaltımı ve Kalp Glikozitlerinin Üretilmesi.106O470 TÜBİTAK Projesi.
- Gürel E., Yücesan B., Aglic E., Gürel S., Verma S.K., Sökmen M. ve Sökmen A., 2011. Regeneration and Cardiotonic Glycoside Production in *Digitalis davisiana* Heywood (Alanya Foxglove). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 104:217–225.

- Haux J., 1999. Digitoksin is a Potential Anticancer Agent for Several Types of Cancer. *Med Hypotheses.*, 53(6):543-548.
- Herl V., Albach D.C., Müller-Uri F., Heubl G. ve Kreis W., 2008. Using Progesteron 5 β -reductase, a Gene Encoding a Key Enzyme in the Cardenolide Biosynthesis, to Infer the Phylogeny of the Genus *Digitalis*. *Pl. Syst Evol.*, 271:65-78.
- Herl V., Fischer G., Müller-Uri F. ve Kreis W., 2006. Molecular Cloning and Heterologous Expression of Progesterone 5 β -reductase from *Digitalis lanata* Ehrh. *Phytochemistry*, 67: 225–231.
- Herrera M.T., Cacho M., Corchete P. ve Fernandez-Tarrago J., 1990. One Step Shoot Multiplication and Rooting of *Digitalis thapsi* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 22:179-182.
- Hoelz H., Kreis W., Haug B. ve Reinhard E., 1992. Storage of Cardiac Glycosides in Vacuoles of *Digitalis lanata* Mesophyll Cells. *Phytochemistry*, 31(4): 1167-1171.
- Huq M.M., Jabbar A., Rashid M.A. ve Hasan C.M., 1999. A Novel Antibacterial and Cardiac Steroid from the Roots of *Nerium oleander*. *Fitoterapia*, 70:5–9.
- Kandzia R., Grimm R., Eckerskorn C., Lindemann P. ve Luckner M., 1998. Purification and Characterization of Lanatoside 15'-O-acetylerase from *Digitalis lanata* Ehrh. *Planta*. 204:383–389.
- Khanam N., Khoo C. ve Khan A.G., 2000. Effects of Cytokinin/Auxin Combination on Organogenesis Shoot Regeneration and Tropane Alkaloid Production in *Duboisia myoporoides*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 62:125–133.
- Klavina D., Gailite A., Smite D., Gavrilova G., Nechaeva J., Jakobsone G ve Ievinsh G., 1992. Tissue Culture as a Potential Method for Preserving of Various Threatened Plant Species of Latvia. National Botanic Garden, Miera Str, Kronvalda Blvd in *Vascular*. from http://www.nerium.net/plantaeuropa/Download/Proceedings/Klavina_e_al.pdf.
- Kreis W., Hensel A. ve Stuhlemmer U., 1998. Cardenolide Biosynthesis in Foxglove. *Planta Med.*, 64:491–499.
- Kuate S.P., Rodrigo M., Pádua R.M., Eisenbeiss W.F. ve Kreis W. 2008. Purification and Characterization of Malonyl-coenzyme A: 21-hydroxypregnane 21-O-

- malonyltransferase (Dp21MaT) from Leaves of *Digitalis purpurea* L. *Phytochemistry*, 69: 619–626.
- Langford S.D. ve Boor P.J., 1996. Oleander Toxicity: an Examination of Human and Animal Toxic Exposures. *Toxicology*, 109:1-13.
- Li X., 1981. Plantlet Regeneration from Mesophyll Protoplasts of *Digitalis lanata* Ehrh. *Theor. Appl. Genet.*, 60:345-347.
- Lindemann P. ve Luckner M., 1997. Biosynthesis of Pregnane Derivatives in Somatic Embryos of *Digitalis lanata*. *Phytochemistry*, 46:507-513.
- Lindemann P., Finsterbusch A., Pangert A. ve Luckner M., 2000. Partial Cloning of a Δ^5 - 3β -Hydroxysteroid Dehydrogenase from *Digitalis lanata*. In: Okamoto, M., Ishimura, Y., Nawata, H. Eds. *Molecular Steroidogenesis, Proceedings of the Yamada Conference LII*. Frontiers Science Series 29, vol. XXIV. Universal Academy Press, Tokyo, Japan, 333–334.
- Mansuroğlu S. ve Gürel E., 2002. Mikroçoğaltım. In: Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S., Eds. *Bitki Biyoteknolojisi: Doku Kültürü ve Uygulamaları*. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya. 262-278.
- Mijatovic T., Op De Beeck A., Van Quaquebeke E., Dewelle J., Darro F., de Launoit Y. ve Kiss R., 2006. The Cardenolide UNBS1450 is Able to Deactivate Nuclear Factor Kappa B-Mediated Cytoprotective Effects in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Mol Cancer Ther.*, 5:391–399.
- Mijatovic T., Quaquebeke E.V., Delest B., Debeir O., Darro F. ve Kiss R., 2007. Cardiotonic Steroids on the Road to Anti-Cancer Therapy. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1776 (1):32-57.
- Mikulík J., 1999. Propagation Of Endangered Plant Species By Tissue Cultures. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultas Rerum Naturalium Biologica*, 37: 27-33.
- Monacelli, B., Pasqua, G., Altamura, M.M. ve Mazzolani, G., 1983. *In vitro* Neoformation of Floral and Vegetative Buds in *Nicotiana tabacum* L., *Ann. Bot.*, 41:157-163.
- Murashige T. ve Skoog F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.

- Nebauer S.G., Del Castillo Agudo L. ve Segura J., 1999. Cardenolide Variation within and Among Natural Populations of *Digitalis obscura*. *J. Plant Physiol.*, 154: 426–430.
- Olmstead R.G., De Pamphilis C.W., Wolfe A.D., Young N.D., Elisons W.J. ve Reeves P.D. 2001. Disintegration of the *Scrophulariaceae*. *Amer. J. Bot.*, 88: 348–361.
- Oxelmann B, Kornhall P, Olmsted R.G. ve Bremer B., 2005. Further Disintegration of Scrophulariaceae. *Taxon.*, 54(2): 411–425.
- Özel, N. ve Gemici Y., 2001. Flora and Vegetation of Kazdağları. *1.Ulusal Kazdağları Sempozyumu*, Edremit, Balıkesir. 26-39.
- Özkaynak E. ve Samancı B., 2003. *Mikroçoğaltımda Çevresel Kontrol Faktörleri*. from <http://www.batem.gov.tr/yayinlar/derim/2003/07-18.pdf>.
- Padua R., Waibel R., Kuate S.P. Schebitz P. K. Hahn S., Gmeiner P. ve Kreis W., 2008. A Simple Chemical Method for Synthesizing Malonyl Hemiesters of 21 hydroxypregnanes, Potential Intermediates in Cardenolide Biosynthesis. *Steroids*, 73:458-465.
- Panis B. ve Lambardi M., 2005. Status of Cryopreservation Technologies in Plants. The Role of Biotechnology, Villa Gualino, Turin, Italy. 43-54.
- Paunescu A., 2009. Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(1): 4095-4103.
- Pérez-Alonso N., Capote A., Gerth A. ve Jiménez E., 2012. Increased Cardenolides Production by Elicitation of *Digitalis lanata* Shoots Cultured in Temporary Immersion Systems. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 110(1):153-162.
- Pérez-Alonso N., Wilken D., Gerth A., Jähn A., Nitzsche H. Kerns G., Capote-Perez A. ve Jiménez E., 2009. Cardiotonic Glycosides from Biomass of *Digitalis purpurea* L. Cultured in Temporary Immersion Systems. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 99:151–156.
- Pérez-Bermúdez P., García A.A.M., Tuñón I. ve Gavidia I., 2010. *Digitalis purpurea* *P5βR2*, Encoding Steroid 5β-reductase, is a Novel Defense-related Gene Involved in Cardenolide Biosynthesis. *New Phytologist.*, 185:687-700.
- Pervaiz M.H., Dickinson M.G. ve Yamani M. 2006. Is Digoksin A Drug Of The Past?. *Cleveland Clinic Journal Of Medicine*, 73(9):821-834.

- Rastogi S., Kulshreshtha D.K. ve Rawat A.K.S., 2006. *Streblus asper* Lour (Shakhotaka): A Review of Its Chemical. *Pharmacological and Ethnomedicinal Properties. Ecam.*, 3:217–222.
- Roca-Perez L., Boluda R., Gavida I. ve Perez-Bermudez P., 2004. Seasonal Cardenolide Production and *Dop5 β r* Gene Expression in Natural Populations of *Digitalis obscura*. *Phytochemistry*, 65:1869-1878.
- Rothe K., Diettrich B., Rahfeld B. ve Luckner M., 1999. Uptake of Phloem-specific Cardenolides by *Cuscuta sp.* Growing on *Digitalis lanata* and *Digitalis purpurea*. *Phytochemistry*, 51: 357-361.
- Rout G.R., Samantaray S. ve Das P., 2000. *In vitro* Manipulation and Propagation of Medicinal Plants. *Biotechnology Advances*, 18:91-120.
- Sales E., Nebauer S.G., Arrillaga I. ve Segura J., 2002. Plant Hormones and *Agrobacterium tumefaciens* strain 82.139 Induce Efficient Plant Regeneration in the Cardenolide-Producing Plant *Digitalis minor*. *J. Plant Physiol.*, 159:9–16.
- Satıl F., 2009. Threatening Factors on Plant Diversity of Kazdağı (Ida Mountain) National Park in Turkey and Suggestions for Conservation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23(2):208-211.
- Schöninger R., Lindemann P., Grimm R., Eckerskorn C. ve Luckner M., 1998. Cardenolide 16'-*O*-glucohydrolase from *Digitalis lanata*. Purification and characterization. *Planta*, 205:477-482.
- Seçmen Ö., Gemici Y., Görk G., Bekat L. ve Lelebici E., 1970. *Tohumlu Bitkiler Sistematigi*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 116. Bornova, İzmir.
- Sugiyama M., 1999. Organogenesis *In Vitro*. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2:61–64.
- Taiz L. ve Zeiger E., 2007. Sekonder Metabolitler ve Bitkisel Savunma. In: Türkan, İ., Ed. *Bitki Fizyolojisi* (3.Baskı), Palme Yayıncılık, Ankara, 283-306.
- Tanker M., Tarhan, O., Terem B., İlisulu F., Doğan M., Kurucu S. ve Sakar K. 1985. Türkiye'de Yetişen *Digitalis* Türlerinin Kalbe Etkili Glikozitlerinin (Heterozitlerinin) Teknik Ölçüde Elde Edilmesi İmkanlarının ve Maliyet Unsurlarının Saptanması., (TÜBİTAK TAG Proje No.G-503), Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.

- Tanker N., Koyuncu M. ve Coşkun M., 2007. *Farmasötik Botanik*. (3.Baskı). Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları., Ankara. 93:308-310.
- Theurer C., Treumann H., Faust T., May U. ve Kreis W., 1994. Glycosylation in Cardenolide Biosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38 (2-3): 327-335.
- Tran Thanh Van K., Toubart P., Cousson A., Darvill A.J., Gollin D.G., Chelf P. ve Albersheim P., 1985. Manipulation of the Morphogenetic Pathways of Tobacco Explants by Oligosaccharins. *Nature*, 314: 615-617.
- Tran Thanh Van M., 1974. Methods of Acceleration of Growth and Flowering in a Few Species of Orchids. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, 43:699- 707.
- Türkmen O.S., 2009. Kazdağı'nda Yetişen Oğulotu, Adaçayı ve Kekik Türlerinin Doku Kültürü Yöntemiyle Muhafazası ve Çoğaltılması (Yüksekisans Tezi). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye.
- Uysal İ. ve Öztürk M., 1991. *Digitalis trojana* Ivan. Endemik türünün Morfolojisi, Anatomisi ve Ekolojisi. *Anadolu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Dergisi*, 3(1):53-61.
- Uysal İ., 2010. An Overview of Plant Diversity of Kazdagi (Mt.Ida) Forest National Park, Turkey. *Journal of Environmental Biology*, 31:141-147.
- Velioğlu E., Çengel B., Çiçek F.F. ve Kaya Z., 1999. Kazdağlarında Doğal Kazdağı Göknarı (*Abies equi-trojani* Aschers. et. Sint.) Populasyonlarında Genetik Çeşitliliğin Yapılanması, from <http://www.ortohum.gov.tr/Tbulten.htm>.1999.
- Verma S. K., Yücesan B.B., Gürel S. ve Gürel E., 2011. Indirect Somatic Embryogenesis and Shoot Organogenesis from Cotyledonary Leaf segments of *Digitalis lamarckii* Ivan., an Endemic Medicinal Species. *Turk. J. Biol.*, 35:743-750.
- Verma S.K., Şahin G., Yücesan B., Eker İ., Sahbaz N., Gürel S. ve Gürel E. 2012. Direct Somatic Embryogenesis from Hypocotyl Segments of *Digitalis trojana* Ivan. and Subsequent Plant Regeneration. *Industrial Crops and Products*, 40:76– 80.
- Wasserstrom A.J. ve Aistrup L.G., 2005. Digitalis: New Actions for an Old Drug. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 289:1781– 1793.

- Wiebe J.P., Lewis M.J., Cialacu V., Pawlak K.J. ve Zhang G., 2005. The Role of Progesterone Metabolites in Breast Cancer: Potential for New Diagnostics and Therapeutics. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 93:201–208.
- Wiegrebe H. ve Wichtl M., 1993. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Cardenolides in *Digitalis* Leaves After Solidphase Extraction. *J. Chromatogr.*, 630:402-407.
- Yamaguchi M., Kato H., Yoshida S., Yamamura S., Uchimiya H. ve Umeda M., 2003. Control of *in vitro* Organogenesis by Cyclin-Dependent Kinase Activities in Plants. *PNAS.*, 100(13): 8019–8023.

EKLER

EK 1:

Çalışmada Kullanılan Besin Ortamlarının bileşenleri ve miktarları (mg/l) (Babaoğlu ve ark., 2001)

	MS	B5
	miktar (mg/l)	
KNO ₃	1900	2500
NH ₄ NO ₃	1650	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	250
CaCl ₂ .2.H ₂ O	440	150
KH ₂ PO ₄	170	-
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	-	150
MnSO ₄ .4H ₂ O	-	10
KI	0.83	0.75
H ₃ BO ₃	6.2	3.0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	2.0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8
Na ₂ EDTA	37.3	37.3
Nikotinik asit	0.5	1.0
Pridoksin-HCl	0.5	1.0
Thiamin-HCl	0,1	10.0
Myo-inositol	100	100
Glisin	2.0	-

EK2 :**Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması:**

Kullanılacak bitki büyüme düzenleyicilerinin stok solüsyonları 1 mg / ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

6-Benzilaminopürin (Sigma-B3408), kinetin (Sigma K0753) ve α -naftalenasetik asit (Sigma-N0640) 1 N NaOH içerisinde ısı ile çözdürülmüştür. Daha sonra son hacimleri dH₂O ile tamamlanmıştır. 2,4-D (Sigma D7299) ise dH₂O içerisinde çözdürülmüştür.

Hazırlanan bitki büyüme düzenleyicilerinin stok solüsyonları amber renkli şişeler içerisinde +4°C'de saklanmıştır. Kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ısı ile bozunmadığından dolayı besin ortamlarına otoklavlamadan önce ilave edilmiştir.

EK 3:**%0,1'lik DEPC Hazırlanması:**

RNA izolasyonu için kullanılmak üzere %0.1'lik DEPC solüsyonu hazırlanmıştır. 1 ml DEPC (Sigma-D5758) üzerine dH₂O ilave edilip son hacim 1 litreye tamamlanmış ve karıştırılmıştır. Solüsyon 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde solüsyon 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır.

ÇİZELGELER

Sayfa No

Çizelge 1. Yaprak ve kök eksplantlarının kültüre alındığı MS besin ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyon ve kombinasyonları	28
Çizelge 2. cDNA reaksiyon bileşenleri ve miktarları	31
Çizelge 3. PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.....	32
Çizelge 4. PCR reaksiyonunda kullanılan primerler ve baz dizilişleri.....	33
Çizelge 5. <i>P5βR</i> ve <i>Act2</i> için optimize edilen PCR koşulları	33
Çizelge 6. Doğal ortamda yayılış gösteren <i>D. trojana</i> bitkilerinin toplandığı lokalitelerin yükseklik ve koordinatları	38
Çizelge 7. Farklı ortamlarda kültüre alınan yaprak eksplantından gelişen sürgün sayısı.....	48
Çizelge 8. Kardenolit standartlarına ait bilgiler.	68
Çizelge 9. Mayıs ayında toplanan bitki örneklerine ait HPLC sonuçları.....	69
Çizelge 10. Temmuz Ayında Toplanan bitki örneklerine ait HPLC sonuçları.....	70
Çizelge 11. 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP ortamında üretilen 12 haftalık bitkilerin kardenolid içerikleri.....	72

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 1. Kazdağları haritası. (Özgün)	2
Şekil 2. <i>Digitalis trojana</i> Ivan. vejetasyon dönemi, Mayıs 2011 (a), çiçeklenme dönemi (b), tohum dönemi (c,d). (Temmuz 2011)	8
Şekil 3. Kardiyoaktif glikozitlerin kimyasal formülü (Newman ve ark., 2008) ve <i>Digitalis</i> kardenolit serileri (Kreis ve ark., 1998).	9
Şekil 4. Kolesterolen başlayarak kardenolit biyosentezinin yolu (Finsterbusch ve ark., 1999).	10
Şekil 5. Sürgün rejenerasyon ortamlarına kültür başlangıç aşamasında aktarılan yaprak eksplantları.	27
Şekil 6. Kullanılan GeneRuler™ 100bp Plus (Fermentas, SM0321) DNA markırı (a) ve 100bp Plus (Invitrogen -15628-019) DNA markırı (b).	30
Şekil 7. <i>Digitalis trojana</i> Ivan. bitki örneklerinin Kazdağı Milli parkı sınırları içerisinde toplandığı lokaliteler.....	37
Şekil 8. a) <i>in vitro</i> çimlendirilen, b) 5 haftalık, c) 10 haftalık <i>D.trojana</i> bitkisi, d) eksplant kaynağı olarak kullanılan 20 haftalık <i>D.trojana</i> bitkisi.....	39
Şekil 9. 1 mg/l NAA ve 0,5 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre alınan kök eksplantı.....	40
Şekil 10. 0,1 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP ilave edilen MS ortamında kültüre alınan eksplantlardan gelişen kallus.	41
Şekil 11. 0,1 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre alınan kök eksplantlarından gelişen sürgün taslağı (kültürün 3. haftası).	41
Şekil 12. a) 0,1 mg/l 2,4 D, 0,1 mg/l K, b) 0,1 mg/l 2,4 D, 0,5 mg/l K, c) 0,1 mg/l 2,4 D, 3,0 mg/l K, d) 1,0 mg/l 2,4 D, 3,0 mg/l K, e) 0,1 mg/l 2,4 D, 3,0 mg/l K, f) 0,5 mg/l 2,4D, 5,0 mg/l K ilave edilen MS besin ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarında meydana gelen morfolojik farklılaşmalar.	43
Şekil 13. 0,5 mg/l NAA içeren ortamda kültüre alınan yaprak eksplantından gelişen kök.....	44
Şekil 14. 1 mg/l NAA, 0,1 mg/l BAP içeren ortamda kültüre alınan yaprak eksplantından gelişen kökler (kültürün 3.haftası).....	44
Şekil 15. 0,1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP, 2 mg/l PVP, %0,7 agar içeren MS besin ortamında kültürün 4. haftasında yaprak eksplantlarından gelişen sürgünler.....	45

Şekil 16. 0,5 mg/l NAA, 3 mg/l BAP, 2 mg/l PVP, %0,7 agar içeren MS besin ortamında kültürün 4. haftasında yaprak eksplantlarından gelişen sürgünler.....	45
Şekil 17. 0,1 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP içeren MS besin ortamında gelişen sürgün primordiyumları.....	46
Şekil 18. 0,1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP, 2 mg/l PVP, %0,7 agar içeren MS besin ortamında kültürün 4. haftasında eksplantlarda gelişen sürgünler.....	47
Şekil 19. 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP içeren MS besin ortamda kültüre alınan yaprak eksplantından gelişen sürgünler (3. hafta).	49
Şekil 20. B5 besin ortamında alt kültüre alınan yaprak eksplantlarından gelişen ve sürgüne farklılaşmayan kallus.	50
Şekil 21. 1 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında oluşan sürgünlerin, bazal besin ortamında kültüre alınması ile çoğalan sürgünler.....	51
Şekil 22. 0,1 mg/l NAA ve 3,0 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında oluşan sürgünlerin, bazal besin ortamında kültüre alınması ile çoğalan sürgünler.....	51
Şekil 23. 0,1 mg/l NAA ve 3,0 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında oluşan ve gelişmeleri için MS bazal besin ortamına aktarılan sürgünler.....	52
Şekil 24. 1 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında oluşan ve gelişmeleri için MS bazal besin ortamına aktarılan sürgünler.....	53
Şekil 25. 0,1 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında oluşan ve gelişmeleri için MS bazal besin ortamına aktarılan sürgünler.....	54
Şekil 26. 1 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında oluşan ve gelişmeleri için MS bazal besin ortamına aktarılan sürgünler.....	54
Şekil 27. 0,1 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında oluşan <i>In vitro</i> geliştirilen ve köklendirilen 12 haftalık bitkiler.	55
Şekil 28. 1 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamında oluşan <i>in vitro</i> geliştirilen ve köklendirilen 12 haftalık bitkiler.	55
Şekil 29. 0,1 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP ilave edilen MS ortamında üretilen 17 haftalık bitkiler.....	56
Şekil 30. 1 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP ilave edilen MS ortamında üretilen 17 haftalık bitkiler.....	56
Şekil 31. İzole Edilen Total RNA'ların Elektroforezi.	59
Şekil 32. Progesteron 5 β - reduktaz geninin bir cDNA'sına ait baz dizilişi.....	60

Şekil 33. Progesteron 5 β -reduktaz geninin bir cDNA'sının BLASTN sonuçlarının grafik ile gösterimi.....	61
Şekil 34. Progesteron 5 β -reduktaz geninin bir cDNA'sının BLASTN sonuçlarının diğer türler ile karşılaştırılması.	61
Şekil 35. Progesteron 5 β - reduktaz geninin bir cDNA'sına ait muhtemel polipeptid dizisi.	62
Şekil 36. Progesteron 5 β -reduktaz geninin bir cDNA'sına ait muhtemel polipeptid dizisinin BLASTP sonuçları.....	62
Şekil 37. 836 m (1), 961 m (2), 1047 m (3), 1191 m (4) Mayıs ayında ve 836 m (5), 961 m (6), 1047 m (7), 1191 m'den (8) Temmuz ayında toplanan bitkilerdeki <i>P5βR</i> geninin ifadesi.	64
Şekil 38. 0,1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP ortamında üretilen 12 haftalık (1), 0,1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP ortamında üretilen 17 haftalık (2), 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP ortamında üretilen 12 haftalık (3), 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP ortamında üretilen 17 haftalık bitkilerdeki (4) <i>P5βR</i> geninin ifadesi.....	64
Şekil 39. 836 m (1), 961 m (2), 1047 m (3), 1191 m'den (4) Mayıs ayında toplanan bitkiler, 836 m (5), 961 m (6), 1047 m (7), 1191 m'den (8) Temmuz ayında toplanan bitkiler, 0,1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP ortamında üretilen 12 haftalık bitki (9), 0,1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP ortamında üretilen 17 haftalık bitki (10), 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP ortamında üretilen 12 haftalık bitki (11), 1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP ortamında üretilen 17 haftalık bitkideki (12) <i>Act2</i> geninin ifadesi.	65
Şekil 40. Mayıs ve Temmuz aylarında Kazdağlarından farklı yüksekliklerden toplanan bitkilerdeki <i>P5βR</i> geninin ifadesinin bağıl miktarı.....	66
Şekil 41. <i>In vitro</i> üretilen bitkilerdeki gen ifadesinin bağıl miktarı.	66
Şekil 42. Standartlara ait kromatogram.....	68
Şekil 43. Mayıs ayında toplanan bitkilere ait kardenolit içerikleri.	70
Şekil 44. Temmuz ayında toplanan bitkilere ait kardenolit içerikleri.....	71

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nurşen ÇÖRDÜK

Doğum Yeri : İzmir

Doğum Tarihi : 17.11.1980

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilimdalı.

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

1. Yayınlar -SCI –Diğer;

- Çördük N., Akı C. 2011. Inhibition of Browning Problem During Micropropagation of *Sideritis trojana* Bornm., an Endemic Medicinal Herb of Turkey. Romanian Biotechnological Letters. Vol:16, No:6. pp 6760-6765.
- Çördük N., Akı C. 2010. Direct Shoot Organogenesis of *Digitalis trojana* Ivan. an Endemic Medicinal Herb of Turkey. African Journal of Biotechnology. 9(11), pp. 1587-1591.

2. Bildiriler -Uluslararası –Ulusal;

- Çördük N, Akı C. 2012. Kazdağları Bitkisel Gen Kaynaklarının In Vitro Koruma Altına Alınması, Kazdağları 3. Ulusal Sempozyumu, Edremit, 24-26 Mayıs 2012
- Çördük N., Akı C. 2010.Conservation of Genetic Sources of *Digitalis trojana* Ivan. and *Sideritis trojana* Bornm.by *In Vitro* Culture. International Symposium on Biology of Rare and Endemic Plant Species BIORARE – May 26-29, Fethiye Muğla.
- Çördük N., Akı C.2008. In vitro Regeneration of *Nicotiana tabacum* L. cv.Samsun. Proceedings of the 30th Scientific Conference of Hellenic Association for Biological Sciences, 22-24.05.2008, Selanik-Yunanistan.

- Akı C., Çördük N.2008. Callogenesis of Kazdağı Endemic plant *Sideritis trojana*. Proceedings of the 30th Scientific Conference of Hellenic Association for Biological Sciences, 22-24.05.2008, Selanik-Yunanistan.
- Çördük N, Akı C. 2006.Çanakkale Kanyak Fabrikası Atık Suyunun *Vicia faba* L. Üzerine Genetiksel Etkisi ve Total Protein Değişimleri.18. Ulusal Biyoloji Kongresi, Aydın.26-30 Haziran, 2006.

3. Katıldığı Projeler

- *In vitro* Çoğaltılan ve Doğal Ortamda Yayılış Gösteren *Digitalis trojana* Ivan. Türünde Progesteron 5 β -reduktaz Gen İfadesinin ve Kardenolit Üretiminin Karşılaştırılması, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu (2010-212).
- Kazdağı Endemiği *Digitalis trojana* Ivan (Yüksük otu) Türünün Mikroçoğaltımı, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu. (2008-2009).
- Kazdağı Endemik Bitkilerinden *Sideritis trojana* Üzerinde *In vitro* Rejenerasyon Çalışmaları. TÜBİTAK.(2007-2008).

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

- Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005-2009
- Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2009- devam ediyor.

İLETİŞİM

E-posta Adresi : nursencorduk@comu.edu.tr

