

*IN VITRO* KOŞULLARDA *VALERIANA OFFICINALIS* L. BİTKİSİNİN FARKLI  
EKSPLANTLARINA BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN ETKİSİ

Elmas SÖNMEZ

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

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÇETİN

Ağustos - 2019

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Elmas SÖNMEZ tarafından hazırlanan "IN VITRO KOŞULLARDA VALERIANA OFFICINALIS L. BİTKİSİNİN FARKLI EKSPANTLARINA BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN ETKİSİ" adlı çalışması, aşağıda belirtilen jüri tarafından Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek OY BİRLİĞİ ile Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

26/08/2019

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

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

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

### Sınav Komitesi Üyeleri


Doç. Dr. Muharrem AKCAN  
Biyokimya Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi

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

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

.....  
  
.....

.....  
  
.....

.....  
  
.....

.....  
  
.....  
  
.....

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında Akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Kütahya Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığını ve benzerlik oranının % 23 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.

  
Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÇETİN

  
Elmas SONMEZ

## **IN VITRO KOŞULLARDA VALERIANA OFFICINALIS L. BİTKİSİNİN FARKLI EKSPANTLARINA BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN ETKİSİ**

Elmas SÖNMEZ

Biyoloji, Yüksek Lisans Tezi, 2019

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÇETİN

### **ÖZET**

*Valeriana officinalis* (Kediotu) çok eski çağlardan beri uykusuzluk, korku, gerginlik ve sinirlilik gibi durumların tedavisinde kullanılan önemli bir tıbbi bitkidir. Az sayıda tohum üretimi, düşük çimlenme oranı, varyasyonlar göstermesi, geleneksel yöntemler ile ıslahının maliyetli ve zaman alması nedenleri ile üretimi zordur. Bu nedenle üretiminde, bitki biyoteknoloji tekniklerinden olan bitki doku kültürü yöntemlerinin araştırılması önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında, *V. officinalis* bitkisinin ve metabolitlerinin bitki doku kültürü yöntemleri ile üretimi amaçlanmıştır. *In vitro* koşullarda çimlendirilen bitkinin yaprak, yaprak sapı ve kotiledon eksplantları 8 farklı konsantrasyon ve kombinasyonda Benzil amino purin (BAP) ve Naftalen asetik asit (NAA) bitki büyüme düzenleyicileri içeren Murashige ve Skoog (MS) besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Elde edilen kök ve kalluslardaki metabolitlerin belirlenmesinde LC-MS yöntemi kullanılmıştır.

Yapılan uygulamalar sonucunda en iyi kök oluşumları yaprak eksplantlarında 10 farklı konsantrasyon ve kombinasyon içeren MS besin ortamında, en iyi kallus oluşumları 2 mg/L BAP+2 mg/L BAP ve 2 mg/L BAP+1,5 mg/L NAA içeren ortamlarda olduğu belirlenmiştir. Bunların yanı sıra 1 mg/L BAP ve 2 mg/L BAP içeren besin ortamlarında herhangi bir kök oluşumu gözlenmemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Benzil amino purin, Bitki büyüme düzenleyicileri, *In vitro*, Kotiledon, Murashige ve Skoog (MS), Naftalen asetik asit, Oksin, Sitokin, Yaprak, Yaprak sapı, *Valeriana officinalis* L.

**EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS ON DIFFERENT EXPLANTS OF  
VALERIANA OFFICINALIS L. IN IN VITRO CONDITIONS**

Elmas SÖNMEZ

Biology, M. S. Thesis, 2019

Thesis Supervisor: Assist. Prof. Burcu ÇETİN

**SUMMARY**

*Valeriana officinalis* (Valeriana) is an important medicinal plant used as a form of therapy in insomnia, fear, tension and nervousness since ancient times. It is difficult to produce this plant at large quantities due to the small number of seed generation, low germination rate, variations, traditional methods and the cost and time of breeding. Plant tissue culture technique, one of the plant biotechnology techniques, is an alternative way of producing medicinal plants.

In our thesis, we aimed to produce *V. officinalis* plant and its metabolites by plant tissue culture method. The leaves, petioles and cotyledon explants of the germinated plant, in *in vitro* conditions, were cultured in Murashige and Skoog (MS) nutrient media containing 8 different concentrations and combinations of Benzylaminopurine (BAP) and Naphthalene acetic acid (NAA) plant growth regulators. Metabolites in the roots and calluses were determined by LC-MS method.

As a result of the applications, the best root formations in the leaf and leaf extract explants were observed in MS food medium in 10 different concentrations and combinations and best callus formations were observed in 2 mg/L BAP+2 mg/L BAP ve 2 mg/L BAP+1,5 mg/L NAA containing MS culture medium. In addition, no root formation was observed in nutrient media containing 1 mg/L BAP and 2 mg/L BAP.

**Keywords:** Auxin, Benzylaminopurin, Cotyledon, Cytokinin, *In vitro*, Leaf, Murashige ve Skoog (MS), Naphthaleneacetic Acid, Petiol, Plant growth regulators (PGRs), *Valeriana officinalis* L.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde hiçbir zaman desteğini esirgemeyen pes ettiğim günlerde beni tekrar motive eden bir danışmandan çok arkadaş gibi yaklaşan sevgili hocam, Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÇETİN'e, aynı zamanda çalışmalarına destek olan sayın Doç. Dr. Muharrem AKCAN'a ve Arş. Gör. Dr. Ayhan YILMAZ'a, *Valeriana officinalis* L. tohumlarını temin eden Kütahya Belediyesi Hekim Sinan Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi sorumlusu Fatih ÇAYIR'a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Uzakta olsalar da daima yanımda hissettiğim aileme ve ailemden ayrı tutmadığım KUTLUĞ ailesine, ayrıca bana her konuda destek olduğu gibi bu çalışmada da gösterdiği büyük destekten dolayı Tasvir KUTLUĞ'a teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	v
SUMMARY .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. <i>V. officinalis</i> 'in Bilimsel Sınıflandırması .....	3
2.2. Morfolojik Özellikleri .....	4
2.3. Yetiştirme Koşulları .....	4
2.4. Kimyasal Kompozisyonu .....	5
2.5. Geleneksel Kullanımı .....	5
2.6. Farmakolojik Aktiviteleri .....	6
2.7. Tıbbi Kullanım Alanları .....	6
2.8. Bitki Doku Kültürleri .....	6
2.9. Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Sınıflandırılması .....	7
2.9.1. Oksinler .....	7
2.9.2. Sitokininler .....	8
2.10. Besin Ortamları .....	8
2.11. Çevresel Faktörler .....	11
2.12. Kök Kültürü .....	11
2.12.1. Kök kültürünün uygulama alanları .....	12
2.13. Literatür Araştırması .....	12
3. MATERYAL VE METOD .....	16
3.1. Besin Ortamı .....	16
3.2. Stok Solüsyonlarının Hazırlanması ve Muhafazası .....	16
3.3. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması ve Muhafazası .....	17
3.4. Besin Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu .....	18

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<b><u>Sayfa</u></b>
3.4.1. MS besin ortamlarının hazırlanması (1 L için) .....	18
3.4.2. Besin ortamının ve kullanılan malzemelerin sterilizasyonu .....	18
3.5. Aseptik Koşulların Sağlanması ve Sürdürülmesi .....	18
3.6. Kültür Metodu .....	19
3.6.1. Eksplant kaynakları .....	19
3.6.2. Tohumların hazırlanması ve sterilizasyonu .....	19
3.7. İklimlendirme Koşulları .....	19
3.8. Bitki Büyüme Düzenleyicilerin <i>V.officinalis</i> Bitkisinin Eksplantlarına Etkisi .....	19
3.8. LC-MS Analizleri .....	20
4. BULGULAR .....	21
4.1. <i>V. officinalis</i> L. Tohumlarının Çimlendirilmesi .....	21
4.2. Eksplantlara Uygulanan Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Etkileri .....	21
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	35
ÖZGEÇMİŞ	



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>V. officinalis</i> L. bitkisinin resmi .....	3
2.2. <i>V. officinalis</i> çiçeği genel görünümü .....	4
3.1. <i>V. officinalis</i> tohumları .....	16
4.1. <i>In vitro</i> çimlendirilmiş <i>V. officinalis</i> L. tohumlarından elde edilen 3 haftalık bitkicikler.	21
4.2. Kültür işleminin 3. Haftasında Eksplantlarda oluşan kökler a.Yaprak sapı b.Yaprak c.Kotiledon .....	22
4.3. 1 mg/L BAP+0,5 mg/L NAA içeren MS ortamları eksplantların gelişimleri a. Yaprak b.Yaprak Sapı c. Kotiledon .....	22
4.4. 1 mg/L BAP+1 mg/L NAA içeren MS ortamları eksplantların gelişimleri a. Yaprak b. Yaprak Sapı c. Kotiledon .....	22
4.5. 1 mg/L BAP+1,5 mg/L NAA içeren MS ortamları eksplantların gelişimleri a. Yaprak b. Yaprak Sapı c. Kotiledon .....	23
4.6. 1 mg/L BAP+2 mg/L NAA içeren MS ortamları eksplantların gelişimleri a. Yaprak b. Yaprak Sapı c. Kotiledon .....	23
4.7. 2 mg/L BAP+0,5 mg/L NAA içeren MS ortamları eksplantların gelişimleri a.Yaprak b. Yaprak Sapı c. Kotiledon .....	23
4.8. 2 mg/L BAP+1 mg/L NAA içeren MS ortamları eksplantların gelişimleri a.Yaprak b. Yaprak Sapı c. Kotiledon .....	24
4.9. 2 mg/L BAP+1,5 mg/L NAA içeren MS ortamları eksplantların gelişimleri a. Yaprak b. Yaprak Sapı c. Kotiledon .....	24
4.10. 2 mg/L BAP+2 mg/L NAA içeren MS ortamları eksplantların gelişimleri a. Yaprak b. Yaprak Sapı c. Kotiledon .....	24
4.11. a. 1 mg/L BAP+2 mg/L NAA b. 2 mg/L BAP+0,5 mg/L NAA c. 2 mg/L BAP+1,5 mg/L NAA d. 2 mg/L BAP+2 mg/L NAA ait toplam iyon kromatogramaları (TIC) .....	26
4.12. 1 mg/L BAP+2 mg/L NAA ait kütle dataları .....	26
4.13. 2 mg/L BAP+0,5 mg/L NAA ait kütle dataları .....	29
4.14. 2 mg/L BAP+1,5 mg/L NAA ait kütle dataları .....	29
4.15. 2 mg/L BAP+2 mg/L NAA ait kütle dataları .....	32

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Çizelge

### Sayfa

2.1. Doku Kültürü besin ortamlarında en çok kullanılan reçeteler ve kullanılan bileşikler .	9
3.1. MS stok solüsyonları içeriği (gr/100 ml) .....	17
3.2. Kültür ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicileri .....	18
3.3. Eksplantlara uygulanan bitki büyüme düzenleyicileri .....	20



**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ****Simgeler****Açıklama**

mg/L	Miligram/Litre
cm	Santimetre
dk	Dakika
ml	Mililitre
µm	Mikrometre

**Kısaltmalar****Açıklama**

BAP	6- Benzylamino-purin
IBA	Indol- 3- Butirik Asit
2,4 D	2,4 Diklorofenoksi Asetik Asit
IAA	Indol- 3- Asetik Asit
Kin	Kinetin
MS	Murashige ve Skoog Besin Ortamı

## 1.GİRİŞ

Doğada bulunan bitkiler, gıda olarak tüketilme, orman ve tarım uygulamaları, hava ve su kirliliğinin temizlenmesi, ekosistemin düzenlenmesi, iklim değişikliğinin kontrol edilmesi, giysi üretimi ve barınma ihtiyaçlarımızın giderilmesi gibi çeşitli amaçlara hizmet eder. Bu özellikleri ile bitkiler bizim için, yaşadığımız sürece vazgeçilmezdir (Kurtuluş, 2015).

Doğaya doğru dönüşün gündemde olduğu bu zamanlarda tıbbi bitkiler önem kazanmaya başlamıştır. İnsanlar çok uzun yıllardan günümüze kadar mevcut olan hastalıklara çare bulabilmek için doğaya, hayvanlara bunların yanı sıra özel olarak bitkilere yönelmişlerdir. Uzun denemeler sonucu bitkilerin kullanım şekillerini anlatan listeler oluşturulmuş ve bu listeler sayesinde yüksek oranda başarı sağlanmıştır. Bundan dolayıdır ki bitkiler günümüz dünyasında hala aktif olarak kullanılmaktadır. Tıbbi amaçla kullanılan bitkiler, 5000 yıl öncesinde bulunan Sümerler'e ait yapıtlarla da kanıtlanmıştır. Birçok bitkinin etkilerinin keşfi tesadüflerle, birçoğu da deneme yanılma yolu ile anlaşılmış olup, halk arasında yayılarak tanınmış ve yıllar geçtikçe farklı bitkilerin farklı etkileri tespit edilmiştir (Kurtuluş, 2015).

Son yıllarda tıbbi bitkilerin laboratuvar koşullarında üretimi ile ilgili bitki doku kültürü yöntemlerinin kullanımı konusunda birçok araştırma yapılmaktadır. Araştırmalar bitkilerin ya da metabolitlerinin üretimlerinin zaman, kalite ve verim açısından en iyi yapılabileceği koşulların belirlenmesi üzerinedir (Yue vd., 2016; Rani ve Kumar, 2017; Oliveira vd., 2018; Espinosa-Leal vd., 2018; Jamwal vd., 2018).

Bitki hücre ve doku kültürleri, steril şartlarda ve uygun besin ortamlarında tam bitki, hücre, doku, organ veya sekonder metabolitlerin elde edildiği tekniklerdir (Babaoğlu vd., 2001:2). Bitki doku kültürleri yöntemlerinden biri olan kök kültürleri, köklerinde sekonder metabolit üreten bitkilerin laboratuvar şartlarında üretimi ile ilgili yapılan tekniklerdir. Kök kültürleri, bitkinin kök organından alınan küçük bir parçanın ya da yaprak, yaprak sapı, kotiledon ve gövde gibi organlarından elde edilen adventif köklerin kültüre alınmasıyla kurulabilir. Kök kültürleri, diğer doku kültürlerine kıyasla genetik yapılarının kararlı olması ve hızlı olarak üretiminin sağlanması açısından daha iyidir. Aynı zamanda kendilerine özgü bileşiklerin oluşturulmasına da imkân vermektedir (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015).

Ünlü bilim adamları; Lokman Hekim ve F. Columna isimli araştırmacıların bilimsel çalışmalarına konu olan bitkilerden biri de *Valeriana officinalis* L. bitkisidir. Valeriana'nın ismi Latince sakinleşme anlamına gelen 'valerian' kelimesinden türemiştir. Kediotu olarak adlandırılan *V. officinalis*, dünyanın subtropik bölgelerinde temsil edilen Valerianaceae

famlyasının en büyük ve en yaygın cinsidir. Bu cinse ait 168 adet tür bulunmaktadır (Kaya, 2006).

Halk arasında oban kamıı, kaya Őipleđi diye bilinir (Tanker M. v e Tanker N.,1990). Geleneksel olarak, kas kasılmalarını hafifletici, sakinleştirici, histeri, sinirsel tansiyon, aŐırı yorgunluk, adet sancılarını giderici ve en önemlisi insomnia (hiç uyuyamama) hastalığına karşı çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Sedatif ve hipnotik bir ilaç olarak onaylanmıŐtır. Avrupa Farmakopesi hafif yatıştırıcı, anksiyete ve uykuda hafif hipnotik olarak sınıflandırırken, WHO ile ESCOP orta dereceli sedatif ve uykuyu destekleyen etkisini onaylamıŐlardır. Bunların yanı sıra mide yatıştırıcı, ağrı kesici, öksürük, soğuk algnlığına karşı ve gram (+) bakterilere karşı koruyucudur. Birçok araştırma sonucu; hipertansiyon, ateŐ, kötü huylu tümör, böbrek rahatsızlıkları, bağırsak kurtlarını giderici, merkezi sinir sistemindeki dolaŐım sistemini uyarıcı, solunum sistemindeki mukoza maddelerin atılmasını sağlayıcı ve yara iyi edici, metabolizma faaliyetlerini arttırıcı, panzehir, deodorant, karaciğer koruyucu, endişe ve korku giderici olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Kaya, 2006).

Bu tez çalışmasında, köklerinde tıbbi ve ekonomik açıdan değerli sekonder metabolitler sentezleyen *Valeriana officinalis* L. bitkisinin; yaprak, yaprak sapı ve kotiledon eksplantlarına uygulanan farklı kombinasyon ve konsantrasyondaki bitki büyüme düzenleyicilerin etkisi araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *V. officinalis*'in Bilimsel Sınıflandırması



Şekil 2.1. *V. officinalis* L. bitkisinin resmi (Işık, 2007)

Âlem	: Plantae (Bitkiler)
Alt âlem	: Eudicotidae (Çift çenekliler)
Bölüm	: Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf	: Magnoliopsida (İki çenekliler)
Takım	: Dipsacales
Familya	: Valerianaceae
Cins	: Valeriana
Tür	: <i>Valeriana officinalis</i> L. (Şekil 2.1).

## 2.2. Morfolojik Özellikleri



**Şekil 2.2.** *V. officinalis* çiçeği genel görünümü ([https://www.eddmaps.org/ipane/ icat/jpg/ uconn\\_ ipane\\_valeroffic\\_04a.jpg](https://www.eddmaps.org/ipane/ icat/jpg/ uconn_ ipane_valeroffic_04a.jpg)).

*V. officinalis* bitkisi; çok yıllık rizomlu, gövde basit, dik, yuvarlak, içi boş 5-160cm boyundadır. Yapraklar basit veya pinnat parçalıdır. Dipte rozet şeklinde ve uzun saplı, gövde de karşılıklı veya yukarıya doğru sapsızdır. Çiçek durumu şemsiyemsi, ikili veya üçlü dallanmıştır. Çiçekler zigomorf, beyaz, pembe, sarımsı veya hafif gri renklidir. Kaliks papus şeklinde, korolla tüp şeklinde, 5 lobludur. Stamenler 3, pistil 1 adettir. Meyve tepesinde papus bulunan bir akendir (Karamanoğlu ve Koyuncu, 1974).

## 2.3. Yetiştirme Koşulları

Bitki tohum, ana bitkiden alınan bir parça veya ayırma yöntemi ile elde edilir. Tohumdan bitki elde edilecek ise ekimi, mayıs-haziran aylarında yapılır. Yetiştirildiği toprak açısından tercih ettiği bir toprak türü yoktur. Kuru ve yükseltisi çok olan yerlerde yetişebilir ama nemli toprakları daha çok sevmektedir. Organik madde açısından verimli olan topraklarda bakıma ihtiyaç duymadan hayatlarını sürdürürler (Kaya, 2006).

Çevre düzenlemesinde bordür bitkisi olarak kullanılır. İlkbahar aylarında ekilen tohumlar 4 hafta süresince çıkmaya başlar, devamlı olarak etrafındaki gereksiz bitkilerin temizliği yapılarak, toprak havalandırılmalıdır. En geç mayıs ayının ilk haftalarında çiçekleri görülmeye başlar. Bitkinin daha verimli kök eldesi için çiçeklerin kesilerek bitkiden uzaklaştırılması gerekir (Kaya, 2006).

## 2.4. Kimyasal Kompozisyonu

*V. officinalis* bitkisinin etken maddeleri asıl olarak kök ve rizomlarında bulunmaktadır. Yaprak ve çiçeklerinin herhangi bir tıbbi özelliği yoktur. Yüksek sıcaklıklardaki kurutma işlemi esnasında izo-valerianik asit bünyesinde bir takım kimyasal değişimler ve enzim aktivitesinin hızlanması ile uçucu yağın yapısında bozulmalar meydana getirmektedir. Bu nedenle bazı bilim adamları kuru kök ve rizomlar yerine taze kök ve rizomlarından elde edilen uçucu yağları kullanmaktadır (Kaya, 2006).

*V. officinalis* L. bitkisi merkezi sinir sisteminde ve liganda aktif olarak bulunan flavonoidlerin yanı sıra, yaklaşık 150-200 adet kimyasal bileşen içerir. Ana bileşen olarak valerenik asit kabul edilir. Kökleri ve rizomları iki ana bileşenden oluşmaktadır; uçucu yağında bulunan seskiterpenler (valerenik asit ve diğer türevleri, valeranon, valeranal ve kessil esterleri) ve valepotriatlar (valtrat, didrovaltrat, asevaltrat ve izovaleroksihidroksivaltrat) olup flavonoidler, triterpenler, lignanlar ve alkaloidler gibi diğer bileşenlere doğru liste uzanır. Diğerleri de flavonoidler, triterpenler, lignanlar ve alkaloidlerdir (Nandhini vd., 2018). Borneol, bornil asetat, monoterprenik hidrokarbonlar ( $\alpha$ - fenchene ve camphene) ve valeranal içeriği yönünden çok zengindir (Moortezza ve Joorabloo, 2012). Bitkinin yapısında oldukça yüksek oranda magnezyum ve fosfor bulunmaktadır. Bitkiye ait uçucu yağında ise birden fazla bileşik yer almaktadır. Bitkiden elde edilen faydalar aslında bir bileşenden değil birden fazla bileşenin içermiş olduğu kombine etkiden kaynaklanmaktadır (Kaya, 2006).

## 2.5. Geleneksel Kullanımı

*V. officinalis*'in kökleri, yatıştırıcı ve antispazmodik amaçlar için kullanılmaktadır ve aynı zamanda kardiyak aritmiyi iyileştirmek için de kullanılabilir. Kediotu kökü yüzyıl boyunca rahatlatıcı ve uykuyu teşvik edici bir bitki olarak kullanılmıştır. Ayrıca histeri, hipokondriazis, sinirsel huzursuzluk, kan dolaşımı, zihinsel bozuklukları ve benzeri duygusal durumları tedavi etmek için kullanılır. En az bin yıldır sindirim problemlerini ve idrar yolu enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılmaktadır. Sakinleştirici, anksiyolitik, antidepresan, antispazmodik ve anti-HIV biyoaktiviteleri olarak da kullanılır. Amerika Birleşik Devletleri'nde esas olarak uyku yardımı olarak satılırken, Avrupa'da huzursuzluk, titreme ve endişe için kullanılır. Brezilya'da, yatıştırıcı, antikonvülsan, hipnotik etkileri ve anksiyolitik aktivitesi için geleneksel tıpta kullanılmıştır (Nandhini vd., 2018).



## 2.6. Farmakolojik Aktiviteleri

Kedi otu bitkisinin farmakolojik etkisini içeriğinde bulunan seskuiterpenler (valerenik asit) sayesinde yapmaktadır. Valerian, gama amino bütirik asit (GABA) ile etkileşim sağlamakta, GABA reseptörlerine bağlanarak enzim sistemini inhibe etmektedir. GABA nörotransaminasyonunu artırarak uyku ve sedasyona neden olmaktadır (Karadağ vd., 2013).

Anksiyete bozukluklarına karşı yatıştırıcı, anti-inflamatuar, uyku getirici, serotonin ve asetilkolin reseptörleri üzerine uyarıcı, miyalji, hipertansiyon ve kalp ritim bozukluklarının iyileştirilme aşamalarında kullanılır (Hassani vd., 2015).

## 2.7. Tıbbi Kullanım Alanları

Kedi otu bitkisi, geçmiş yıllarda sağlık problemlerine etki ettiği fark edilip denemeler sonucu tespiti yapılarak aktif olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1800'lü yıllarda kaleme alınan "Tuhfetülfarisin fi ahval-i huyul el-mücahidin" adlı eserde idrar yolu hastalıkları ve böbrek hastalıklarında kullanıldığı bildirilmiştir (Erk, 1959). Bitkinin kramplar, romatoit ağrılar ve dismenoreye karşı kullanımı da söz konusudur (Bacanlı vd., 2012).

*V. officinalis* bitkisinin kökü; günümüz dünyasında ortaya çıkan korku, gerginlik ve sinirlilik gibi durumlarda kullanabilecek tıbbi bir bitkidir. Kökü; demlenerek çay, tentür ve ekstreler biçiminde kullanılır. Yaygın olarak preparat ve tentür şeklinde kullanılmaktadır. Kullanım sonrasında dalgınlık ve yorgunluk gözlenmez rahatlatıcı bir canlılık hissedilir (<http://www.bitkisepeti.com/kediotu.htm>).

Alman E Komisyonu 1995'te, kediotu kökünün uyku bozuklukları için günlük dozunu, 1-3g olarak belirlemiştir. Klinik deneylerin çoğunda 400 mg standart ekstre, uykudan 40-60 dakika önce kullanılmıştır. Standart ekstrede, %0,8 valerenik asit bulunur. Günde birkaç defa, 2-3 g ekstre alınabilir. Valerian tentürü (1:5) için yetişkin dozu, günde üç defa 1-3 ml (yarım veya bir tatlı kaşığı)'dir. Çocuk dozu, yaşı ve kiloya göre hesaplanır. Üç yaşı ve üstü çocuklara, yarım çorba kaşığı tentür, meyve suyu veya sütle karıştırılarak verilir. Avrupa'da, 100 g kediotu kökü ya da eşdeğeri ekstre, bir banyo küveti suya karıştırılarak kullanılır. Kediotu çayı, 2-3 g drogün 150 ml suda kaynatılmasıyla hazırlanır; bu çaydan günde üç defa yemeklerden önce içilir (Başer, 2010).

## 2.8. Bitki Doku Kültürleri

İnsanlar, doğada bulunan bitkileri daha etkili kullanabilmek için; buldukları duruma bağlı olarak birçok yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemler "kültür" yöntemleri olarak

adlandırılır. Bitki kültürleri, tarihi gelişimine göre üç ana gruba ayrıldığında ilk sırada vejetatif ve generatif çoğaltmayı içeren klasik kültürler; ikinci sırada su ve kum kültürleri; son sırada da son yıllarda önem kazanan “Bitki Doku Kültürü” yöntemleri bulunmaktadır (Kocaçalışkan, 2017:1).

Bitki doku kültürleri, besin elementleri, vitaminler, su, jelimsi kıvam verici ve ihtiyaca bağlı olarak eklenen bitki büyüme düzenleyicileri içeren kapalı ancak ışık geçirebilen steril edilmiş kaplarda, yine steril edilmiş tohum, bitki, eksplant gibi materyallerin steril şartlarda bu kaplara alınması işlemidir (Ahloowalia vd., 2002).

Kallus, hücre süspansiyonu, protoplast kültürleri ve bitki rejenerasyonu gibi doku kültürü işlemlerine başlarken verilecek en öncelikli kararlardan birisi kullanılacak besin ortamlarının seçimidir (Babaoğlu vd., 2001: 14). Bitki doku kültürü uygulamalarında birçok besin ortamı kullanılır. Bunlardan bazıları; MS= Murashige ve Skoog (1962), yüksek tuz konsantrasyonuna sahip olup en yaygın olarak kullanılan ortamdır, B5= Gambork ve arkadaşları (1963), nitrat azotu yüksek bir ortamdır, SH= Schenk ve Hilderbrandt (1972), hem monokotil hem de dikotil bitkiler için uygun bir ortamdır, NN= Nitsch ve Nitsch (1969) anter kültürü için uygun bir ortamdır, LS= Linsmaier ve Skoog (1965), organik maddeler bakımından diğer ortamlardan ayrılan bir ortamdır, GT= Gautheret (1942), Ni Ti ve Be gibi özel elementleri ihtiva eder (Kocaçalışkan, 2017: 34).

## **2.9. Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Sınıflandırılması**

Bitki büyüme düzenleyicileri doku kültürü ortamlarının en önemli unsurudur. Rejenerasyonları yönlendirmek üzere farklı tiplerde ve dozlarda besin ortamlarına ilave edilirler. Birçoğu gelişmeyi teşvik ederken, bir kısmı ise gelişmeyi engeller. Büyümeyi ve gelişmeyi teşvik eden, hızlandıran düzenleyicilere stimülatör denir. Büyümeyi ve gelişmeyi geciktirerek durduranlara ise retardant (inhibitör, engelleyici) denir. Bitkiler tarafından sentezlenerek, gereksinim duyulan organlara taşınanlar hormon olarak adlandırılırlar. Sentetik yollarla üretilenler de dâhil olmak üzere genel olarak hepsine bitki büyüme düzenleyicileri adı verilmektedir. Bitkilerin türlerine ve kültüre alınma amaçlarına göre, besin ortamlarına eklenecek olan bitki büyüme düzenleyicileri oranları farklılık göstermektedir (Babaoğlu vd., 2001: 22).

### **2.9.1. Oksinler**

Hücre uzamasını, sağlayan bitki hormonlarının genel sınıfıdır. Temel oksin sentez yerleri apikal sürgün ve kök meristemleri olarak kabul edilir ve genellikle kök oluşumunu

desteklerler. Bu hormonlar doğada, gövde ve internodyumların uzaması, fotoperiyodizm, apikal dominansi, absisyon ve köklenme gibi fizyolojik olaylarla ilişki içerisindedir. Doku kültürlerinde; hücre bölünmesi ve uzaması ile kallus oluşumunu teşvik etmek ve kök farklılaşmasını sağlamak amacı ile kullanılırlar. Temel hormon formu olarak IAA (indol-3-asetik asit) bilinmektedir. Sentetik olanları ise; NAA (naftalen asetik asit), IBA (indol bütirik asit), 2,4-D (2,4-diklorofenoksi asetik asit) ve pikloramdır. Genellikle etanolde ya da seyreltik NaOH'de çözünmektedirler (Gürel vd., 2013: 49).

### **2.9.2. Sitokininler**

Sitokininler, çoğunlukla kök ucu meristeminde ve genç yapraklarda üretilerek büyüme ve gelişmeyi desteklemek için kullanılırlar. Oksinlerle birlikte kullanıldıklarında ise hücre bölünmesinde rol alırlar. Yüksek konsantrasyonlarda (1-10 mg/L) adventif sürgün oluşumu sağlanırken, kök oluşumu engellenir. Rejenerasyon, farklılaşma ve sürgün çoğaltımında etkilidirler, ayrıca antioksidan etki göstererek yaşlanmayı geciktirirler. En çok tercih edilen sitokininler; kinetin, BA (benzi ladenin) veya BAP (6-benzil amino purin), zeatin ve 2IP (izopenteniladenin)'dir. Zeatin ve 2IP doğal olarak üretilen sitokininlerdir. Diğerleri ise; sentetik olarak elde edilmektedir. Genellikle seyreltilmiş NaOH'da çözünürler (Gürel vd., 2013: 49-50).

### **2.10. Besin Ortamları**

Doku kültürü koşullarında, bitkinin gelişimi için ihtiyacı olan elementler besin ortamları ile bitkilere verilir. Bitki türünün ihtiyacına göre çeşitli besin ortamları hazırlanmaktadır. Bugün kullanılan 10'dan fazla besin ortamı vardır. En çok kullanılan ise, Murashige ve Skoog (MS) tarafından oluşturulan bitkinin gelişmesini sağlayan ortamdır (Çizelge 2.1) (Kocaçalışkan, 2017: 32).

**Çizelge 2.1.** Doku Kültürü besin ortamlarında en çok kullanılan reçeteler ve kullanılan bileşikler (mg/L) (Kocaçalışkan, 2017: 34).

Bileşikler	*MS	B5	WH	SH	NN	LS	GT
<b>İnorganik</b>							
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-	-	-	720	1650	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134	-	-	-	-	-
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	300	-	-	-
KNO <sub>3</sub>	1900	2500	80	2500	950	1900	125
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	-	-	300	-	-	500
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	440	150	-	200	220	440	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	250	720	400	185	370	125
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	200	-	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-	-	-	68	170	125
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	150	16,5	-	-	-	-
KCl	-	-	65	-	-	-	-
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	-	15	27,8	27,8	-
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3	-	20	37,3	-	-
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	-	-	2,5	-	-	-	50
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	-	7	-	25	-	3
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	10	-	10	-	16,9	-
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	2	3	1	10	10,6	0,18
H <sub>3</sub> BO <sub>2</sub>	6,2	3	1,5	5	10	6,2	0,05
KI	0,83	0,75	0,75	1	-	0,83	0,5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	-	0,1	0,25	0,25	-
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	-	0,2	0,025	0,025	0,05
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	-	0,1	-	0,025	0,05
NiSO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	0,05
BeSO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	0,1
Ti(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	0,2
<b>Organik</b>							
Myo-inositol	100	-	100	1000	100	100	-
Nikotik asit	0,5	1	0,5	0,5	5	-	0,5
Piridoksin. HCl	0,5	1	0,1	0,5	0,5	-	0,1
Thiamin HCl	0,1	10	0,1	5	0,5	0,4	1
Glisin	2	-	3	-	2	-	3
Sakkaroz							

Bu besin ortamlarında; amino asitler, bitki büyüme düzenleyicileri, jel yapıcı maddeler, kimyasal olarak tanımlanamayan maddeler, makro elementler, mikro elementler, su, şekerler ve vitaminler bulunur.

**Amino asitler;** hücre kültürlerinin indirgen azot ihtiyacını hemen karşılamada çok önemli olabilmektedirler. Eğer ortamda nitrat ve amonyum miktarı dengeli ise birçok ortamda kullanımları gereksiz olabilir. Glisin, arginin, glutamin, prolin aspartik asit en çok kullanılanlar arasındadır. Amino asitlerin sadece L-formları biyolojik olarak aktif olduklarından mutlaka L-

formları kullanılmalıdır. Kazein ve diğer protein hidroliz ürünleri bol miktarda amino asit içermektedir (Babaoğlu vd., 2001:18).

**Jel yapıcı maddeler;** besin ortamlarını yarı-katı hale getirmek için kullanılan komponentler arasındadırlar ve besin ortamının performansını önemli derecede etkilerler. Durağan sıvı kültürlerde hücre ve dokular, sıvı ortama batmakta ve oksijen gereksinimini karşılamakta zorlanarak ölmektedirler. Aranılan en önemli özellikleri otoklavlama ile sterilizasyona dayanıklılıkları ve besin ortamı sıcakken sıvı soğukken yarı katı bir hal alıyor olmalarıdır. En fazla tercih edilenleri; agar, agaroz, Phragel, alijinat, silikajel, jelatin ve nişastadır. Bütün bu katılaştırıcılar, genellikle kırmızı deniz alglerinden elde edilmektedir. Jel yapıcı maddeler besin ortamının en pahalı komponentleri arasındadır (Babaoğlu vd., 2001: 17-18; Gürel vd., 2013: 52).

**Kimyasal olarak tanımlanamayanlar;** belirli kallus ve organlarının büyümesini teşvik etmek üzere; kazein, hidrolizat, hindistan cevizi sütü, malt ekstratı, domates ve portakal suyu, maya ekstraktı gibi kimyasal içeriği tam olarak belirlenemeyen ve stabil olmayan çok sayıda kompleks besin karışımları denenmektedir. Hindistan cevizi sütü içerik bakımından çok zengindir. Hindistan cevizi sütünden başka kimyasal olarak tanımlanamayan maddelerden en fazla kullanılanları maya özü, kazein hidrolizat, kazamino asit ve patates özüdür (Babaoğlu vd., 2001: 18; Kocaçalışkan, 2017: 33).

**Makro elementler; Azot:** Bitki için önemli olan organik bileşiklerin yapısında bulunur. **Fosfor:** Bitkide ATP, şekerler ve nükleik asitlerin yapısına katılmaktadır. **Kükürt:** Bitkide klorofilin oluşmasında görev alır. **Potasyum:** Bitkide hastalıklara karşı direnç sağlar. Tohumun olgunlaşmasını ve bitkinin köklerinin gelişmesini sağlamaktadır. **Kalsiyum:** Bitkinin besin maddelerini almasını ve toprakta bulunan toksik maddelerin çökmesinde rol oynar. **Magnezyum:** Fotosentezde aldığı görevden dolayı hayatın devamlılığını sağlar (Bolat ve Kara, 2017).

**Mikro elementler; Demir:** bitkide solunum ve fotosentez reaksiyonlarında görev alır. **Çinko:** Bitkide azot metabolizmasını, nişasta oluşumunu ve tohum olgunlaşmasını etkiler. **Mangan:** Fotosentezde suyun parçalanmasını sağlar. **Molibden:** Bitkiler için enzim aktivesinde ve baklagillerde azot fiksasyonu için gerekli bir elementtir. **Klor:** Fotosentez olayında ve yaprakların turgor basıncı yapmasını sağlar. **Bakır:** Klorofil üretimi, solunum ve protein sentezleri için bitki tarafından ihtiyaç duyulur (Bolat ve Kara, 2017).

**Şekerler;** besin ortamının en önemli komponentleri arasındadır. Kültüre alınan bitki hücre ve dokuları başlangıçta yeterli miktarda karbonhidrat sentezi yapamadıklarından enerji kaynağı olarak çeşitli şekerler kullanılmalıdır. Besin ortamına dışarıdan bir karbon kaynağının eklenmesi hücre ve dokularda çoğalma, büyüme ve gelişmeyi sağlar. En fazla tercih edileni, sakkarozdur. Besin ortamlarında sıklıkla kullanılan diğer şekerler sırasıyla glikoz, maltoz, rafinoz ve fruktozdur. Glikoz bazı durumlarda rejenerasyonun uyarılmasında sakkarozdan daha etkili olabilmektedir. Çünkü sakkaroz bir disakarittir ve hücreler tarafından glikoz ve fruktoza parçalandıktan sonra kullanılabilir. Şekerler uzun süreli otoklav sonucu karamelize olabilmekte ve hücreler üzerinde toksik etki yapan yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklere dönüşmektedirler (Babaoğlu vd., 2001: 16; Gürel vd., 2013: 48).

**Vitaminler;** enzim reaksiyonlarında katalitik etkiye sahiptirler. Bitki kültürleri için en gerekli vitaminler tiamin (B1) ve daha sonra sırasıyla nikotinik asit (B3, niasin) ve pridoksindir (B6). Myo-inositol ve d-biotin (H)'de öncelikle gerekli vitaminler içerisinde değerlendirilmektedir. Diğer vitaminler arasında ise pantotenik asit (B5), askorbik asit (C), tokoferol (E), folik asit (M), retinol (A), riboflavin (B2) ve kolekalsiferol (D3) zaman zaman özel uygulamalarda besin ortamlarına ilave edilmektedir. Vitaminler genellikle otoklavdan önce besin ortamına ilave edilirler. Normal şartlarda bitkiler vitaminlerini sentezlerler. Ancak kültür şartlarında bunun takviyesi gerekmektedir (Babaoğlu vd., 2001: 16; Kocaçalışkan, 2017: 33).

## 2.11. Çevresel Faktörler

Çevresel faktörler bitkilerin gelişim ve içeriklerini olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle, bitki büyütme (kültür odası) odasındaki ışık, sıcaklık ve nem bitki türlerinin isteklerine karşı sürekli sabit ve kontrol altında tutulmalıdır.

## 2.12. Kök Kültürü

Farklı sekonder metabolitlerin kaynağı olarak bitki köklerinin kullanımı çok eskiden beri bilinmektedir. Köklerdeki biyokimyasal çeşitlilikle ilgili bilgilerin çoğu geleneksel farmakopelerden gelmektedir.

Bitki doku kültürünün öncülerinden olan Phillip White 1934'te, kök uçlarını çeşitli minerallerin, şekerin ve vitaminlerin bulunduğu besin ortamında kültüre alındığında uzamalarını ve dallanmalarını sağlamıştır. Kök kültürleri anorganik beslenme, azot metabolizması, bitki büyümesinin düzenlenmesi ve kök gelişimi çalışmalarında standart bir deneysel sistemi oluşturmuşlardır. Geniş kültür kaplarında geliştirilebilen kök kültürleri kendi organik matrisleri

içerisinde immobilize olmuş biyokatalistler olarak kabul edilebilirler. Süspansiyon kültürlerine göre daha yüksek genetik stabilite gösterirler (Gürel vd., 2013:163-164).

### 2.12.1. Kök kültürünün uygulama alanları

Temel araştırmalar (histolojik, sitolojik, morfolojik, fizyolojik, metabolik, genetik, moleküler vb.) için kullanımı, sekonder metabolitlerin üretimi, biyoreaktörler kullanarak yüksek miktarda biyokütle üretimi, bitki- mikroorganizma ilişkilerinin incelenmesi, kallus ve hücre kültürlerinin kurulması, kök kökenli bitki rejenerasyonlarının gerçekleştirilmesi ve klonal çoğaltımın sağlanması, kriyopreservasyon tekniklerinin uygulanması, *in vitro* seleksiyon çalışmalarının yapılması, kök hücre çalışmalarında kullanılması, germplazm muhafazasının yapılmasıdır (Gürel vd., 2013:164).

### 2.13. Literatür Araştırması

**Abdi ve Khosh-Khui (2007)**, yaprak segmentlerini kullanarak *V. officinalis* 'de tekrarlanabilir bir *in vitro* rejenerasyon sistemi geliştirmişlerdir. Çoklu sürgünler yaprak eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu yolu ile elde edilmiştir. Yaprak segmentlerinin sürgün tomurcukları üretme kabiliyeti ortamdaki konumlarına bağlı olarak değişmiştir. Yaprak segmentlerinin abaksiyal (dorsal) tarafı oldukça tepki vermiş ve 1 mg/L 6-BAP ile takviye edilmiş MS ortamı üzerinde eksplant başına maksimum sürgün rejenerasyonu göstermiştir. Yaprak segmentlerinden rejenere olmuş sürgünler, farklı konsantrasyonlarda N (3-metilbut-2-enil) 1H-purin-6-amin (2ip) ve IAA içeren MS ortamına aktarılmıştır. Optimum en iyi sürgün oluşumu, 6 mg/L 2ip ile 0,3 mg/L IAA ortamda elde edilmiştir. Rejenere sürgünlerin köklenmesi, 1 mg/L NAA içeren MS ortamında gerçekleştirilmiştir. İyi gelişmiş kök ve sürgün sistemli bitkiler başarıyla seraya aktarılmıştır.

**Reza ve ark. (2009)**, *V. officinalis*'in hızlı bir şekilde çoğaltılması için yaprak ve yaprak sapı eksplantlarından elde edilen kalluslardan sürgün rejenerasyonu yoluyla bir yöntem geliştirmişlerdir. Yaprak sapı ve yaprak parçaları, kallus eldesi için farklı oksinler (2,4-D, NAA, pikloram (Pic)) ve Kinetin (Kin) kombinasyonları içeren MS ortamlarında kültüre alınmışlardır. Kallus oluşumu en yüksek 1,0 mg/L 2,4-D içeren ortamlarda, sırasıyla yaprak ve yaprak sapı eksplantlarından %100 ve %98 olarak belirlenmiştir. Üretilen kalluslar, sürgün rejenerasyonu için çeşitli BA (0,1, 0,2 ve 0,4 mg/L) veya Kin (0,1, 0,2 ve 0,4, mg/L) konsantrasyonları ile desteklenmiş ortamlara aktarılmışlardır. 0.2 mg/L BAP veya Kin ilavesi, hem yaprak hem de yaprak kallus segmentlerinde sürgün rejenerasyon sıklığını arttırmıştır. En yüksek adventif sürgün yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslarda (kallus başına 13) oluşmuştur. Optimum

köklenme, 1 mg/L NAA ile desteklenmiş MS ortamında gözlemlenmiştir. *In vitro* olarak yetiştirilen bitkicikler iklimlendirilmiş ve %80 başarı ile seraya aktarılmıştır. Bu *in vitro* çoğaltım protokolü, bu şifalı bitkinin hızlı üretiminin yanı sıra korunumu için de yararlı olabilir.

**Zayova ve ark. (2010)**, *V. officinalis*' in kontrollü koşullarda çimlendirilmiş fidelerden *in vitro* kültür ile hızlı ve etkili bir şekilde büyümesi için bir çalışma yapmışlardır. En yüksek tohum çimlenme oranı, soğuk tabakalaşma işleminden sonra GA3 çözeltisine batırılmasıyla, MSG3 ortamında oluşmuştur. MS ortamının çeşitleri olan sekiz farklı besin ortamından (MS1 - MS8), BAP ve askorbik asit eklenmiş MS3 ortamında, en etkili mikroüretim ve tomurcuk oluşumu görülmüştür. Köklenme en iyi şekilde düşük konsantrasyonda NAA veya IBA ile güçlendirilmiş yarı-kuvvetli MS ortamında gerçekleşmiştir. Turba: Perlit (2:1) h/h içeriği, bitki büyüme odasında katılaşmak için en uygun dikim substratı olarak belirtilmiş ve kullanımı, dış mekân transferinden önce rejenere bitkilerin yüksek frekanslı hayatta kalmasını (%95) sağlamıştır. Bahçe toprağına ekimi yapılan mikroçoğaltım ile elde edilen bitkiler, vejetatif ve oral morfolojinin yanı sıra, büyüme özelliklerine göre ana bitki ile aynı yapıya sahip olmuştur.

**Tousi ve ark. (2010)**, çalışmalarında *V. officinalis* 'e ait kök ve rizomların valepotriatlar ve valerenik asitleri içermesinden dolayı kök organının oldukça önemli olduğunu anlatmıştır. Bu sebeple bitki doku kültürü yöntemini kullanarak köklerin daha kolay, hızlı ve çok miktarda elde etme yöntemini araştırmışlardır. Dört aylık bitkilerin yaprakları, sapları ve kök bölümlerinden elde edilen eksplantlar, farklı konsantrasyonlarda MS besiyerine ilave edilen oksin ve sitokinin ile kültüre alınmışlardır. Verim açısından en iyi şartları bulmak için, gelişen köklerde biriken valerenik asitler ve valepotriatlar incelenmiştir. Köklerde ölçülen maksimum valerenik asit (% 0,84) 1,25 µM IAA eklenmiş ortamda yaprak sapı eksplantlarında ve valepotriat içerikleri (% 7,41) 0,625 µM IAA eklenmiş ortamda görülmüştür. Bu değerler, kontrol grubu olarak bitki büyüme düzenleyicileri eklenmemiş olan besiyerinde bazal ve apikal kök segmentlerinden alınan köklerden daha verimli ve yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda yaprak eksplantlarından 5 µM NAA ile desteklenmiş ortamlarda direkt oluşan köklerin en yüksek ortalaması (29,00) olarak belirlenmiştir. Ayrıca 2,5 µM NAA içeren ortamlarda kök apikal segmentlerinde dolaylı olarak geliştirilen maksimum kök sayısı (30,05) olarak gözlenmiştir. Bu sonuçların, bitki büyüme düzenleyicilerin yanı sıra eksplant tipinin organogenezi etkilediğini bildirmişlerdir.

**Torkamani ve ark. (2014)**, saçaklı kökler kültürü yolu ile bu bitkideki sekonder metabolitleri elde etmeye çalışmışlardır. Bu çalışmada, kediotunda saçaklı kök eldesi için, *Agrobacterium rhizogenes*'in Wild-türü suşu A13 kullanılmıştır. *Fusarium graminearum* ekstresi



(FE), metil jasmonat ve salisilik asit dâhil olmak üzere üç farklı elisitörün seçilen saçaklı kök klonu "LeVa-C4" de valerenik asit üretimi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. 23 günlük kültürler, 3 ve 7 günlük maruz kalma sürelerinde farklı konsantrasyonlarda elisitörler ile muamele edilmiştir. FE (% 1) ve MJ (100 µM/L), 7. gün sonrasında valerenik asit üretimini, kontrole kıyasla 12,31 ve 6 kat daha yüksek bir seviyeye ulaşmıştır. Salisilik asit, valerenik asit üretimini önemli ölçüde arttırmamıştır.

**Ghaderi ve Jafari (2014)**, önemli bir tıbbi bitki olan *V. officinalis*'de, adventif sürgün oluşumu yoluyla etkili bir rejenerasyon sistemi geliştirmişlerdir. Rejenerasyon cevabı, kallus morfolojisinin yanı sıra bitki büyüme düzenleyicilerinin türü ve konsantrasyonlarından önemli ölçüde etkilenmiştir. Optimum değerler adventif sürgünler için, hem yaprak hem de yaprak sapı eksplantlarındaki tomurcuk oluşumu kompakt, nodüler ve sarımsı yeşil fenotipli organogenik kallusların 9,30 µM Kn ve 2,26 µM 2,4-D ile desteklenmiş MS ortamında elde edilmiştir. İyi gelişmiş sürgünler, hormonsuz bir yarı kuvvet (1/2) MS bazal ortamında elde edilmiştir. Uzun sürgünlerin *in vitro* köklenmesi, çeşitli konsantrasyonlarda NAA veya IBA ile desteklenmiş 1/2 MS ortamı üzerinde denenmiştir. 2,46 µM konsantrasyonda IBA, en yüksek köklenme sıklığını (% 98) teşvik eden en iyi köklenme uygulaması olarak bulunmuştur. Köklü bitkiciklerin başarılı iklimlendirilmesi,% 95.34 hayatta kalma oranı ile 5:1 turba ve perlit karışımı içeren saksı besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Biyokütle özütlerindeki valtrat ve valerenik asit içeriği, yaprak sapı eksplantlarından elde edilen bitkilerde, yaprak eksplantlarından elde edilen bitkilerden ve tohumla yetiştirilen tarlada yetişen bitkilerden önemli ölçüde (P <0.05) daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Maksimum valtrat (6,98 mg g<sup>-1</sup> KA) ve valerenik asitler (3,02 mg g<sup>-1</sup> KA), 2,26 µM 2,4-D ve yüksek konsantrasyonda Kn (9,30 µM) içeren ortamlarda yaprak sapı eksplantlarından elde edilen kök dokularından ölçülmüştür. Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA analizi, doku kültüründe yetiştirilen bitkilerde genetik çeşitlilik kanıtı olmadığını göstermiştir. Sonuçlar, *in vitro* koşullar altında doku kültürü ile elde edilen *V. officinalis* bitkilerinin, doğal vahşi büyüme koşulları altında yetişenlerden daha yüksek sekonder metabolit üretebildiğini göstermiştir.

**Taheri ve Ghesmati (2018)**, *in vitro* koşullarda MS besin ortamına ilave ettikleri metil Jasmonat konsantrasyonunun valerenik asit biyosentezindeki etkisini araştırmışlardır. *V. officinalis* köklerindeki valerenik asit biyosentezinde yer alan seskiterpen sentaz (Sesqui-TPS) genlerinin transkripsiyonuna, metil jasmonat (MeJA) konsantrasyonlarının (50 ve 100 µM) etkisini, kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) ile 144 saatlik bir süre içerisinde izlemişlerdir. Ek olarak, valerenik asit içerikleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile ölçmüşlerdir. En yüksek miktarda valerenik asit, 72 saatlik maruz kalma süresinde,100 uM

MeJA uygulamasında (12,45 mg/g kuru ağırlık (DW)) kontrol (1,03 mg/g DW) gruba göre 12 kat artış gösterdiğini belirlemişlerdir. MeJA konsantrasyonuna bağlı bir şekilde, VoTPS1 ve VoTPS7 genlerinin transkripsiyon oranında artış belirlemişlerdir.



### 3. MATERYAL VE METOD

Tez çalışması Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada tıbbi öneme sahip olan *V. officinalis* bitkisi kullanılmıştır. Bitkinin tohumları Kütahya Belediyesi Hekim Sinan Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir.



Şekil 3.1. *V. officinalis* tohumları.

#### 3.1. Besin Ortamı

Murashige ve Skoog (MS) besin ortamı kullanılmıştır. Tohum çimlendirme çalışmaları bitki büyüme düzenleyicileri eklenmemiş MS besin ortamında, kök oluşumu çalışmaları ise farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS besin ortamlarında yapılmıştır.

#### 3.2. Stok Solüsyonlarının Hazırlanması ve Muhafazası

Besin ortamının hazırlanmasındaki ilk aşama stok solüsyonlarının hazırlanarak, bitkinin ekilmesi ve gelişimi için kullanılmasıdır. Bu solüsyonlar, birden fazla bileşiğin bir araya getirilmesiyle oluşurlar. Bu solüsyonların önceden hazırlanması ve hazır bulundurulması besin ortamının hazırlanmasında oldukça kolaylık sağlamaktadır. Makro ve mikro besin elementleri, vitaminler ve bitki büyüme düzenleyicileri olmak üzere 4 gruptan oluşurlar (Çizelge 3.1). Muhafazası +4 °C'de (buzdolabında) sağlanmaktadır.

**Çizelge 3.1.** MS stok solüsyonları içeriği (gr/100 ml).

STOK A	Glisin Nikotinic asit Pridoksin-HCL Thiamin- HCL Myo-inositol*	0,04 0,01 0,01 0,002 -
STOK B	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33
STOK C*	KNO <sub>3</sub>	-
STOK D	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,746 0,556
STOK E	CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	8,8
STOK F	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,4
STOK G	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O KI	0,124 0,005 0,0005 0,0166
STOK H	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,338 7,4 0,0005 0,1725

\*Belirtilen kimyasalların stok solüsyonları hazırlanmamış MS ortama direkt ilave edilmişlerdir.

### 3.3. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması ve Muhafazası

1 mg/5 ml oranına sahip olan bitki büyüme düzenleyicileri yaklaşık 2,5 ml Çizelge 3.2’te belirtilmiş olan çözücülerle 0,02 gr tartılıp konularak manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülmüştür. Ardından 100 ml kadar saf su ile tamamlanmıştır. Elde edilen stoklar; bozulmaya karşı, koyu renkli cam şişelerde, serin ve güneş almayan yerde muhafaza edilmişlerdir.

**Çizelge 3.2.** Kültür ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicileri

Adı	Kısa Adı	Çözünme Durumu
<b>OKSİNLER</b>		
Naftalen asetik asit	NAA	%70 EtOH
<b>SİTOKİNİNLER</b>		
6-Benzil amino pürin	BAP	0,1 N NaOH

### 3.4. Besin Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

#### 3.4.1. MS besin ortamlarının hazırlanması (1 L için)

1 L MS besin ortamını hazırlamak için 1 litrelik beherin yarısına kadar saf su konulmuştur. Çizelge 3.1’de belirtilen A’dan H’ye kadar olan stok çözeltilerinin her birinden cam pipetler yardımıyla 5’er ml çekilerek beherin içine eklenmiştir. Ardından çözeltilere 30 gr sakkaroz, 1,9 gr KNO<sub>3</sub> ve 0,1 gr myo-inositol eklenmiştir. Çözelti 1 L’ye kadar saf su doldurulmuştur. pH’sı 5,7-5,8 olacak şekilde asit-baz (0,1N NaOH ve 0,1N HCl) dengesiyle ayarlanmıştır. Besin ortamına, jelimsi bir kıvam sağlayabilmek için 7 gr agar ilave edilmiştir. Isıtıcı manyetik karıştırıcı yardımıyla şeffaflaşmaya kadar kaynatılmıştır. Hazırlanan besin ortamı, 175 ml kavanozlara 30 ml konularak kapakları kapatılmıştır. Sterilizasyonu için otoklav kullanılmıştır. Çimlendirme için MS besin ortamına hiçbir bitki büyüme düzenleyici eklenmemiştir.

#### 3.4.2. Besin ortamının ve kullanılan malzemelerin sterilizasyonu

Besin ortamları ve kullanılan malzemeler 121°C, 1.06 kg/cm<sup>2</sup> basınç altında, 15 dk otoklav ile steril edilmiş, oda sıcaklığında soğutulmuş ve karanlıkta saklanmışlardır.

### 3.5. Aseptik Koşulların Sağlanması ve Sürdürülmesi

Kültüre alınma işleminin yapıldığı, bitki büyütme odası sodyum hipoklorit ile düzenli olarak silinmektedir. Bitkilerin yerleştirileceği raflar ise, %70’lik etanol ile steril edilmektedir.

Bitki transfer çalışmalarına başlanması için, steril kabinin aseptik koşulları sağlanması gerekir. Sterilizasyon işlemi, %70’lik etanol ile silme ve 15 dk süre ile UV lamba çalıştırılarak yapılmıştır. Genelde bu işlem 15 dk’dan fazla sürede de uygulanmıştır.

Malzeme olarak kullanılan kavanoz, pens, bisturi, süzgeç, peçete, gazlı bez gibi araçlar alüminyum folya ile kaplanarak, buzdolabı poşetlerine konulmuş, 121°C, 1.06 kg/cm<sup>2</sup> basınç altında, 15 dk süre ile otoklavda steril edilmiştir. Otoklav bandı kullanılarak sterilizasyon kontrolü sağlanmıştır.

Çalışma sırasında oluşabilecek kontaminasyon riskine karşın, çalışmaya başlamadan eller %70'lik ethanol ile steril edilmiş ve genellikle tek kullanımlık lateks eldivenler kullanılmıştır.

### 3.6. Kültür Metodu

#### 3.6.1. Eksplant kaynakları

Tez çalışmasında, *in vitro* steril olarak çimlendirilmiş tohumlardan elde edilen bitkilerden izole edilen kotiledon, yaprak ve yaprak sapları eksplant olarak kullanılmıştır.

#### 3.6.2. Tohumların hazırlanması ve sterilizasyonu

*V. officinalis* tohumları öncelikle saf su ile yıkanmışlardır. Tohumlar yüzey sterilizasyonu işlemleri için süzgece alınıp, %70'lik etil alkolde 5 dk, %0,5 sodyum hipokloritte 3dk steril edildikten sonra 3 seri saf su içerisinde 3'er dk bekletilerek durulanmıştır. Steril peçete üzerine çıkartılarak fazla suyu giderilen tohumlar MS besin ortamı içeren kavanozlara her birinde 5-8' er adet olacak şekilde aktarılmıştır. Kavanozlar üzerine ekilen materyalin adı, numarası ve tarih yazılarak etiketlenmiş, bitki büyüme odasında alınmışlardır.

### 3.7. İklimlendirme Koşulları

Tohum çimlendirme işlemleri, 24±2°C'de ve 4000 lux beyaz floresan lamba ışığında; köklendirme çalışmaları 24±5°C' de ve 2000 lux beyaz floresan lamba ışığında 16sa/8sa fotoperiyotta bitki büyüme odasında yapılmıştır.

### 3.8. Bitki Büyüme Düzenleyicilerin *V.officinalis* Bitkisinin Eksplantlarına Etkisi

Bitki eksplantlarına uygulanan bitki büyüme düzenleyicilerin etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda, yüzey sterilizasyonu yapılarak çimlendirilmiş tohumlardan elde edilen 5 haftalık 3-5 cm uzunluğundaki bitkiciklerden kotiledon, yaprak ve yaprak sapı kısımları ayrılarak alınmıştır. Yaprak ve yaprak sapı eksplantları, 1 kavanozda 4 eksplant olacak şekilde toplamda 8 eksplant; kotiledon eksplantları ise 2'ye bölünerek, 1 kavanozda 2 eksplant olacak şekilde toplamda 24 eksplant, belirtilen 8 farklı konsantrasyon ve kombinasyonda bitki büyüme düzenleyici içeren MS besin ortamlarına aktarılmıştır (Çizelge 3.3). Kotiledon, yaprak sapı ve

yaprak eksplantları 5 hafta aralıklar ile 2 defa alt kültüre alınmıştır. Alt kültür işlemleri esnasında eksplantlar üzerinde meydana gelen nekrotik dokular, kök yapıları ve kalluslar kontrol edilmiştir. Gelişim gösteren eksplantlar alt kültür aşamalarında seyrekleştirilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Eksplantlara uygulanan bitki büyüme düzenleyicileri.

Ortam No	MS + Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)
1	MS + 1 mg/L BAP+0,5 mg/L NAA
2	MS+ 1 mg/L BAP+1 mg/L NAA
3	MS + 1 mg/L BAP+1,5 mg/L NAA
4	MS + 1 mg/L BAP+2 mg/L NAA
5	MS + 2 mg/L BAP+0,5 mg/L NAA
6	MS + 2 mg/L BAP+1 mg/L NAA
7	MS + 2 mg/L BAP+1,5 mg/L NAA
8	MS + 2 mg/L BAP+2 mg/L NAA
Kontrol	MS

### 3.8. LC-MS Analizleri

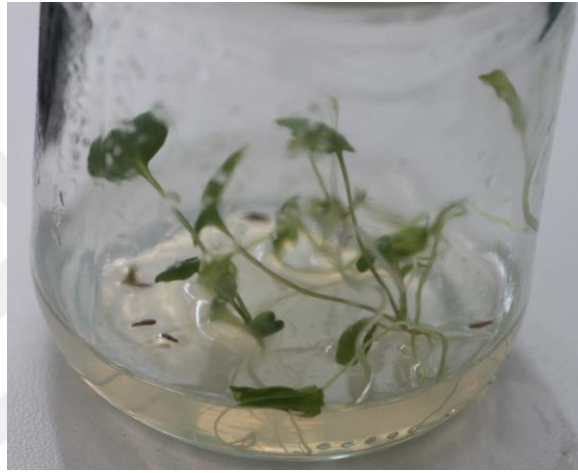
Yaklaşık 5 g kurutulmuş bitki numunesi kahve öğütücüsü yardımı ile öğütülmüş ve 100 ml' lik kapaklı cam şişe içerisinde shaker üstünde 30 ml etanol ile bir gece boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Karışım kaba filtre kâğıdından süzülerek katı ve sıvı kısımlar birbirinden ayrılmıştır. Daha sonra etanol rötarı evaporatörde uçurularak katı özüt elde edilmiştir.

Kurutulmuş numune (yaklaşık 200 µg) 200 µL Çözelti A' da (%0,050 2,2,2-trifluoroasetik asit (TFA) içeren saf suda (v/v)) çözülüp şırınga ucu filtre ile süzüldükten (RC 0,45 µm) sonra Agilent G6530B marka Q-TOF LC-MS ile analiz edilmiştir. Bu analiz için 60 dakikalık %5-80 Çözelti B (%0,045 2 TFA içeren %90' lık asetonitril çözeltisi) gradyentli metod ve 150x2 mm Agilent marka C18 kolonu kullanılmıştır. LC-MS analizleri Dumlupınar Üniversitesi İleri Teknolojiler Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *V. officinalis* L. Tohumlarının Çimlendirilmesi

*In vitro* koşullar altında MS besin ortamında *V. officinalis* tohumlarına 3 dk %70 ethanol, 5 dk %0,5 sodyum hipoklorit ile yüzeysel sterilizasyon işlemleri uygulanmıştır. Çimlendirme oranı %39 olarak belirlenmiştir. Tohum çimlenmesi 3. günden itibaren gözlenmiştir. Bitkicikler 2–3. haftalar sonunda 3-5 cm arasında büyüme göstermiştir (Şekil 4.1).

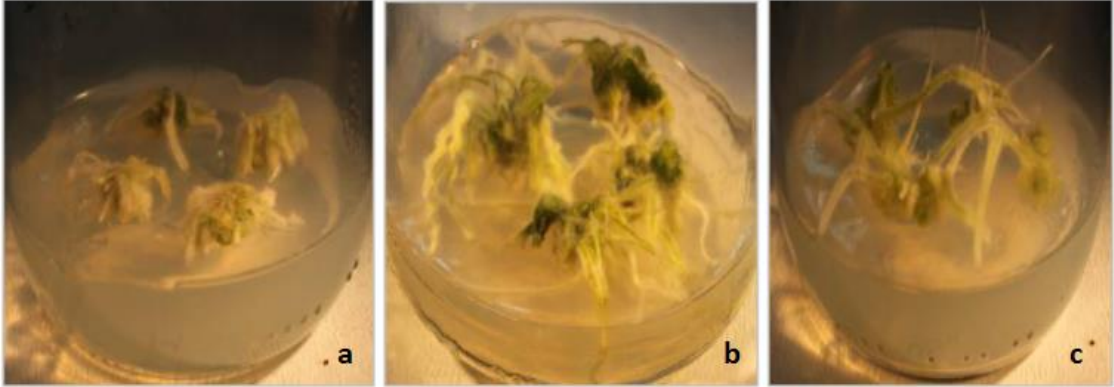


**Şekil 4.1.** *In vitro* çimlendirilmiş *V. officinalis* L. tohumlarından elde edilen 3 haftalık bitkicikler.

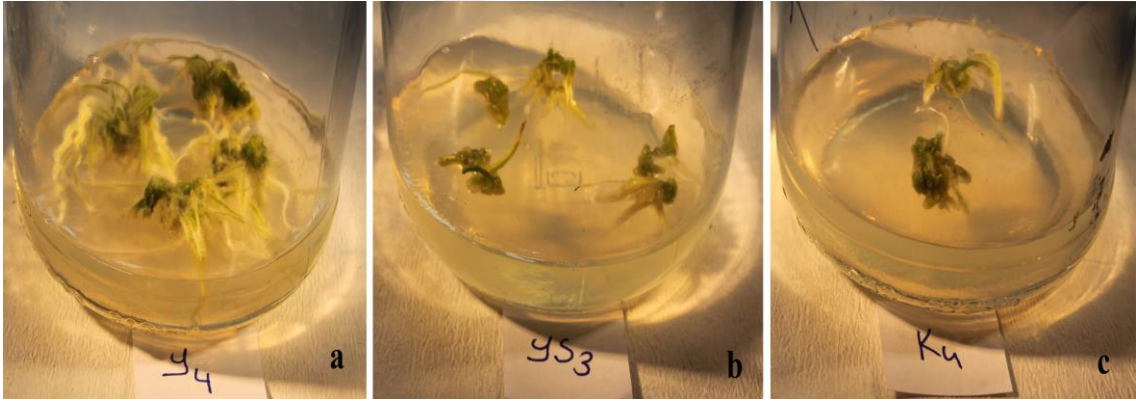
### 4.2. Eksplantlara Uygulanan Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Etkileri

*In vitro* koşullarda 5 hafta yetişen bitkilerin yaprak, yaprak sapı ve kotiledon eksplantları rejenerasyon çalışmaları için 8 farklı konsantrasyon ve kombinasyonda bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS besin ortamlarına aktarılmıştır. Yapılan uygulamalar sonucunda oksin ve sitokin kombinasyonu içeren uygulamalarda en iyi kök oluşumu yaprak eksplantlarında elde edilmiştir (Şekil.4.2). Bunun yanı sıra tüm uygulamalarda kök oluşumları gözlenmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10), yalnızca 1 mg/L BAP ve 2 mg/L BAP içeren MS besin ortamlarına aktarılan eksplantlarda herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Çizelge 4.1).

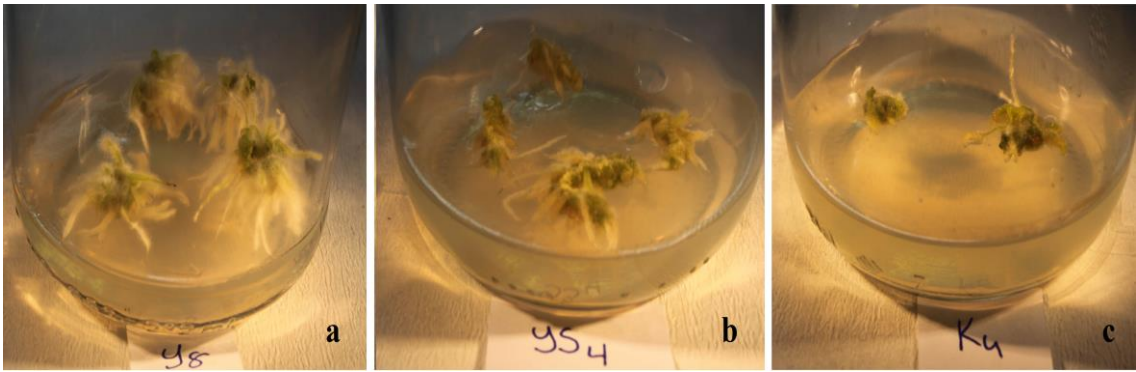




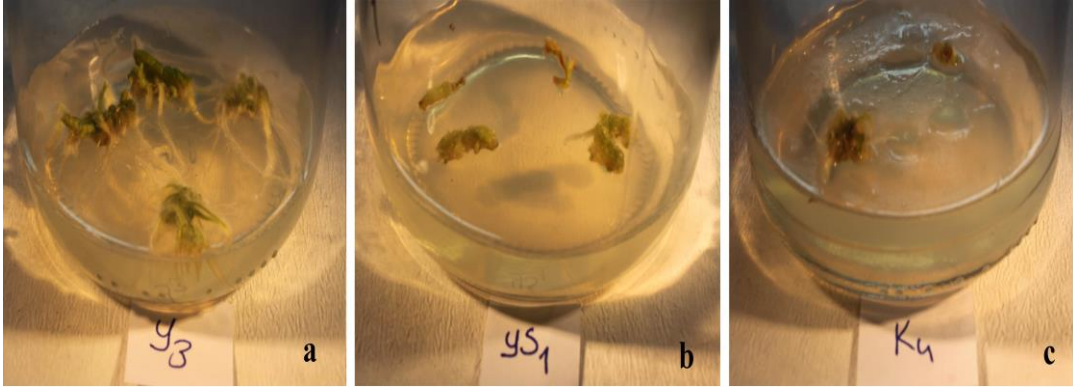
**Şekil 4.2.** Kültür işleminin 3. Haftasında Eksplantlarda oluşan kökler **a.**Yaprak sapı **b.**Yaprak **c.**Kotiledon.



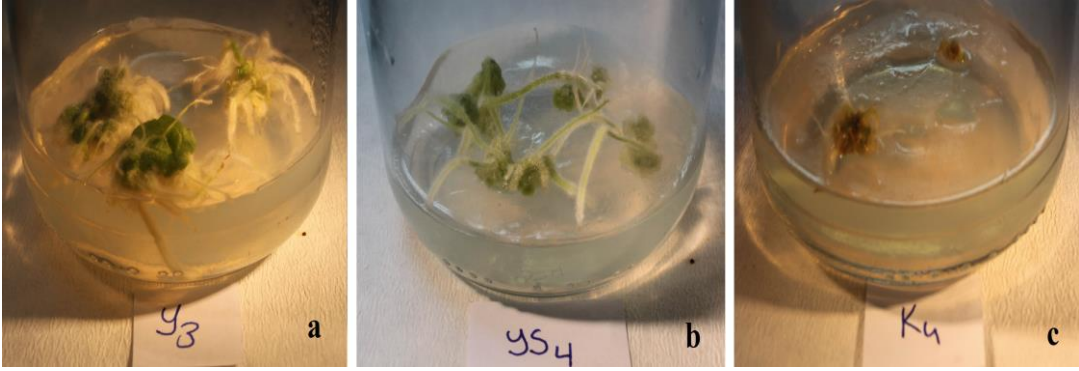
**Şekil 4.3.** 1 mg/L BAP+0,5 mg/L NAA içeren MS ortamları eksplantların gelişimleri **a.** Yaprak **b.** Yaprak Sapı **c.** Kotiledon.



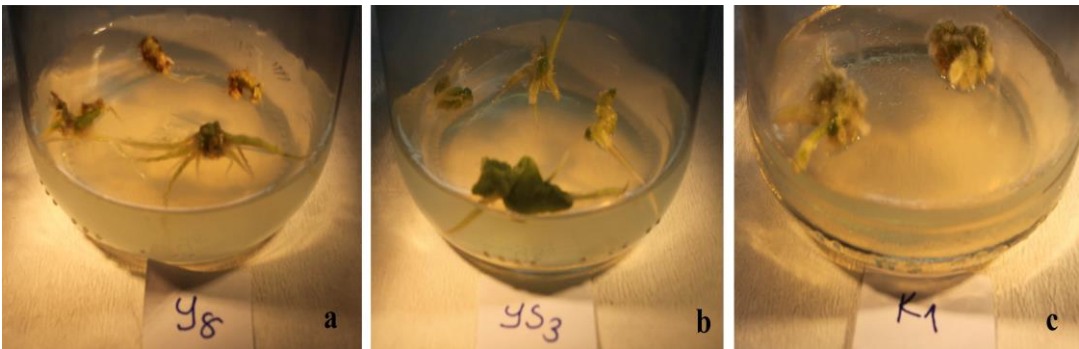
**Şekil 4.4.** 1 mg/L BAP+1 mg/L NAA içeren MS ortamları eksplantların gelişimleri **a.** Yaprak **b.** Yaprak Sapı **c.** Kotiledon.



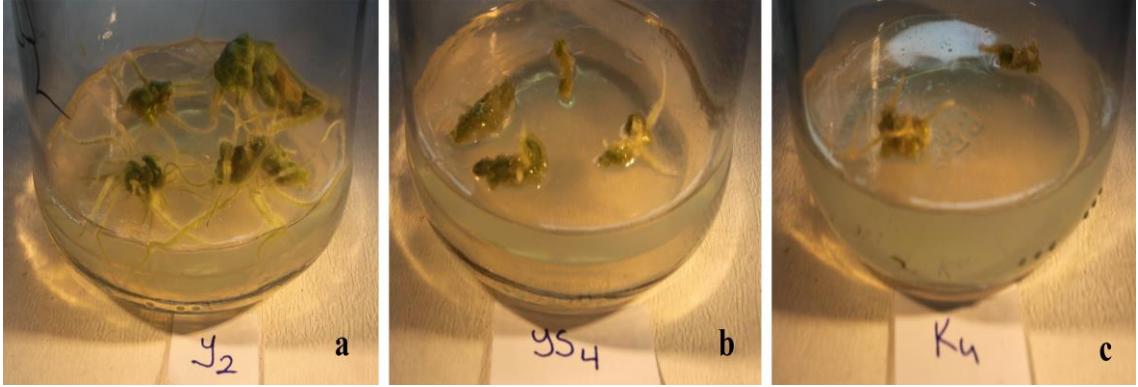
**Şekil 4.5.** 1 mg/L BAP+1,5 mg/L NAA içeren MS ortamları eksplantların gelişimleri **a.** Yaprak **b.** Yaprak Sapı **c.** Kotiledon.



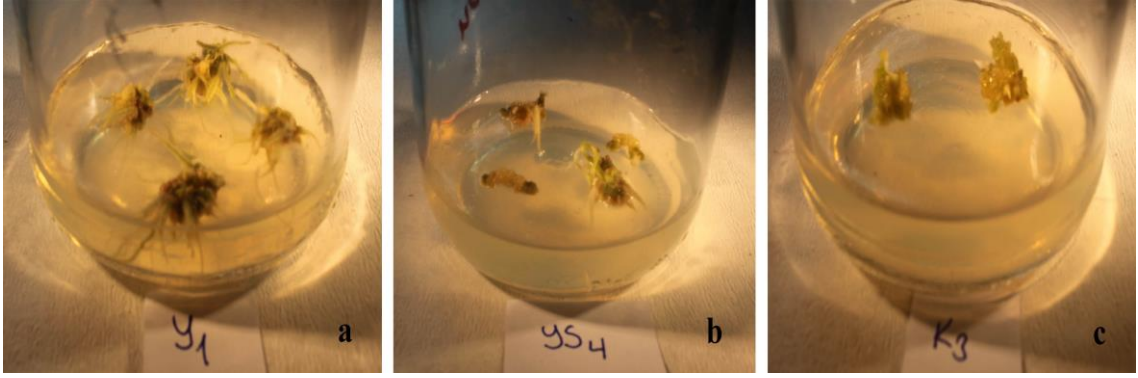
**Şekil 4.6.** 1 mg/L BAP+2 mg/L NAA içeren MS ortamları eksplantların gelişimleri **a.** Yaprak **b.** Yaprak Sapı **c.** Kotiledon.



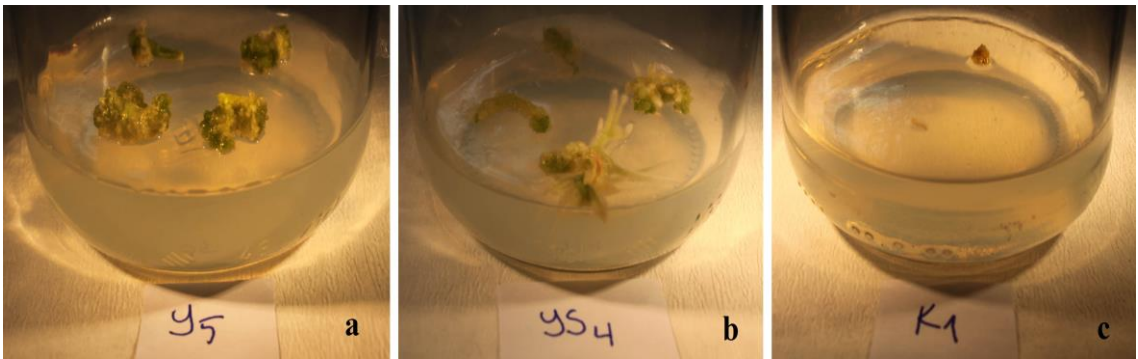
**Şekil 4.7.** 2 mg/L BAP+0,5 mg/L NAA içeren MS ortamları eksplantların gelişimleri **a.** Yaprak **b.** Yaprak Sapı **c.** Kotiledon.



**Şekil 4.8.** 2 mg/L BAP+1 mg/L NAA içeren MS ortamları eksplantların gelişimleri **a.**Yaprak **b.** Yaprak Sapı **c.** Kotiledon.



**Şekil 4.9.** 2 mg/L BAP+1,5 mg/L NAA içeren MS ortamları eksplantların gelişimleri **a.** Yaprak **b.** Yaprak Sapı **c.** Kotiledon.



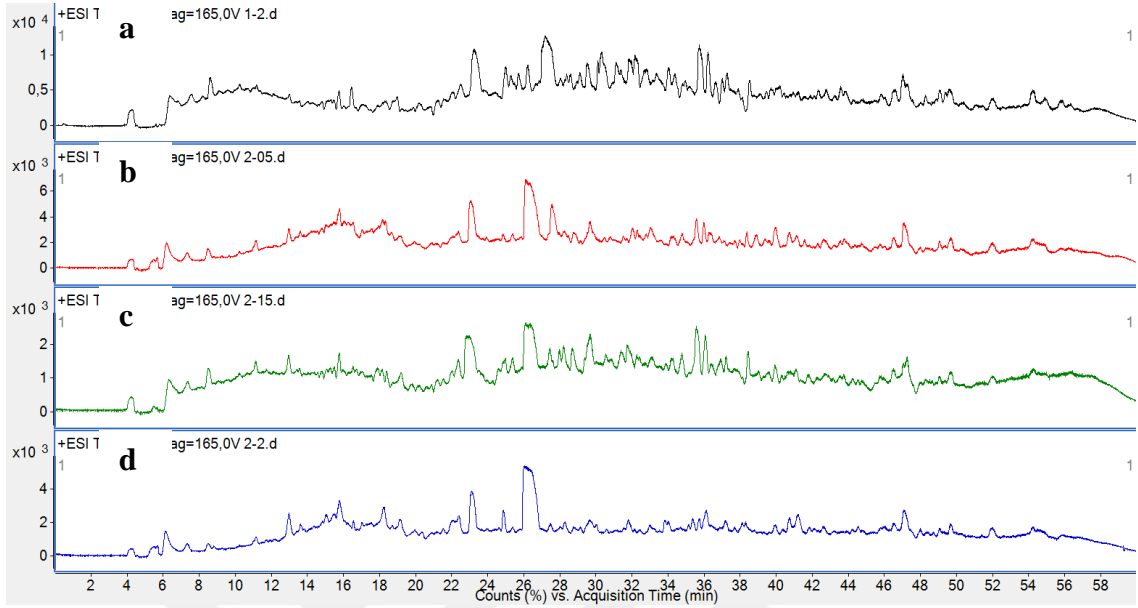
**Şekil 4.10.** 2 mg/L BAP+2 mg/L NAA içeren MS ortamları eksplantların gelişimleri **a.** Yaprak **b.** Yaprak Sapı **c.** Kotiledon.

**Çizelge 4.1.** Uygulanan bitki büyüme düzenleyicilerin eksplantlara etkisi.

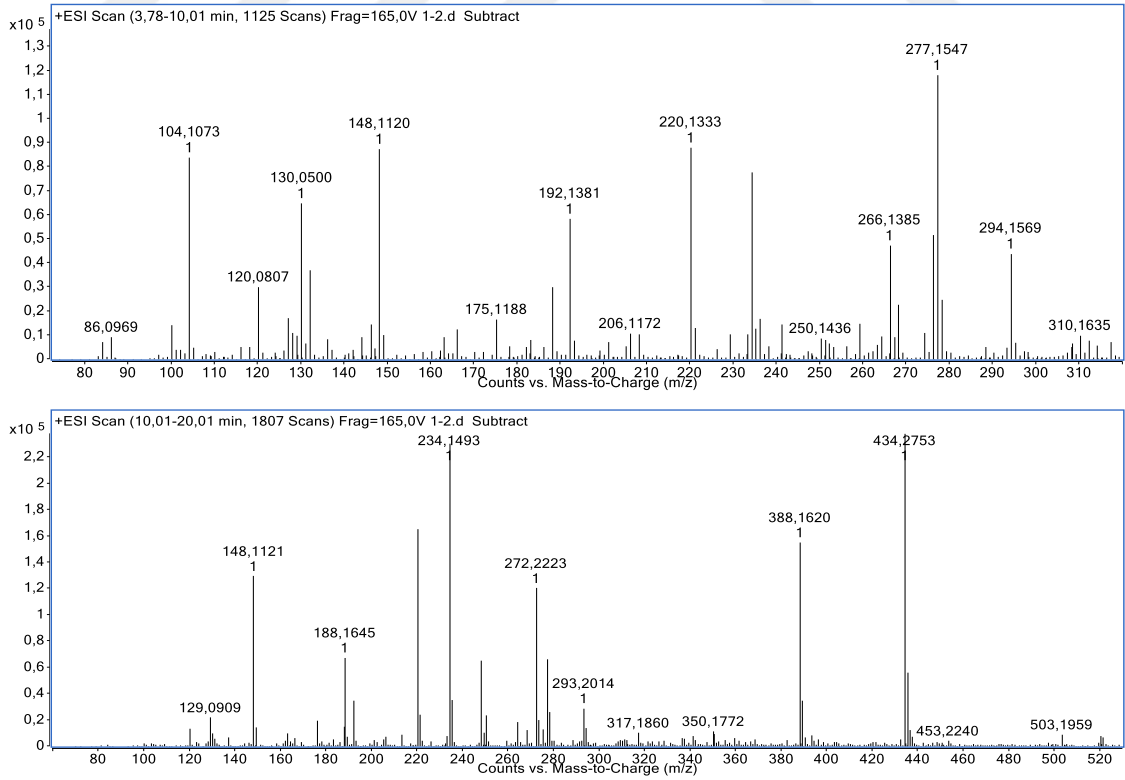
Bitki büyüme düzenleyici		YAPRAK			YAPRAK SAPI			KOTİLEDON		
BAP	NAA	%Kök oluşum	%Kallus	%Respons	%Kök oluşumu	% Kallus	%Respons	%Kök oluşumu	%Kallus	%Respons
1 mg/L	0,5 mg/L	100	100	100	93	100	88	75	100	50
1 mg/L	1 mg/L	100	100	100	93	100	100	100	100	75
1 mg/L	1,5 mg/L	100	100	91	93	100	88	100	100	63
1 mg/L	2 mg/L	100	100	63	100	100	50	88	100	100
2 mg/L	0,5 mg/L	100	100	50	100	100	50	-*	-*	-*
2 mg/L	1 mg/L	100	100	88	75	100	50	67	67	75
2 mg/L	1,5 mg/L	95	100	65	81	100	69	75	100	66
2 mg/L	2 mg/L	100	100	72	77	100	81	0	100	37

\* Kontaminasyon nedeni ile veri elde edilememiştir.

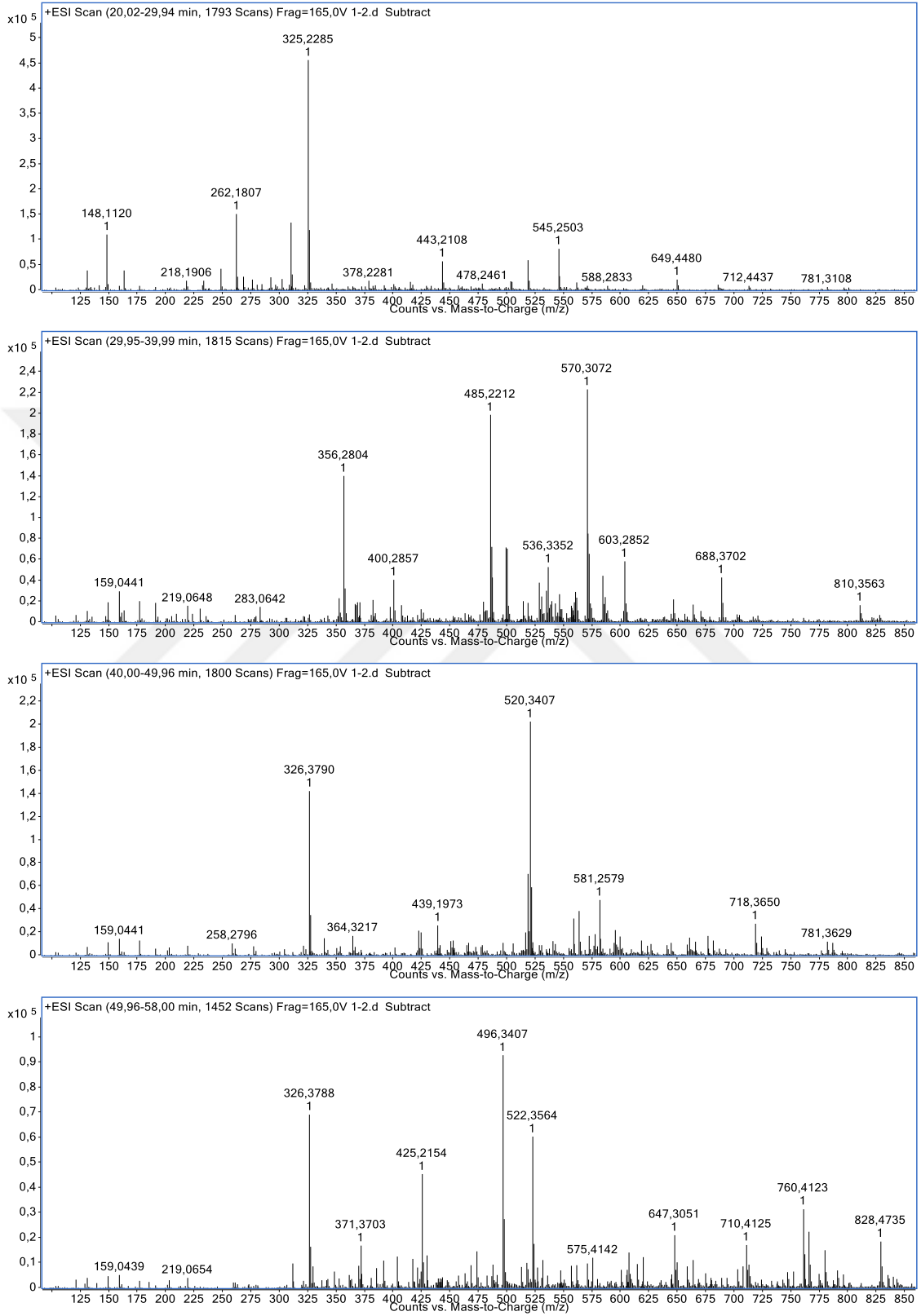
Kültür işlemleri ile elde edilen köklerin LC MS analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda *in vitro* kök kültürü yöntemi ile yetiştirilen *V. officinalis* L. bitkilerinin ekstrelerindeki benzer ve farklı metabolitler belirlenmiştir; Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil. 4.15' te örneklere ait kütle dataları verilmiştir.



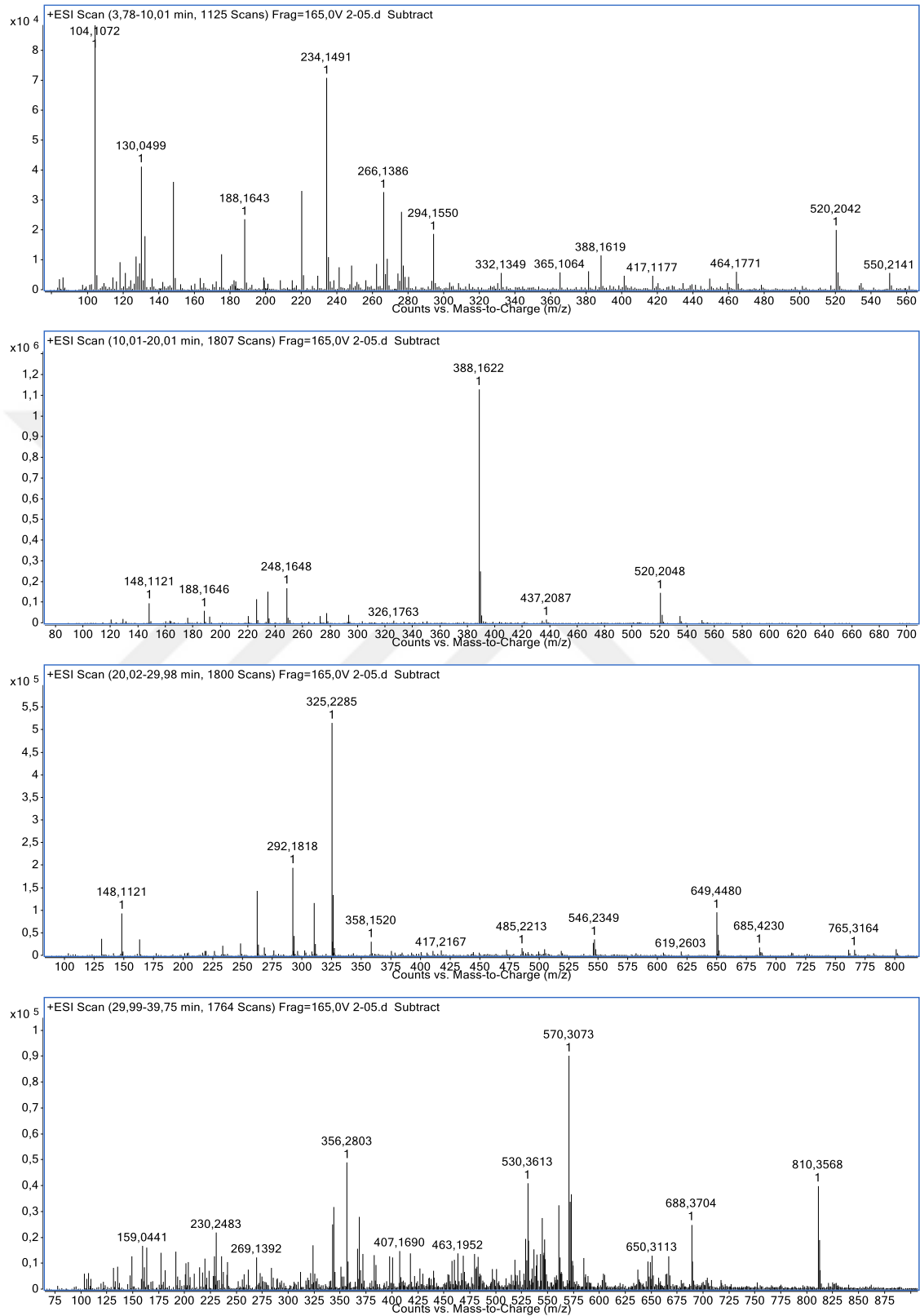
**Şekil 4.11.** a. 1 mg/L BAP+2 mg/L NAA b. 2 mg/L BAP+0,5 mg/L NAA c. 2 mg/L BAP+1,5 mg/L NAA d. 2 mg/L BAP+2 mg/L NAA ait toplam iyon kromatogramları (TIC).



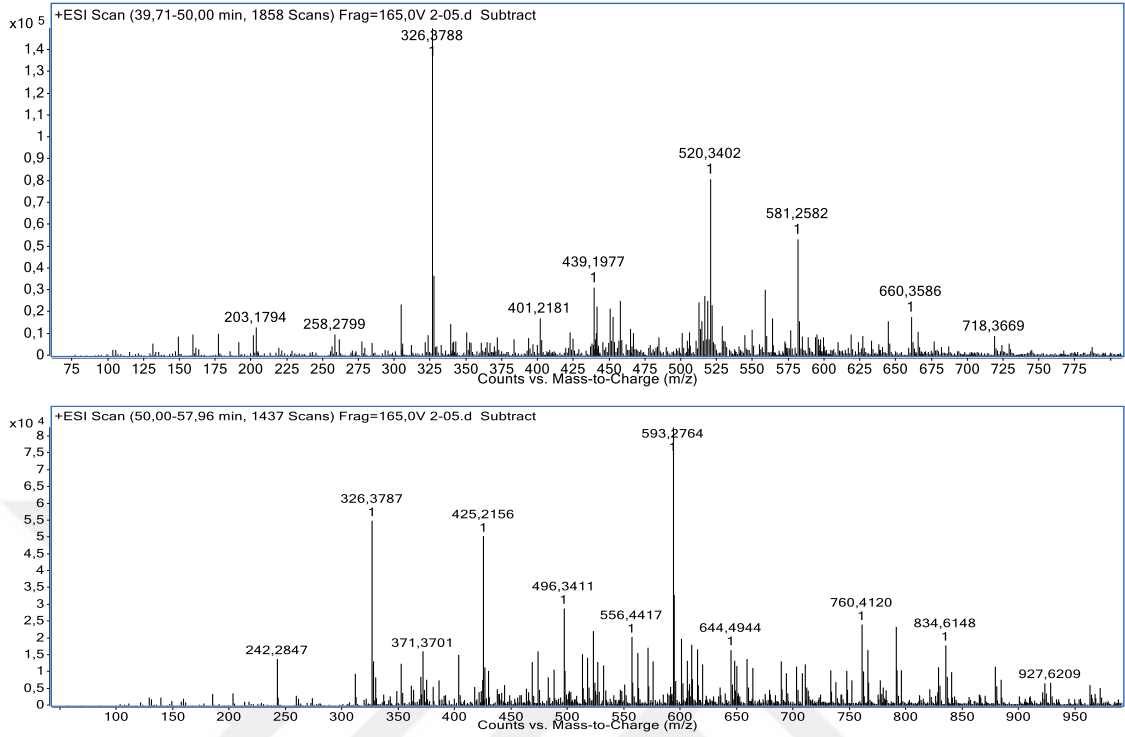
**Şekil 4.12.** 1 mg/L BAP+2 mg/L NAA ait kütle dataları.



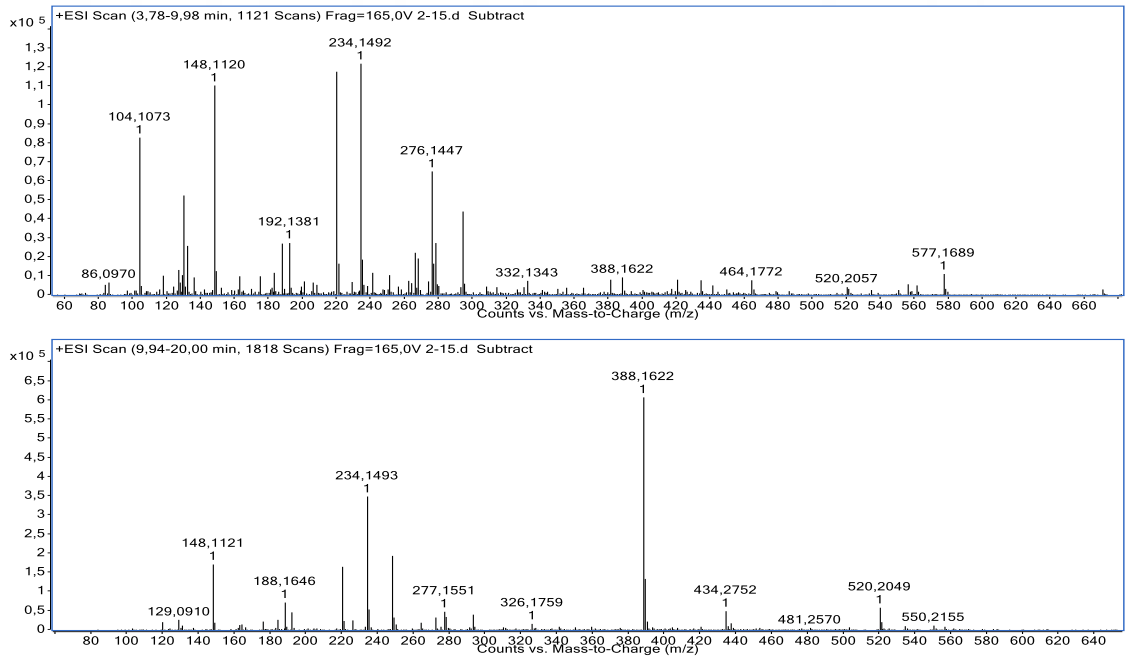
Şekil 4.12. (devam) 1 mg/L BAP+2 mg/L NAA ait kütle dataları.



Şekil 4.13. 2 mg/L BAP+0,5 mg/L NAA ait kütle dataları.

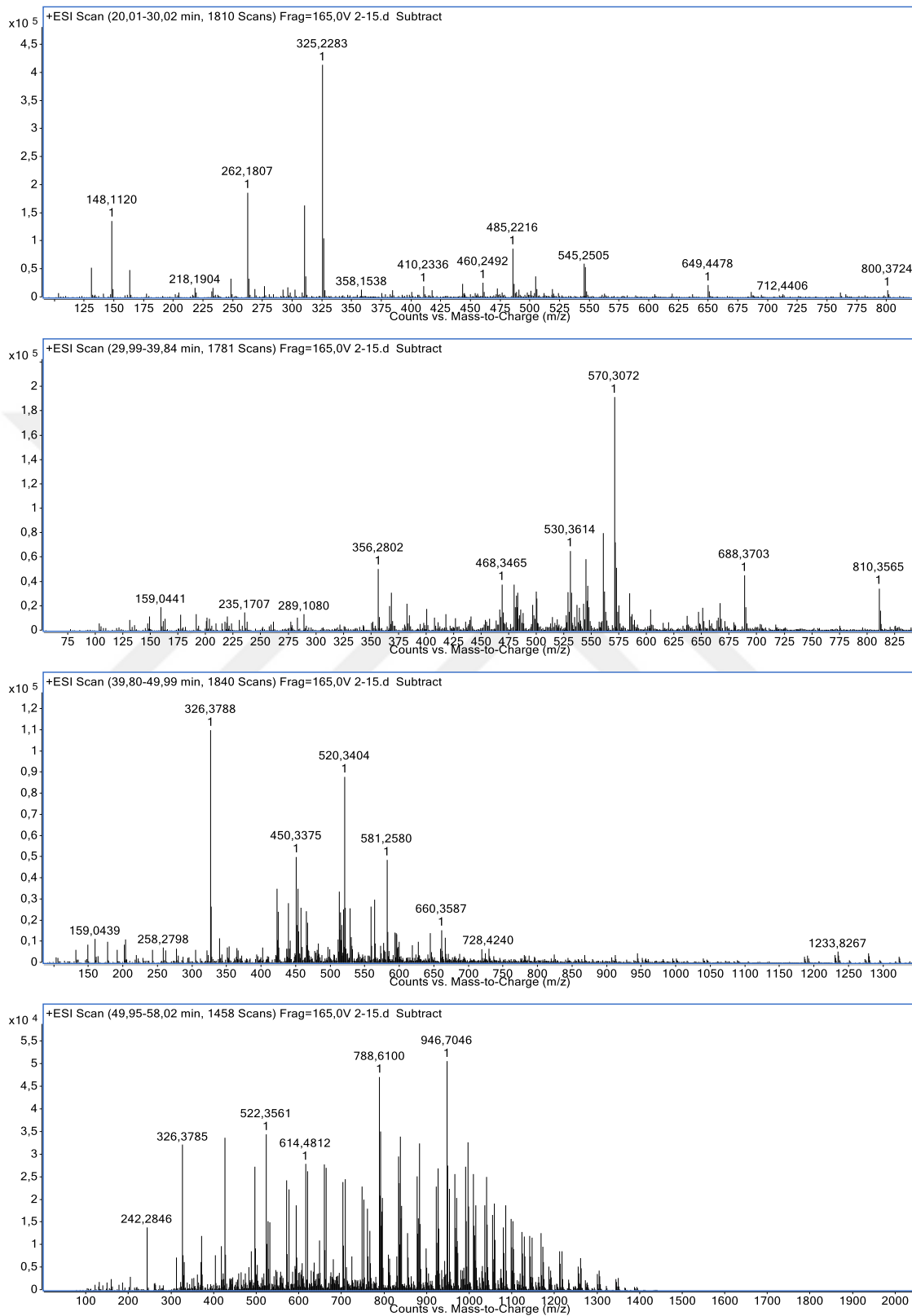


**Şekil 4.13.** (devam) 2 mg/L BAP+0,5 mg/L NAA ait kütle dataları.

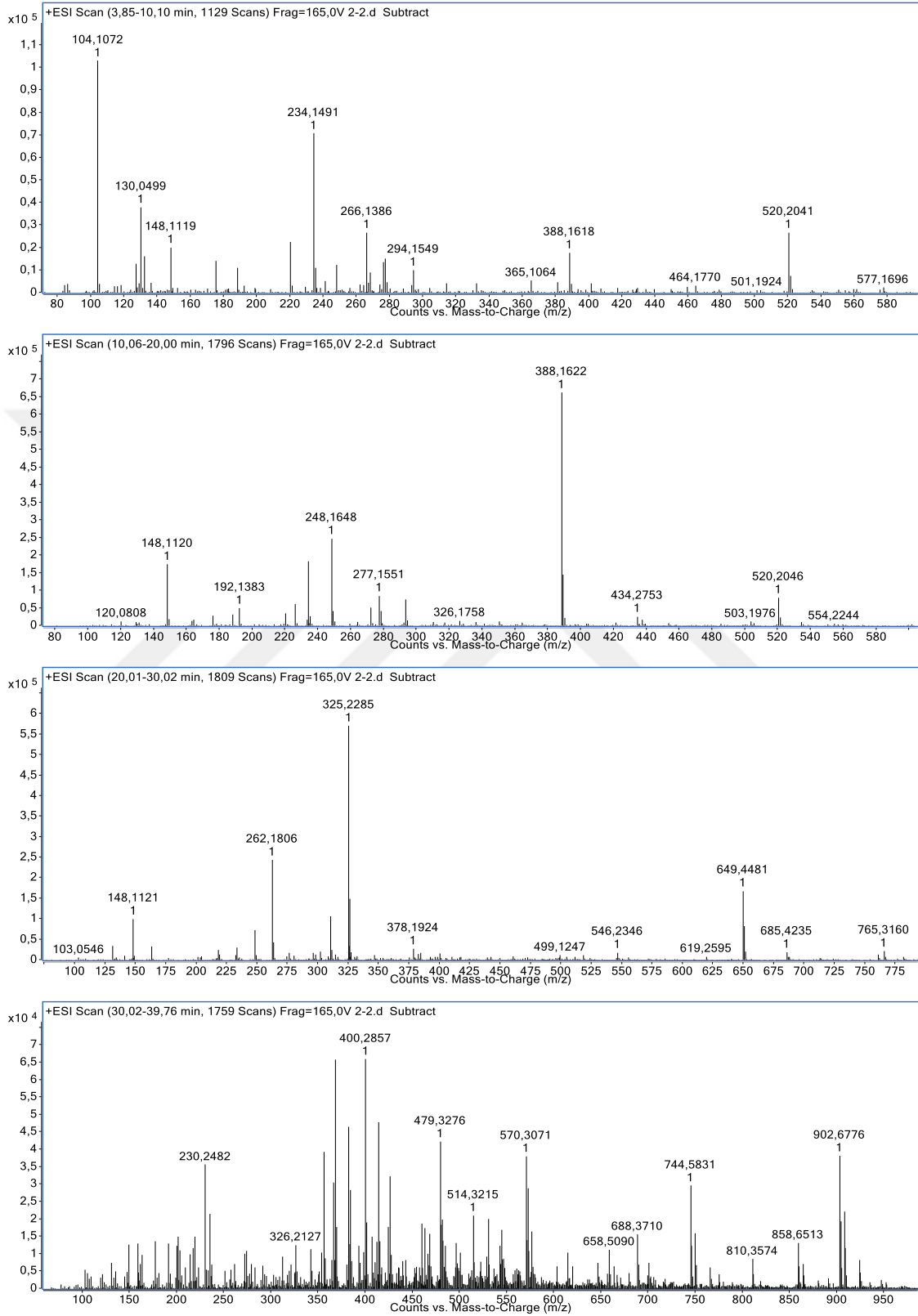


**Şekil 4.14.** 2 mg/L BAP+1,5 mg/L NAA ait kütle dataları.

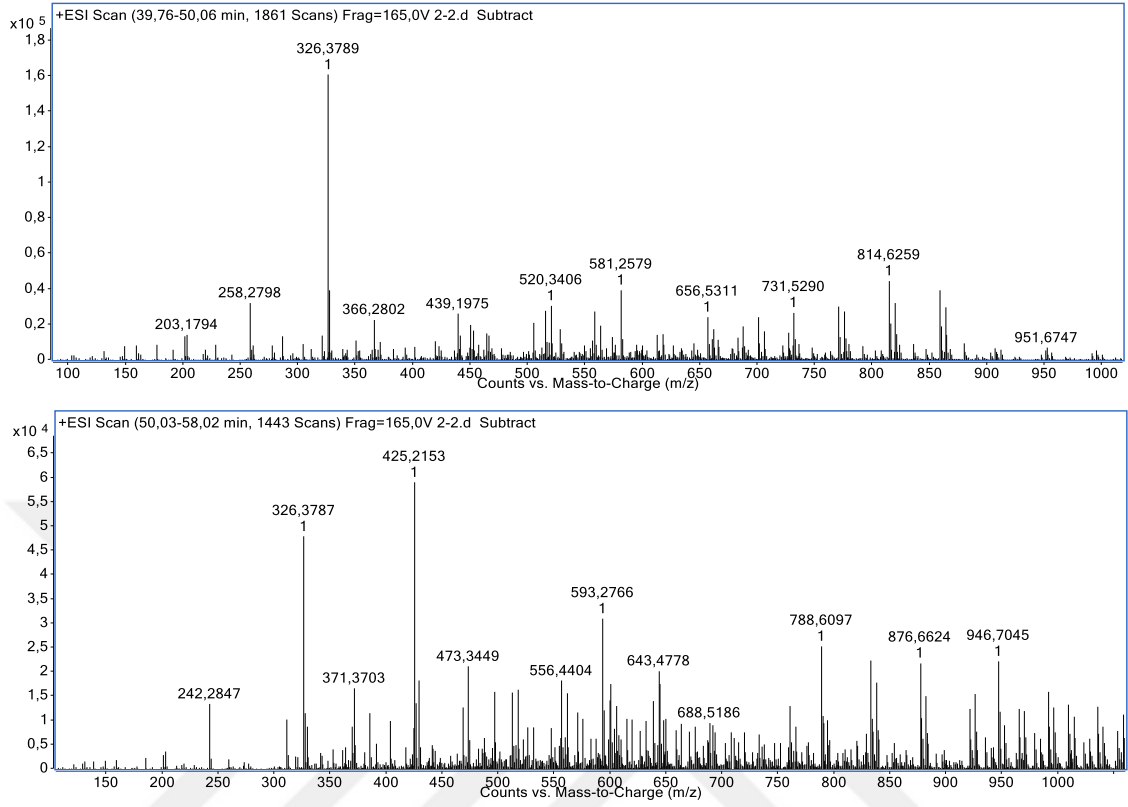




Şekil 4.14. (devam) 2 mg/L BAP+1,5 mg/L NAA ait kütle dataları.



Şekil 4.15. 2 mg/L BAP+2 mg/L NAA ait kütle dataları.



Şekil 4.15. (devam) 2 mg/L BAP+2 mg/L NAA ait kütle dataları.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

*V. officinalis*'in klasik kültür yöntemleri ile üretimi sırasında görülen, düşük tohum canlılığı, kök ve rizomlarındaki yüksek hastalık oranları kaliteli bitki üretimini engellemektedir (Ghaderi ve Jafari, 2014). Bu nedenle bitkinin üretiminde alternatif bir yol olan bitki doku kültürü tekniklerinin kullanımı amaçlanmıştır.

Doku kültürü uygulamalarında kullanılacak eksplantların kültür işlemleri öncesinde steril edilmesi gerekir. Aksi takdirde bu mikroorganizmalar hızla çoğalarak bitki dokularının beslenmesini engelleyebilir ya da sentezledikleri metabolitler ile dokulara toksik etki gösterebilirler. Sterilizasyon işlemleri için kullanılacak dezenfektanlar bitki türü, dokusu ve eksplant tipine göre değişiklik gösterir (Oo vd., 2018). Bu çalışmada sterilant olarak birçok araştırmacı tarafından da tercih edilen NaOCl kullanılmıştır (Bae vd., 2013; Younesikelaki vd., 2016; Hesami vd., 2017).

Doku kültüründe yetişen bitkilerden dış ortamdan alınan eksplantlara göre daha kolay ve hızlı rejenerasyon olmaktadır (Kocacalışkan, 2017: 38). Bu nedenle steril eksplantların elde edilmesinde *in vitro* koşullarda tohumların çimlendirilmesi amaçlanmıştır. Tohumların %70'lik ethanolde 3 dk, %10'luk sodyum hipokloritte 5 dk ve 3 seri saf suda 3'er dk bekletilerek sterilizasyonu sağlanmıştır. Yapılan işlemler sonucunda çimlenme oranı %39 olarak elde edilmiştir. Torkamani ve ark. (2013) tarafından *V. officinalis* bitkisinin çimlenme yüzdesinin düşük olduğu bildirilmiştir, herhangi bir bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamda elde ettikleri %34 çimlenme oranı, tez çalışması sonucunda elde edilen orana yakındır. Bhat ve Sharma (2015) çalışmalarında *V. officinalis* tohumlarını civa klorür ile steril etmişler, tez çalışma sonuçlarından daha düşük olarak %15 olarak belirlemişlerdir. Tez çalışması sırasında oksin ve sitokin bitki büyüme düzenleyicilerin etkilerinin araştırılması planlanmış, çimlenme oranını arttırmak için herhangi bir domansi kırıcı ya da yüksek konsantrasyon ve uzun süreli sterilizasyon prosedürü uygulanmamıştır.

Bitki doku kültürü çalışmaları hormonların keşiflerinden sonra hızla gelişmeler göstermiştir. Sentetik bitki büyüme düzenleyicilerin keşifleri ve bitki doku kültürü uygulamalarında kullanımları bitkilerin rejenerasyon yeteneklerinin araştırılması için çok sayıda çalışmanın yapılmasını olanaklı kılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerden oksinler NAA (Naftalen asetik asit), sitokinler BAP (Benzil amino purin) organogenez çalışmaları için kullanılmaktadır (Rocha vd., 2015; Xu, 2018). Yapılan birçok çalışma sonucunda mikroçoğaltım çalışmalarında gözlenen organogenezin eksplanta bağlı olarak değişiklik gösterebildiğini ve bunun sebebinin eksplantlarda bulunan bitki büyüme düzenleyicilerinin tipi

veya konsantrasyonu olduğu bildirilmiştir (Perera vd., 2015; Hayta vd., 2017; Sultana vd., 2018). Tez çalışmasında oksin ve sitokinin bitki büyüme düzenleyicilerin yaprak, yaprak sapı ve kotiledon eksplantları üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Yaprak eksplantlarının kültür koşullarına yaprak sapı ve kotiledon eksplantlarından çok daha iyi cevap verdikleri gözlemlenmiştir. Özellikle çalışmada kullanılan 5 haftalık bitkiciklerden elde edilen kotiledon eksplantlarının uygulamalardan kısa süre sonra sarardıkları, gelişim göstermedikleri belirlenmiştir. Uygulanan BAP konsantrasyonu artışıyla ilgili olarak eksplantlarda kök oluşumlarının azaldığı tespit edilmiştir. En iyi kök oluşum ve gelişimleri yaprak eksplantlarından elde edilmiştir. Uygulanan BAP ve NAA konsantrasyonları sürgün oluşumu yeterli olmamış, ancak tümünde kök oluşumunu sağlamıştır. Shiragi ve ark., (2008), Seyyedyousefi ve ark., (2013), Yanthan ve ark., (2017) çalışmalarında BAP ve NAA bitki büyüme düzenleyicileri kullanarak kök elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları tez verileri ile uyumludur.

Son yıllarda bitki doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolitlerin üretimi ile ilgili çalışmalar olumlu sonuçlar göstermeleri nedeniyle önem kazanmıştır (Bourgaud vd., 2001; Karuppusamy vd., 2009; Guerriero vd., 2018). Metabolitlerin *in vitro* koşullarda daha yüksek üretimi için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Isah vd., 2018). Tez çalışmasında elde edilen köklerdeki moleküllerin belirlenmesi LC-MS analizi ile yapılmıştır. Analizler sonucunda *in vitro* üretilen köklerdeki benzer ve farklı metabolitler belirlenmiştir. Çalışma *in vitro* doku kültürü yöntemi ile üretilen *Valeriana officinalis* L. bitkilerinin metabolit içeriklerinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Yapılan tez çalışması sonucunda *V. officinalis* bitki köklerinin üretiminde bitki doku kültürü yöntemlerinin alternatif ve etkili bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Bu amaçla bitkinin yaprak eksplantlarının BAP ve NAA içeren MS besin ortamında kültüre alınması sonucu tıbbi ve ekonomik açıdan önemli olan adventif köklerin üretiminin mümkün olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında sıvı kök kültürü çalışmalarına devam edilmesi planlanmaktadır.

Tez verileri ileride yapılabilecek sıvı kültür ve biyoreaktör çalışmalarına ışık tutmaktadır. Bitki doku kültürü yöntemleri tıbbi ve ekonomik açıdan önemli olan *V. officinalis* bitkisinin ilaç, gıda ve kozmetik sektörlerindeki ham madde ihtiyacının karşılanması için alternatif bir yoldur.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdi, G. H. ve Khosh-Khui, M. (2007). Shoot regeneration via direct organogenesis from leaf segments of Valerian (*Valeriana officinalis* L.). *International Journal of Agricultural Research*, 2(10), 877-882.
- Ahloowalia, B. S., Prakash, J., Savangikar, V. A., ve Savangikar, C. (2004). Plant tissue culture. Low cost options for tissue culture technology in developing countries. *International Atomic Energy Agency*, Vienna, 3-11.
- Kaya, D. A., (2006). Çukurova bölgesinde farklı sıra arası ve hasat zamanlarında kediotu (*Valeriana officinalis* L.) bitkisinin verim ve uçucu yağ kalitesinin araştırılması, Adana.
- Bae, K. H., Ko, M. S., Lee, M. H., Kim, N. Y., Song, J. M., ve Song, G. (2013). Effects of NaOCl treatment on *in vitro* germination of seeds of a rare endemic plant, *Oreorchis coreana* Finet. *Journal of Plant Biotechnology*, 40(1), 43-48, doi: <http://dx.doi.org/10.5010/JPB.2013.40.1.043>.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., ve Özcan, S. (2001). *Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kültürü ve Uygulamaları*. Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya.
- Bacanlı, M., Başaran, N., Başaran, A. A. (2012). İlaç-bitkisel ilaç kullanımının toksikolojik sonuçları. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 1(2), 83-94, doi: 10.5336/pharmsci.2014-42688.
- Başer, K.H.C. (2010). *Valeriana officinalis* L. Bağbahçe 27, 24-25.
- Bhat, B., ve Sharma, V. D. (2015). *In vitro* propagation of the Garden Heliotrope, *Valeriana officinalis* L.: Influence of pre-chilling and light on seed germination.
- Bolat, İ., ve Kara, Ö., (2017). Bitki besin elementleri: Kaynakları, işlevleri, eksik ve fazlalıkları. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 19(1), 218-228, doi: 10.24011/barofd.251313.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., ve Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3).
- Erk, N., (1959). *Tuhfetülfarisin fi ahval-i huyul el-mücahidin*. adlı kitabın ilimler tarihi yönünden incelenmesi, 504.
- Erkoyuncu, M. T., ve Yorgancılar, M. (2016). Bitki doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolitlerin üretimi. *Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi*, 2(1), 66-76.
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., ve García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1-18, doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1
- Ghaderi, N. ve Jafari, M. (2014). Efficient plant regeneration, genetic fidelity and high-level accumulation of two pharmaceutical compounds in regenerated plants of *Valeriana officinalis* L. *South African journal of botany*, 92, 19-27, doi.org/10.1016/j.sajb.2014.01.010.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

Gürel, A., Hayta, Ş., Nartop, P., Bayraktar, M. ve Fedakar, S., (2013). *Bitki Hücre, Doku ve Organ Kültürü Uygulamaları*. İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları, 58,221.

Guerriero, G., Berni, R., Muñoz-Sanchez, J., Apone, F., Abdel-Salam, E., Qahtan, A., ... & Siddiqui, K. (2018). Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. *Genes*, 9(6), 309, doi: 10.3390/genes9060309.

Hassani, S., Alipour, A., Khezri, H. D., Firouzian, A., Zeydi, A. E., Baradari, A. G., ...ve Zadeh, P. E. (2015). Can *Valeriana officinalis* root extract prevent early postoperative cognitive dysfunction after CABG surgery? A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Psychopharmacology*, 232(5), 843-850, doi: 10.1007/s00213-014-3716-x.

Hayta, S., Bayraktar, M., Baykan erel, S., ve Gurel, A. (2017). Direct plant regeneration from different explants through micropropagation and determination of secondary metabolites in the critically endangered endemic *Rhaponticoides mykalea*. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 151(1), 20-28, https://doi.org/10.1080/11263504.2015.1057267.

Hesami, M., Daneshvar, M. H., ve Lotfi-Jalalabadi, A. (2017). Effect of sodium hypochlorite on control of *in vitro* contamination and seed germination of *Ficus religiosa*. *Plant Physiology*, 7(4), 2157-2162.

<http://www.bitkisepeti.com/kediotu.htm>

[https://www.eddmaps.org/ipane/icat/jpg/uconn\\_ipane\\_valeroffic\\_04a.jpg](https://www.eddmaps.org/ipane/icat/jpg/uconn_ipane_valeroffic_04a.jpg)

Isah, T., Umar, S., Mujib, A., Sharma, M. P., Rajasekharan, P. E., Zafar, N., ve Fruk, A. (2018). Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant *in vitro* cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 132(2), 239-265.

Işık, N., (2007). Anksiyete tedavisinde kullanılan bitkisel ilaçlar üzerine yapılan çalışmalar. Ankara.

Jamwal, K., Bhattacharya, S., ve Puri, S. (2018). Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 9, 26-38, https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.12.003.

Karadağ, M. G., Türközü, D., Kapucu, D. T. (2013). Bitkiler ve ilaç etkileşimleri. *Göztepe Tıp Dergisi*, 28(4), 164-170, doi:10.5222/J.GOZTEPETRH.2013.164.

Karamanoğlu, K. ve Koyuncu, M., (1974). Türkiye *Valeriana* (Kedinin) Türleri Üzerinde Sistemik Araştırmalar, Ankara.

Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1222-1239.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

Kocaçalışkan, İ. (2017). *Bitki Doku Kültürleri Kitabı* (Organ, Doku ve Hücre) (ISBN: 978-975-8201-47-6). DPÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya.

Kurtuluş, B., (2015). Tıbbi bir bitki olan *Calendula officinalis* L.'nin *in vitro* koşullarda klonal çoğaltımı, Kütahya.

Moorteza, E. ve Joorabloo, A., (2012). Evaluation of Medical Plant Valerian (*Valeriana officinalis* L.) Essential Oil Compositions Cultivated at Garmsar Zone. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 87-88.

Murashige, T., ve Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

Nandhini, S., Narayanan, K. B., ve Ilango, K., (2018). *Valeriana officinalis*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Asian J Pharm Clin Res*, 11(1), 36-41, doi: 10.22159/ajpcr.2017.v11i1.22588.

Oliveira, J. P. S., Hakimi, O., Murgu, M., Koblitz, M. G. B., Ferreira, M. S. L., Cameron, L. C., ve Macedo, A. F. (2018). Tissue culture and metabolome investigation of a wild endangered medicinal plant using high definition mass spectrometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134(1), 153-162, <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1408-7>.

Oo, K. T., Oo, K. S., ve Mon, Y., (2018). Establishment of Efficient Surface Sterilization Protocol on Different Types of Field Grown Strawberry Explants (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Journal of Scientific and Innovative Research*, 7(3), 70-74.

Perera, D., Barnes, D. J., Baldwin, B. S., ve Reichert, N. A. (2015). Direct and indirect *in vitro* regeneration of *Miscanthus x giganteus* cultivar Freedom: effects of explant type and medium on regeneration efficiency. *In Vitro Cellular ve Developmental Biology-Plant*, 51(3), 294-302, doi: 10.1007/s11627-015-9682-0.

Rani, A., ve Kumar, S. (2017). Tissue culture as a plant production technique for medicinal plants a Review. In International Conference on Innovative Research in Science, *Technology and Management*.

Reza, A. G., Morteza, K. K., ve Akhtar, S. (2009). Rapid micropropagation through shoot regeneration of *Valeriana officinalis* L. Horticulture, *Environment and Biotechnology*, 50(5), 467-471.

Rocha, D. I., Monte-Bello, C. C., ve Dornelas, M. C. (2015). Alternative induction of de novo shoot organogenesis or somatic embryogenesis from *in vitro* cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(3), 1087-1098, doi: 10.1007/s11240-014-0663-5.

Seyyedyousefi, S. R., Kaviani, B., ve Dehkaei, N. P. (2013). The effect of different concentrations of NAA and BAP on micropropagation of *Alstroemeria*. *European Journal of Experimental Biology*, 3(5), 133-136.



Shiragi, M. H., Baque, M. A., ve Nasiruddin, K. M. (2008). Eradication of banana bunchy top virus (BBTV) and banana mosaic virus (BMV) from infected plant of banana cv. Amritasagar through meristem culture. *Stud*, 29, 17-41.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

Sultana, N. , Yesmin, I. S. S. S. M., ve Nowrin, F. (2018). *Effect of Explant Type On Direct Organogenesis of Tomato* (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

Taheri, H. ve Ghesmati, M. (2018). Enhancement of valerenic acid production in *Valeriana officinalis* roots by methyl jasmonate-mediated transcriptional changes of sesquiterpene synthase genes. *Plant Physiology*, 9(1), 2611-2617, doi: 10.5829/idosi.ajbas.2013.5.

Tanker M. ve Tanker N., (1990). *Farmakognozi*. İstanbul. 2. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları: 65

Torkamani, M. D., Abbaspour, N., ve Samadi, A. (2013). Study of Two Treatments on the Germination of *Valeriana officinalis* L. Seeds in Two Growth Media. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, 5(5), 232-236,

Torkamani, M., Jafari, M., Abbaspour, N., Heidary, R., ve Safaie, N. (2014). Enhanced production of valerenic acid in hairy root culture of *Valeriana officinalis* by elicitation. *Open Life Sciences*, 9(9), 853-863, doi: 10.2478/s11535-014-0320-3.

Tousi, E.S., Radjabian, T., Ebrahimzadeh, H. ve Niknam, V. (2012), Enhanced production of valerenic acids and valepotriates by *in vitro* cultures of *Valeriana officinalis* L. *International Journal of Plant Production*, 4(3), 209-222.

Xu, L., (2018). De novo root regeneration from leaf explants: wounding, auxin, and cell fate transition. *Current opinion in plant biology*, 41, 39-45.

Yanthan, J. S., Kehie, M., Kumaria, S., ve Tandon, P. (2017). *In vitro* regeneration of *Drosera burmannii* Vahl.: a carnivorous plant of north-east India. *3 Biotech*, 7(2), 124, doi: 10.1007/s13205-017-0777-7.

Younesikelaki, F. S., Ebrahimzadeh, M. H., Desfardi, M. K., Banala, M., Marka, R., ve Nanna, R. S. (2016). Optimization of seed surface sterilization method and *in vitro* seed germination in *Althaea officinalis* (L.)-an important medicinal herb. *Indian J. Sci. Technol*, 9, 1-6, doi: 10.17485/ijst/2016/v9i28/90896.

Yue, W., Ming, Q. L., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C. J., Han, T., ve Qin, L. P. (2016). Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 215-232, doi: 10.3109/07388551.2014.923986.

Zayova, E., Vassilevska-Ivanova, R., Petrova, M., ve Nedev, T. (2010). Micropragation of *Valeriana officinalis* through tissue culture. *Comptes Rendus de L academie bulgare des sciences*, 63(12), 1749-1756.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı: Elmas SÖNMEZ

Doğum tarihi ve yeri: 14/02/1992 - Ankara/YENİMAHALLE

e-mail: elms.snmz4@gmail.com

## Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Biyoloji	-
Lisans	Biyoloji	2015
Lise	Abidinpaşa Anadolu Lisesi	2010

## İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2015-2016	Kütahya Koleji	Öğretmen
2016- devam	MEB	Öğretmen