



T.C.

BATMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDEMİK *Ajuga vestita* BOISS. BİTKİSİNİN
FARKLI EKSPANTLARINDAN İTİBAREN
KALLUS OLUŞTURMA POTANSİYELİ VE
OLUŞAN KALLUSUN BİYOLOJİK
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Şerife (AYDINARIĞ) BULUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Nisan-2019
BATMAN
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Şerife (AYDINARIĞ) BULUŞ tarafından hazırlanan “Endemik *Ajuğa vestita* BOİSS. Bitkisinin Farklı Eksplantlarından İtibaren Kallus Oluşturma Potansiyeli ve Oluşan Kallusun Biyolojik Aktivitesinin Araştırılması” adlı tez çalışması 05/04/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Doç.Dr. Çiğdem IŞIKALAN

Danışman

Doç.Dr. Filiz AKBAŞ

Üye

Doç.Dr. Nesrin HAŞİMİ

İmza

.....

.....

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Doc. Dr. Bahattin IŞCAN
FBE Müdürü



TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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



Şerife (AYDINARIĞ) BULUŞ

05.04.2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENDEMİK *Ajuga vestita* BOISS. BİTKİSİNİN FARKLI EKSPLANTLARINDAN İTİBAREN KALLUS OLUŞTURMA POTANSİYELİ VE OLUŞAN KALLUSUN BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Şerife (AYDINARIĞ) BULUŞ

Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Filiz AKBAŞ

2019, 63 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Çiğdem İŞIKALAN

Doç. Dr. Filiz AKBAŞ

Doç. Dr. Nesrin HAŞİMİ

Ajuga vestita BOISS. bitkisi, tıbbi öneme sahip, endemik ve “EN-Tehlikede” kategorisinde olan *Ajuga* cinsine ait bir türdür. Bu çalışmada *Ajuga vestita* BOISS.’in *in vitro* sürgünlerinden elde edilen fidelerin farklı kısımlarından, literatür taramalarında daha önce hiç çalışılmamış olan kallus kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonu ile kallustan sürgün elde etme potansiyelinin belirlenmesi amaçlandı.

Bu amaçla öncelikle yüzey sterilizasyonu tamamlanan *Ajuga vestita* BOISS.’in olgun tohumları hormonsuz 1/4 MS besi ortamında çimlendirildi. Akselik sürgün uçları, 0.125 mg/L⁻¹ Kin içeren 1/1 MS besi yerinde çoğaltılarak kallus oluşturma çalışmalarında başlangıç materyali olarak kullanılacak *in vitro* sürgünler elde edildi.

In vitro ortamda yetiştirilen sürgünlerin yaprak, gövde, kök kısımları ve testası çatlatılmış olgun tohumlar, sitokinin (Kin, BAP) ve oksinin (2,4-D) farklı konsantrasyonlarının bulunduğu 1/1 MS besi ortamında ayrı ayrı kültüre alındı. Çalışma sonucunda, kültüre alınan tüm eksplant çeşitlerinde kallus oluşumu gözlemlendi. Ancak, tüm eksplant tiplerinde en iyi kallus oluşumunun 0.5 mg/L⁻¹ Kin+2.0 mg/L⁻¹ 2,4-D içeren besi ortamında olduğu belirlendi. Bununla birlikte, 0.5 mg/L⁻¹ Kin+2.0 mg/L⁻¹ 2,4-D besi ortamında kültüre alınan yaprak ve testası çatlatılmış tohumların kallus kültürüne en iyi cevap veren eksplant tipleri olduğu saptandı.

Kallus geliştirme ve kallustan sürgün oluşturma potansiyeli için tüm materyallerden elde edilen kalluslar, önce hormonsuz besi yerinde 4 hafta kadar bekletildi. Kök ve gövde eksplantlarında oluşan kallusların tamamıyla karardığı, buna karşın yaprak ve tohum eksplantlarının sarı ve açık yeşil renkte kallus oluşturduğu gözlemlendi. Bu nedenle yaprak ve tohum eksplantlarından elde edilen kalluslar sürgün elde etme çalışmalarında kullanılmak üzere, BAP ve Kin’in farklı konsantrasyonlarını (0.125, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mg/L⁻¹) ayrı ayrı içeren 1/1 MS besi ortamlarında kültüre alındı. 0.125 ve 0.5 mg/L⁻¹ BAP içeren besi ortamlarında kültüre alındıktan 5 hafta sonra sürgün oluşumu görüldü. 4.0-10.0 mg/L⁻¹ BAP içeren besi ortamında ve Kin konsantrasyonlarının çoğunda oluşan kalluslarda ise kök oluşumu tespit edildi.

Çalışmamızda, BAP ve Kin’in farklı konsantrasyonlarından elde edilen kallusların toplam fenolik ve flavonoid miktarları gallik asit ve kersetine eş değer olarak belirlendi. Aseton ekstresinin fenolik ve flavonoid miktarının metanol ekstresinden daha fazla olduğu tespit edildi.

Bununla birlikte, DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemi kullanılarak kalluslardan hazırlanan aseton ve metanol ekstreslerinin total antioksidan aktivite tayini gerçekleştirildi. En yüksek antioksidan aktivite %88.91 inhibisyon ile 500 µg/L⁻¹ konsantrasyonundaki metanol ekstresinde tespit

edildi. 250 ve 500 $\mu\text{g}/\text{L}^{-1}$ konsantrasyonundaki aseton ve metanol ekstralarının aynı konsantrasyonlardaki pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'den daha yüksek etkiye sahip oldukları tespit edildi.

Anahtar Kelime: *Ajuga vestita* BOISS., endemik, kallus, total fenol, total flavonoid, DPPH



ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION of CALLUS INDUCTION from DIFFERENT EXPLANT of ENDEMIC *Ajuga vestita* BOISS. and BIOLOGICAL ACTIVITE of CALLUS

Şerife (AYDINARIĞ) BULUŞ

THE GRADUATE SCHOOL of NATURAL and APPLIED SCIENCE of
BATMAN UNIVERSITY
THE DEGREE of MASTER of SCIENCE of BIOLOGY

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Filiz AKBAŞ

2019, 63 Page

Jury

Doç. Dr. Çiğdem IŞIKALAN

Doç. Dr. Filiz AKBAŞ

Doç. Dr. Nesrin HAŞİMİ

Ajuga vestita BOISS. is a species of genus *Ajuga* which is medical importance, endemic and in the category of 'EN-dangered'. In this study which have not been studied before in literature, it was aimed to determine the potential of shoots regeneration from callus by establishment and optimization of callus cultures from different explants of *in vitro* shoots of *Ajuga vestita* BOISS.

For this purpose; firstly surface- sterilized seeds of *Ajuga vestita* BOISS. were germinated in a hormone-free 1/4 MS medium. Axenic shoots tips were propagated in MS medium supplemented with 0,125 mg/L⁻¹ Kin and obtained *in vitro* shoots were used as a starting materials for callus initiation studies.

The leaves, stem and roots of *in vitro* shoots, and broken seeds were cultured in 1/1 MS medium containing differents concentrations of cytokinin (Kin, BAP) and oxin (2,4-D). As a result; callus formation was observed in the hormone combinations tested for all of explants types.

However; it was determined that the best callus formation was MS medium supplemented with 0,5 mg/L⁻¹ Kin+2.0 mg/L⁻¹ 2,4-D in all explants. However, leaf and broken seeds cultured in 0.5 mg/L⁻¹ Kin+2.0 mg/L⁻¹ 2,4-D medium were found to have the best response to callus culture.

The callus obtained from all explants were cultured in the hormone-free MS medium (4 week) to development of callus and shoot regeneration from callus. It was observed that the callus formed in root and internod explants completely darkened, where as leaf and seed explants were create yellow and light green callus. For this reason, the callus obtained from leaf and seed explants were cultured in MS medium containing different concentrations of BAP and Kin (0.125, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mg/L⁻¹) for shoot regeneration studies.

Shoot formations was occurred in MS medium supplemented with 0.125 ve 0.5 mg/L⁻¹ BAP 5 weeks after culturing. In 4.0-10.0 mg/L⁻¹ BAP containing medium and in most of the Kin treatments, root formation was detected in the callus.

In addition, the total phenolic and flavonid contents of the callus obtained from different concentrations of BAP and Kin were determined as equivalent to gallic acid and quercetin respectively. The total phenolic and flavonoid content of acetone extract was higher then methanol extract.

However, total antioxidant activity of acetone and methanol extracts prepared from callus was determined by using DPPH free radical activity method. The highest antioxidant activity was detected in

the methanol extract at a concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{L}^{-1}$ with 88.91% inhibition. Acetone and methanol extracts at a concentration of 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{L}^{-1}$ were found to have a higher effect than BHT which is used as positive control at the same concentrations.

Keywords: *Ajuga vestita* BOISS., endemic, callus, total phenolic, total flavonoid, DPPH



ÖNSÖZ

Tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle yanımda olan danışman hocam sayın Doç. Dr. Filiz AKBAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar aşamalarında ve tezin hazırlanmasında, yardımlarını esirgemeyen Batman Üniversitesi Biyoloji Bölümü Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Selçuk KURU ve Araştırma Görevlisi Dr. Pınar ORCAN hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu güne kadar her zaman yanımda olan beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, desteklerini benden esirgemeyen aileme, ablalarım, yengem Aysun ve abim Murat AYDINARIĞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatın zorluklarını, bütün olumsuzluklarını ve yükünü üzerimden alan hayat arkadaşım Yaser BULUŞ ve varlığıyla huzur, neşe veren biricik kızım Narin Erva BULUŞ'a teşekkürlerin en büyüğünü sunarım.

Şerife (AYDINARIĞ) BULUŞ
BATMAN-2019



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
ÖNSÖZ.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1. Bitkisel Materyal.....	13
3.2. Yöntem.....	14
3.2.1. <i>İn vitro</i> kültür ön hazırlık aşamaları.....	14
3.2.1.1. Sterilizasyon işlemleri.....	14
3.2.1.2. Besi ortamlarının hazırlanması ve sterilizasyonu	14
3.3. Kültür Başlatma Çalışmaları	16
3.4. Kallus Oluşturma Çalışmaları	17
3.5. Kallus Geliştirme Çalışmaları	20
3.6. Toplam Fenolik Miktar Tayini	20
3.7. Toplam Flavonoid Miktar Tayini	21
3.8. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi.....	22
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	23
4.1. Kallus Oluşturma Çalışmaları	23
4.1.1. Tohum eksplantında kallus oluşumu	23
4.1.2. Yaprak eksplantında kallus oluşumu	25
4.1.3. Kök eksplantında kallus oluşumu	28
4.1.4. Gövde eksplantında kallus oluşumu	31
4.2. Kallus Geliştirme Çalışmaları	32
4.3. Oluşan Kallusların Toplam Fenolik ve Flavonoid Miktarı	37
4.4. Oluşan Kallusların DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi	37

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	52



SİMGELER VE KISALTMALAR

Kin	:	Kinetin
2-IP	:	Dimetil allil aminopurin
atm	:	Atmosfer
2,4-D	:	2,4-diklorofenoksi asetik asit
BA	:	6-Benziladenin
BAP	:	Benzil amino pürin
N6	:	Nutrient medium
BBD	:	Bitki büyüme düzenleyicisi
nm	:	Nanometre
CaCl ₂ .2H ₂ O	:	Kalsiyum klorür dihidrat
cm	:	Santimetre
NH ₄ NO ₃	:	Amonyum nitrat
dk	:	Dakika
FeSO ₄ .7H ₂ O	:	Demir sülfat heptahidrat
IBA	:	Indol-3-butirik Asit
g	:	Gram
NaOH	:	Sodyum hidroksit
GA3	:	Giberellik asit
IAA	:	Indol asetik asit
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	:	Sodyum molibdat dihidrat
GA7	:	Magenta kabı
Na ₂ EDTA	:	Sodyum etilen daimin tetra asetik asit
NaOCl	:	Sodyum hipoklorit
HCl	:	Hidroklorik asit
NAA	:	Naftalen asetik asit
MS	:	Murashige & Skoog
KNO ₃	:	Potasyum nitrat
MnSO ₄ .4H ₂ O	:	Magnezyum sülfat tetrahidrat
H ₃ BO ₃	:	Borik asit
mm	:	Milimetre
mM	:	Milimolar
Kg	:	Kilogram
ml	:	Mililitre
KI	:	Potasyum iyodür
mg	:	Miligram
L	:	Litre
MgSO ₄ .7H ₂ O	:	Magnezyum sülfat heptahidrat
M	:	Molarite
KH ₂ PO ₄	:	Potasyum dihidrojen fosfat

1. GİRİŞ

İlman iklim kuşağı içerisinde bulunan ülkemiz, endemik bitkiler açısından dünyanın en zengin ülkelerinden biridir. Çiçekli bitki ve eğreltilerde 3022'yi bulan endemik tür sayısı; alttür, varyete ve hibritlerle birlikte bu sayı 3403'e yükselir. Başka bir deyişle Türkiye'de doğal olarak yetişen yaklaşık 12.000 bitki türünün dörtte biri endemiktir. İlman iklim kuşağında, Türkiye'den başka hiçbir ülkede bu endemizm oranı görülmez. Örneğin bu kuşakta yer alan İran'da endemizm oranı %17.5 İtalya'da %12.7 Fas'ta ise %17'dir (Özhatay ve ark., 2005).

Endemik türler, yaşama alanlarına özgü, hassas, nadir bulunabilmesi muhtemel ve korunma gereği duyulan türler olup çeşitli faktörler endemik bitki yaşamını tehdit etmektedir (Erdoğan, 2010). Ayrıca nadir veya lokal endemik türler yaygın türlerden daha az genetik çeşitliliğe sahiptirler. Bu nedenle çevre koşullarındaki değişimlere duyarlı olup; bu koşulların değişmesi durumunda daha fazla yok olma tehlikesiyle karşı karşıyadırlar (Primarck, 1993). IUCN 2001 kriterlerine göre endemik türlerimizin yaklaşık 600 kadarı "Çok tehlikede CR", 700 kadarı da "Tehlikede EN" kategorisinde yer almaktadır (Anonim, 2007). Bu nedenle koruma ve çoğaltma yöntemleri ile ilgili çalışmalar daha fazla önem kazanmaktadır.

Ajuga cinsi, dünyada 300'ün üzerinde taksonu bulunan Lamiaceae familyasına ait bir cinstir. Bu cinsin ülkemizde, 23 taksonu (12 tür, 9 alttür, 2 varyete) bulunmaktadır (Haşimi, 2012). Tek yada çok yıllık otsu bitkiler olan Ajuga üyeleri genellikle Avrupa Asya ve Afrika'da dağılış göstermektedirler. Çift dudaklı, mavi, mor ve sarı renkte çiçekleri olan bitki 5-50 cm uzunluğa sahiptir (İsraili ve Lyoussi, 2009). Üst dudak (galea) belirsiz ve iki loblu, alt dudak (labellum) ise 3 lobludur; ikisi yanlarda, küçük biri ortada ve büyüktür. Nutlet genellikle 4 tanedir, yüzeyi çukurcuklu veya enine buruşuktur. Taban yaprakları var veya yoktur. Gövde yaprakları tam kenarlı, dişli veya üç dişliye kadar değişen şekillerdedir. Brakteler gövde yapraklarına benzer veya farklılaşmışlardır. Demetler 2-6 çiçeklidir. Kaliks aktinomorfudur. Korolla kısa veya uzun, tabanında genellikle yüzüklü bir tüpe sahiptir, tüp uçta iki dudaklı bir yapı ile sonlanır (Davis, 1982).

Ajuga cinsinin farmakolojik ve tıbbi önemi ile ilgili yapılan çalışmalarda, eski yıllardan güümüze kadar özellikle birkaç türü geleneksel yöntemlerle birçok amaçta kullanılmıştır. Özellikle idrar arttırma, kuvvet verme, terletme, yara iyileştirme zehirli akrep ve yılan sokmalarında panzehir amaçlı yararlanıldığı vurgulanmıştır (Tekeli, 2006). Yapılan etnofarmakolojik çalışmalarda Ajuga türlerinin Afrika ve Asya'da ateş,

diş ağrısı, dizanteri, yüksek tansiyon, diyabet ve hipertansiyon gibi bazı hastalıklarda geleneksel tedavi amacıyla kullanıldığı belirtilmiştir (Baytop, 1984; Aliotta ve Pollio, 1994).

Bu bitkiler, yapısında fenol grubu (aromatik halkasında işlevsel bir hidroksil grup içeren kimyasallar) taşıyan çok çeşitli sekonder ürünler üretirler. Bu kimyasallar fenolik bileşikler olarak sınıflandırılırlar. Kimyasal çeşitliliklerine uyacak şekilde, fenolikler bitkilerde çok farklı roller üstlenirler. Bu bileşiklerin çoğu herbivor ve patojenlere karşı savunma bileşikleri olarak, diğerleri ise mekanik destek veren, polen ve meyve dağılımını sağlayan, canlıları çeken veya aynı ortamda yetişen rakip bitkilerin büyümesini azaltan işlevleri bulunmaktadır. Bitkilerde renkli pigmentler karotenoidler ve flavonoidler olmak üzere iki ana grupta toplanırlar. Karotenoidler, sarı, turuncu ve kırmızı rengi veren terpen yapıda bileşikler olup fotosentezde yardımcı pigmentler olarak iş görürler. Flavonoidler ise çok çeşitli, renk verici kimyasalları içeren ve çeşitli bitkisel kökenli ürünlerde bulunan fenolik bileşiklerdir. Flavonoidlerin en önemli etkilerinden biri serbest oksijen radikallerine karşı koruma sağlamalarıdır. Çeşitli flavonoid türleri, pigment oluşumu ve savunmada dahil, bitkilerde çok farklı işlevleri yerine getirmektedirler. Yapılan *in vitro* çalışmalar flavonoidlerin anti-inflamatuvar, anti-alerjik, anti-viral, anti-mutajenik ve anti-kanserojenik etkilerine sahip olduğunu göstermektedir (Tshikalange ve ark., 2005; Cimanga ve ark., 2006; Kuete ve ark., 2008; Gulluce ve ark., 2010).

Oksidasyonu başlangıç ya/yada gelişme basamağında engelleyen yada geciktiren maddeler olan antioksidanlar doğal ve sentetik olarak ikiye ayrılırlar. Sentetik olanlar arasında bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), troloks, propil galat (PG), tersiyer bütül hidrokinon (TBHQ) yer almaktadır (Mavi, 2005). Genellikle bitkilerde doğal olarak oluşan antioksidanlar ise glutatyon, karotenoidler, flavonoidler, fenoller ve vitaminlerdir (Larson, 1988).

Ajuga cinsine ait türlerin kimyasal içeriğiyle ilgili pek çok çalışma yapılmış ve flavonoid, trigliserid, uçucu yağ fitosteroid, diterpen gibi biyolojik, tıbbi ve farmakolojik özelliğe sahip bileşik izole edilmiştir (Kökdil ve ark., 2002; Castro ve ark., 2008; Israili ve Lyoussi., 2009; Haşimi, 2012).

Son yıllarda sekonder metabolitlerin doku kültürleri yöntemleri ile üretimi üzerine akademik ve ticari ilgi artmıştır. Özellikle tıbbi ve aromatik bitki özütlerinin ve süspansiyon kültürü ile etken maddelerinin üretilmesi araştırmacıların önemle durduğu konulardır. Sekonder metabolitler geleneksel yöntemle elde edilebilirler, fakat bu

yöntemler bitkilerin çoğu için iklim, büyüme koşulları ve coğrafi konum gibi dezavantajlara sahiptir. *In vitro* kültür yöntemleri bu metabolitlerin doğal yollardan elde edilmesinde karşılaşılan söz konusu bu sorunların aşılmasında farklı bir alternatif sunmaktadır. Bu çalışmalarla, üretilecek bitkinin çok sayıda elde edilmesi, daha sonra bazı sekonder uygulamalar ile endüstriyel boyutta ve az maliyette üretilebilmesi amaçlanır (Güven ve Gürsul, 2014).

Ajuga bracteosa'nın *in vitro* sürgün kültürlerinde toplam fenolik ve flavanoid içeriği ile serbest radikal giderme aktivitesi incelenmiş bitkisel hormonların tıbbi önemi olan sekonder metabolit üretimi üzerine olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Ali ve ark., 2018). Ayrıca *Ajuga multiflora*'nın *in vitro* kültürlerinde yüksek tokoferol ve karotenoid içeriğinin ışık etkisiyle arttırıldığı rapor edilmiştir (Jeong ve ark., 2018).

Bitki doku kültürü, bitkilerden alınan canlı bir doku parçasını (eksplant) sentetik besi ortamında süresiz olarak yaşatma tekniğidir. Bu teknik daha az zaman, yer ve materyal kullanılarak aynı genetik karakterleri taşıyan milyonlarca bitkinin üretilmesini olanaklı kılar. (Özen ve Onay, 2013) Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır (Babaoğlu ve ark., 2002). Birçok değerli kimyasal bileşik, gerek farmasötik ve gerekse endüstriyel kullanım için, bitki doku kültürleri yoluyla *in vitro* şartlarda üretilebilirler.

Bitki doku kültürleri çalışmalarında yaygın olarak kullanılan kallus kültürü, somatik embriyogenez, indirekt organogenez, hücre süspansiyon kültür çalışmalarından özellikle sekonder metabolit üretiminde yararlanılmaktadır. Ayrıca istenilen ürünlerin mevsime bağlı kalmadan yıl boyunca üretiminde de kallus kültürlerinden faydalanılmaktadır (Aktaş ve Çölgeçen, 2017; Erdemen ve Aygün, 2016; Sökmen ve Gürel, 2001).

Kallus, bitkilerin farklı kısımlarından steril koşullar altında çoğunlukla eşit oranda oksin/sitokin kombinasyonlarını içeren besi ortamlarında oluşturulan gelen farklılaşmamış hücre topluluğudur. Kallus elde etmek için genellikle kök, kotiledon, hipokotil, yaprak ayası/damar, çiçek durumu, embriyo (olgun ve olgunlaşmamış), gövde segmentleri gibi bitki kısımları eksplant olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kallus oluşumu inkübasyon süresine, ortam sıcaklığına, fotoperiyoda göre değişmektedir. Kallus kültürlerinin mevsimsel değişimlerden etkilenmeden üretim imkanının bulunmasının yanı sıra, tehlike altındaki türlerde metabolit üretimini mümkün kılması

önemli bir avantaj sağlamaktadır (Işıksalan et al., 2011; Adıyaman Akbaş et al., 2009; Sökmen ve Gürel, 2001; Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Yağcı ve ark., 2008).

Lamiaceae familyasına ait çok yıllık otsu bir bitki olan *Ajuga vestita* 900-1200 m yükseklikte yetişmektedir. Pembe veya beyaz çiçekleri bulunan bitkinin çiçeklenme dönemi Mayıs'da başlayıp Haziran ayında son bulmaktadır. Endemik olan bitki ülkemizde sadece Güney Doğu Anadolu Bölgesi'nin Diyarbakır ve Mardin yöresinde dağılışı göstermektedir. Ancak Türkiye'deki tek beyaz çiçekli *Ajuga* türü, Mardin çevresinde yayılışı gösteren *Ajuga vestita*'dır (Haşimi, 2012; Anonim, 2013). *Ajuga vestita*'nın, endemik ve tehlike durumu, Ulusal Kırmızı Listede EN "Tehlikede" kategorisi olarak belirlenmiştir (Anonim, 2018).

Son yıllarda nadir ve tehlike altındaki bitki türlerinin koruma altına alınmasında, genotipin muhafazası ve gerektiği zaman tekrar doğaya kazandırabilmek için materyal teminini mümkün kılması gibi birçok avantaj sağladığından, *in vitro* doku kültürü tekniklerinin kullanılması yaygınlaşmıştır (Sarasan ve ark., 2006; Cenkçi ve ark., 2009). Bununla birlikte, ülkemizdeki endemik *Ajuga* türlerinin *in vitro* kültürü ve içerdikleri bileşenler üzerine yok denecek kadar az sayıda çalışma bulunmaktadır (Haşimi, 2012; Akbaş ve ark., 2015). Bu bilgiler ışığında, sunulan tez çalışmasında, tıbbi öneme sahip, endemik ve EN "Tehlikede" kategorisinde olan *Ajuga* cinsine ait, *Ajuga vestita* bitkisinin, *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlarından elde edilen fidelerin farklı kısımlarından, literatür taramalarında daha önce hiç çalışılmamış olan kallus kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonun yanı sıra kallustan sürgün elde etme potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca oluşan kallusların toplam fenolik, flavonoid ve total antioksidan aktiviteleri incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Genetik ve moleküler tekniklerin gelişimi ve destekleri ile bitki biyoteknolojisi son zamanlarda önem kazanmış ve ekonomik öneme sahip, nesli tükenme tehlikesi altında olan endemik bitki türlerinin çoğaltımı açısından en kolay, güvenilir ve verimli bir yol olmuştur (Erdoğan, 2010). Ülkemizde klasik koruma metotlarına alternatif olarak bitki biyoteknolojisi uygulamalarına 1970’li yılların ikinci yarısında başlanmıştır (Ekim ve ark., 2000). Farmakolojik özelliğe sahip olan *Ajuga* türlerine süs ve ilaç sektörü gibi birçok alanda kullanım nedeniyle talep hızlı bir şekilde artmaktadır. Bununla birlikte bu geniş kullanım alanının bir sonucu olarak doğadan aşırı toplanması bitkilerin hızla tükenmesine sebep olmaktadır. Bu tehlikeyle karşı karşıya olan *Ajuga* cinsine ait türler; *Ajuga boninsimae*, *A. bracteosa*, *A. ciliate*, *A. genevensis*, *A. incisa*, *A. makinoi*, *A. multiflora*, *A. pyramidalis*, *A. shikotanensis*, *A. reptans* ve *A. vestita*’dır (Park ve ark., 2017). Yapılan literatür taramalarında, endemik ve tehlike durumu, Ulusal Kırmızı Listede EN “Tehlikede” kategorisi olarak belirlenen *Ajuga vestita*’nın *in vitro* kallus kültürü ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle yapılan kaynak araştırmasında *Ajuga* cinsine ait türlerle ilgili yapılan çalışmalar yer almaktadır.

Lineberger ve Wanstreet (1983), *A. reptans*’ın mikroçoğaltılması üzerine Bitki Büyüme Düzenleyici’lerinin (BBD) etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, 2.5 mg/L⁻¹ BA ve 0.1 mg/L⁻¹ NAA içeren MS besi ortamından sürgün ucu başına 47.6 adet sürgün oluşturduğunu belirlemişlerdir.

Preece ve Huetteman (1994), *A. reptans*’ın nodal eksplantlarını kültüre alarak sürgün oluşturma potansiyelini araştırmışlardır. 10 µM BA içeren MS besi ortamında kültüre alınan nodal eksplantlardan maksimum kallus ve adventif sürgün (5.6 adet) elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Callebaut ve ark. (1997), *Ajuga reptans*’ın çiçeklerinden elde ettikleri kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde antosiyanin üretimini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar metabolik olarak üretilen antosiyaninlerin, katı besi ortamından sıvı besi ortamına geçiş sırasında azaldığını ve bunun sıvı kültürlerdeki havalandırma sisteminden etkilendiğini rapor etmişlerdir.

Bremner ve ark. (1998), yaptıkları çalışmada, *Ajuga reptans*’ın toprak üstü kısımlarından elde edilen bazı bileşiklerin bazı böceklere karşı etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Konoshima ve ark. (2000), bitki kaynaklarından kanser önleyici ajan olarak kullanılacak bileşikler üzerine araştırmalar yapmışlardır. Bu kapsamda *Ajuga*

decumbens'den izole ettikleri, iridoid glikozit türevi olan 8-asetilharpagid (8-AcHarp) bileşiğini fare deri tümörleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Sonuç olarak 8-AcHarp bileşiğinin, farenin iki aşamalı karsinogenez testi üzerinde güçlü anti-tümör destekleyici aktivite sergilediğini bildirmişlerdir.

Kuria ve ark. (2001), Kenya'da halk arasında yaygın olarak kullanılan *Ajuga remota*'nın farklı ekstrasyonlarının antimaleryal özelliğini incelemişler ve özellikle etanol ekstratının aktif bir şekilde *Plasmodium falciparum* suşu üzerinde etkili olduğunu saptamışlardır.

Coll (2002), *Ajuga* cinsine ait bazı türlerin kimyasal içeriğini NMR aracılığıyla incelemiştir. Araştırmacı, *Ajuga orientalis* L. *Ajuga parviflora*, *Ajuga reptans*, *Ajuga australis* türlerinin çeşitli neo-clerodane diterpenlere sahip olduğunu tespit etmiştir.

Kuria ve ark. (2002), *Ajuga remota* ve *Ajuga decumbens*'ten izole edilen maddelerin antiplazmodial aktivite gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Kökdil ve ark. (2002), *Ajuga relict*a ekstrelerinden dört steroid, bir monotermen, bir iridoid glikozit, iki diterpen, iki triterpen yapıda olmak üzere on madde izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Filippova ve ark. (2003), *Ajuga reptans* L. ve *Serratula coronata* L. bitkilerinin kallus kültürlerinden hücre süspansiyon kültürlerini elde etmişlerdir. Araştırmacılar, *Ajuga reptans*'in hücre süspansiyon kültüründe, 20-hydroxyecdysone (20E) içeriğinin doğal bitkiden 4-8 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

How ve Smith (2003), ışık ve karanlık uygulamasının *Ajuga reptans*'in gelişmesi ve antosiyanin üretimi üzerine etkisini kallus kültürü yoluyla incelemişlerdir. Araştırmacılar, 0.75 mg/L⁻¹ Kin+0.5 mg/L⁻¹ 2,4-D içeren WPM besi ortamında kültüre aldıkları *in vivo* yapraklardan elde ettikleri kallus oluşumu üzerinde ışık/karanlık periyodunun çok önemli olmadığını bildirmişlerdir.

Fekete ve ark. (2004), *Ajuga reptans*, *Ajuga bracteosa*, *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber ve *Ajuga genevensis* L. türlerinden elde edilen ekstrelerde emici böceklere etki eden maddeler bulduklarını rapor etmişlerdir.

Gören ve ark. (2005), *Ajuga postii* bitkisinden hazırlanan ekstrelerde bazı sekonder bileşikler izole ettiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar daha sonra izole edilen bileşiklerin DNA hasarı oluşturma aktivitesini araştırmış ve özellikle reptoside glikosidinin DNA hasarına sebep olduğunu ancak sitotoksik etki göstermediğini saptamışlardır.

Marc ve ark. (2008), Lübnan'da antiromatizmal ve antialerjik hastalıkları tedavi etmek için halk arasında geleneksel olarak kullanılan bitkileri tespit etmek için etnobotanik ve etnofarmakolojik araştırma yapmışlardır. Sonuç olarak; *Ajuga chia* Schreb ve *Ajuga iva* (L.) Schreb'in toprak üstü kısımlarının antiromatizmal etkiye sahip olduğunu ve bu amaçla halk arasında kullanıldığını bildirmişlerdir.

Cheng ve ark. (2008), metabolizmayı hızlandırıcı özelliğe sahip sekonder metabolit olan fitotekdisteroidi elde etmek için Özbekistan endemiği olan *Ajuga turkestanica*'nın saçak kök kültürü ve sürgün kültürlerini oluşturmuşlardır. Farklı elisitörler kullanarak oluşturdukları saçak kök kültürü ortamında metabolik olarak aktif fitotekdisteroit üretiminin sağlanabileceği sonucuna varmışlardır.

Hemcinschi ve ark. (2009), *Ajuga genevensis* ve *Ajuga reptans*'ın histo-anatomik özellikleri ve kimyasal içeriklerini incelemişlerdir. *A. genevensis*'in metanol ekstresinin daha yüksek flavonoid içeriğine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca *A. reptans* ekstresinin antioksidan aktivitesinin daha kuvvetli (%88.11) olduğunu bildirmişlerdir.

Israeli ve Lyoussi (2009), *Ajuga* türlerinin biyolojik aktiviteye sahip bileşikler içerdiğini saptamışlardır. Ayrıca araştırmacılar tarafından *Ajuga* cinsinin etnofarmakolojik özellikleri araştırılmış, birçok *Ajuga* türünün farmakolojik ve fitokimyasal özelliğinden dolayı geleneksel tıpta, diyabet, ateş, karaciğer problemleri, sıtma tedavisi, pnömoni, romatizma, deri hastalığı, mide ağrısı, diş ağrısı, tüberküloz, yara iyileşmesinde, dizanteri, malarya, gastroinstestinal, helmintik, diüretik, yüksek tansiyon, iltihap önleyici, antifungal olarak çok çeşitli hastalıklara karşı kullanıldığını ve bahçecilikte de kritik bir rol oynadığını ifade etmişlerdir.

Türkoğlu ve ark. (2010), *Ajuga chamaeptytis* bitkisinden hazırlanan bazı ekstrelerin biyolojik aktivitesini araştırmışlardır. Sonuç olarak su ekstresinin metanol ve kloroform ekstrelerinden daha aktif olduğunu bildirmişlerdir.

Sivanesan ve ark. (2011), *A. multiflora*'nın yaprak ve yaprak sapı eksplantlarını 0.5-16.0 µM oranında üç farklı sitokin [benziladenin (BA), N6- (2-izopentenil) adenin (2iP) veya thidiazuron (TDZ) veya 1-fenil-3- (1,2,3, -tiadiazol-) 5-il] üre] içeren MS besi ortamında kültüre alarak adventif sürgün oluşturma potansiyelini incelemişlerdir. Sonuç olarak; üç sitokinin içerisinde 4 µM TDZ içeren besi ortamında yaprak sapı eksplantlarından maksimum sayıda sürgün oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Sahakyan ve ark. (2010), *Ajuga genevensis* ve *Ajuga chia* doğal ortamdaki bitkilerinin yapraklarındaki ve kallus kültürlerindeki nötr lipitlerin ve bunların yağ

asitlerinin miktarını ve kompozisyonunu inceleyerek karşılaştırmışlardır. Lipitlerin ve yağ asitlerinin içeriğinin türlere, kallusun kökenine ve alt kültür sayısına bağlı olarak değiştiğini ortaya koymuşlardır.

Ghita ve ark. (2011), *Ajuga reptans* ve *Ajuga genevensis*'in fitokimyasal özelliklerini inceleyerek HPLC varlığında iki türü karşılaştırmışlardır. Sonuçta *Ajuga reptans*'ın *Ajuga genevensis*'den daha fazla immünomodüle, hepatoprotif iridoid, daha yüksek antioksidan, polifenollere, pedo-klimatik intraspesifik, luteolin-7-O-glucosyde, apigenol, klorojenik ve kafeik asit içerdiğini tespit etmişlerdir.

Chandel ve Bagai (2011), *Ajuga bracteosa* bitkisinden hazırlanan etanol ekstresinin antiplazmodiyal aktivite ($IC_{50}:10\mu g/L^{-1}$) oldukça yüksek olduğunu saptamışlardır.

Delazar ve ark. (2012), *Ajuga chamaeopytys* türünün metanol ekstresinden izole ettikleri 5 maddenin antioksidan aktivitelerini (DPPH) araştırmışlardır. Test edilen ekstreler içerisinde en yüksek aktivitenin metanol ekstresinden elde edildiğini bildirmişlerdir.

Haşimi (2012), *Ajuga xylorrhiza* KIT TAN ve *Ajuga vestita* BOISS. türlerinin Antikolinesteraz aktivitesini Ellman yöntemini kullanarak belirlemiştir. Araştırmacı, her iki bitkiden elde edilen ekstrelerin yüksek derecede antikolinesteraz aktiviteye sahip olduğunu saptamıştır.

Kaul ve ark. (2013), *Ajuga bracteosa*'nın yaprak, yaprak sapı ve kök eksplantlarını IAA (2 mg/L^{-1}) ve BA (5 mg/L^{-1}) ile desteklenmiş MS besi ortamında kültüre alarak, *in vitro* mikroçoğaltılma potansiyelini araştırmışlardır. Üç eksplant arasından yaprağın en hızlı, yaprak sapının ise en yavaş tepkiyi verdiğini gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar en iyi sonucun, eksplant başına ortalama 41.4 adet sürgün ile yaprak eksplantlarından elde edildiğini ve sürgün rejenerasyonunda %100 başarı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Elde edilen sürgünlerin, MS+IBA (0.5 mg/L^{-1}) içeren besi ortamına aktarıldığında yaklaşık 20.2 cm uzunluğunda 20 adet kök oluşturduğunu belirlemişlerdir. Köklü fidelerin toprağa adaptasyonunu sağlayarak rejenere edilen bitkilerin RAPD analizi ile %100 monomorfizm gösterdiğini ve genetik stabiliteyi koruduğunu bildirmişlerdir.

Mamadelieva ve ark. (2013), *Ajuga turkestanica* bitkisinin bazı ekstrelerinin biyolojik aktivite potansiyelini araştırmışlardır. Sonuç olarak; su ve bütanol ekstresinin en iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve ayrıca antimikrobiyal aktivite bakımından da aktif olduğunu bildirmişlerdir. İzole edilen bu bileşiklerin analjezik,

antibakteriyal, antiviral, antimikrobiyal, antiplazmoidal, antitümör, antifungal gibi bir çok aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Sivanesan ve Jeong (2014), *A. multiflora*'nın yaprak ve yaprak sapı eksplantlarını, 12.2 μM 2iP, 5.7 μM indol-3-asetik asit (IAA) ve 7.2 mM'de silisyum içeren MS besi ortamında kültüre almışlardır. En iyi sürgün oluşumunun yaprak eksplantında (eksplant başına 23 sürgün) gözlendiğini belirlemişlerdir. Ayrıca MS bazal ortamına silisyumun ilave edilmesinin kök uzunluğunun önemli ölçüde artmasına sebep olduğunu tespit etmişlerdir.

Jan ve ark (2014), önemli bir tıbbi bitki olan *Ajuga bracteosa* Wall ex. Benth'in farklı eksplantlarını kullanarak kallustan sürgün rejenerasyonu için etkili ve hızlı *in vitro* protokol geliştirmişlerdir. Maksimum kallus oluşumunun yaprak eksplantlarında 5.0 mg/L^{-1} BAP, petiyol eksplantlarında 2.0 mg/L^{-1} BAP+3.0 mg/L^{-1} IAA ve internodal eksplantlarda 2.0 mg/L^{-1} BAP+5.0 mg/L^{-1} NAA içeren MS besi ortamlarında oluştuğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar sürgün rejenerasyonu için, yaprak eksplantlarından elde ettikleri kallusu farklı oksin (IAA, NAA) ve sitokin (BAP, Kinetin) içeren besi ortamına aktardıklarını ve 5.0 mg/L^{-1} BAP ile desteklenmiş MS besi ortamında maksimum sürgün elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Sivanesan ve Park (2015b), *A. multiflora*'nın nodal eksplantlarından itibaren aksiller sürgün proliferasyonu üzerine BBD'lerinin etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar, 2 mg/L^{-1} BA ile desteklenmiş MS besi ortamında eksplant başına ortalama 9.3 adet sürgün oluştuğunu ayrıca 2 mg/L^{-1} BA ve 0.5 mg/L^{-1} NAA içeren MS besi ortamında eksplant başına oluşan ortalama sürgün sayısının (21.3) önemli ölçüde yükseldiğini rapor etmişlerdir.

Akbaş ve ark. (2015), *Ajuga vestita* BOISS.'in olgun tohumlarını *in vitro* ortamda çimlendirmişler ve elde ettikleri *in vitro* sürgünlerin çoğaltılması üzerine BAP (0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/L^{-1}) ve Kinetinin (0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/L^{-1}) farklı konsantrasyonlarının etkisini araştırmışlardır. Test edilen, BAP ve kinetin oranlarının tümünde birçok sayıda sağlıklı sürgün elde ettiklerini ancak en iyi sürgün gelişiminin 0.125 mg/L^{-1} Kinetin içeren MS besi ortamında olduğunu tespit etmişlerdir.

Sönmez (2016), endemik türler olan *Ajuga postii* Briq. ve *Ajuga relictia* P.H.'nin morfolojik ve anatomik özelliklerini inceleyerek moleküler akrabalık ilişkilerini Ribozomal DNA ITS bölgelerinin dizi analizleriyle ortaya koymuştur. Ayrıca toplam fenol, flavanoid ve flavanol madde miktarları ile fenolik bileşiklerini tanımlayarak, uçucu yağ analizleri ve antioksidan aktivitelerini araştırmıştır. Araştırmacı yaptığı

antioksidan aktivite çalışmalarında en yüksek değerlerini *A. relictta*'nın %70 metanol içeren ekstresinden elde etmiştir. Ayrıca uçucu yağların analizinde safa yakın bilinmeyen maddeler tespit ettiğini bildirmiştir.

Kayani ve ark. (2016), *A. bracteosa*'nın, 0.45-3.6 mg/L⁻¹ BA ilave edilmiş MS besi ortamındaki eksplantlardan çok sayıda sürgün elde ettiklerini bildirmişlerdir. Elde edilen sürgünlerin 0.5 mg/L⁻¹ IBA ile desteklenmiş MS besi ortamında en iyi (%100) köklenme gösterdiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar daha sonra oluşan köklü bitkileri saksılara aktararak 2 hafta boyunca sulamış ve bitkilerin %82'sinin hayatta kaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca yaprak sapından elde edilen kallusun 3.6 mg/L⁻¹ BA içeren MS besi ortamında adventif sürgün oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Sivanesan ve ark. (2016), *A. multiflora*'nın sürgün ucu eksplantlarından itibaren sürgün proliferasyonu üzerine BBD'lerinin etkisini incelemişlerdir. En yüksek sürgün sayısını, 8 µM BA ve 2.7 µM NAA içeren MS besi ortamında (17.1) elde etmişlerdir. Ayrıca maksimum köklenme oranının (%100) sürgün başına 7.2 adet kök ile MS bazal besi ortamında olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar elde ettikleri köklü fideleri, %100 canlılık oranı ile toprağa adaptasyonunu sağlamışlardır. Bununla birlikte araştırmacılar toprağa aktarılan ve *in vitro* ortamda rejenere edilen sürgünlerin yapraklarının, karotenoid, yağ asidi ve tokoferol içeriğini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak; en yüksek karotenoid, yağ asidi ve tokoferol içeriğinin MS bazal besi ortamında kültüre alınan sürgünlerin yapraklarından elde edildiğini bildirmişlerdir.

Sahakyan ve ark. (2016), *A. genevensis*'in yaprak ve kök eksplantlarını 0.2 mg/L⁻¹ Kin ve 2 mg/L⁻¹ IAA 2 mg/L⁻¹ glisin bulunan MS besi ortamında kültüre alarak kallus elde etmişlerdir. Elde ettiği kalluslar ile doğal ortamdaki bitkilerin biyolojik aktivitelerini ve kimyasal içeriğini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak; hem yaprak hemde kök orjinli kallus dokusunun doğal ortamdaki bitkilerden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir.

Jeong ve ark. (2018), *A. multiflora*'nın *in vitro* sürgün kültürlerinde, adventif sürgün rejenerasyonu ve sekonder metabolit içerikleri üzerine ışık ve sukroz konsantrasyonunun etkisini araştırmışlardır. Yaprak başına en yüksek sürgün tomurcuğunun (34.8), beyaz floresan ışık (WFL) altında %2 sukroz ile desteklenmiş ortamdan elde ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, en yüksek karotenoid içeriğinin ise WFL altında %3 sukroz içeren MS ortamında kültüre alınan sürgünlerden elde edildiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca en yüksek tokoferol içeriğini, WFL altında %3 sukroz içeren MS ortamında kültüre alınan sürgünlerden elde etmişlerdir.

Ali ve ark. (2018), *Ajuga bracteosa*'nın hücre kültüründe fotoperiyod ve hormon uygulamasının biyoaktif sekonder bileşiklerin biyosentezi üzerine etkisini ayrıca biyomas üretimi ve antioksidan aktivitesi üzerinde etkisini incelemişlerdir. Maksimum toplam fenolik (TPC; 4.5mgGAE/gDW) ve flavonoid içeriğini (TFC; 3.5mgQE/gDW), 1.2 ppm TDZ+2.0 ppm BAP hormon kombinasyonunu içeren MS besi ortamında kültüre alınmış sürgünlerden elde etmişlerdir. GC-MS ile yapılan analizlerde, *in vitro* hücre kültürlerinde 29 yeni bileşiğin biyosentezlendiğini tespit etmişlerdir. En önemli bileşikler arasında β -pinene, β -ocimene, 1-terpinene-4-ol, β -farnesene gibi monoterpen hidrokarbonlar; myrtenal, citronellyl acetate gibi oksinlenmiş monoterpenler ve caryophyllene oxide, β -elemene gibi sesqui terpenlerin yer aldığını bildirmişlerdir.

Ali ve ark. (2018), *Ajuga bracteosa*'da yaptıkları biyokimyasal analizlerde, 0.5 metil jasmonat (Me-J) varlığında, sürekli karanlıkta yetiştirilen hücre kültürlerinin, daha yüksek süperoksit dismutaz (SOD:4.5 U/mg), peroksidaz (POD: 3.1U/mg) aktivitelerine sahip olduğunu göstermişlerdir.

Chen ve ark. (2018), *Ajuga decumbens* Thunb'den izole edilen neoclerodane diterpenlerin ve fitosteroidlerin süperoksit anyon oluşumu ve elastaz salınımı üzerindeki sitotoksik etkisini *in vitro* ortamda incelemişlerdir. Araştırmacılar izole edilen dört yeni diterpenoidlerin süperoksit anyon oluşumu üzerine önemli etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir.

Jan ve ark. (2018), *Ajuga bracteosa*'nın *in vitro* çoğaltma protokolünü geliştirmek için petiyol ve internod eksplantlarından itibaren kallus kültürlerini kullanmışlardır. Farklı konsantrasyonlarda oksin ve sitokinin içeren MS besi ortamlarında kültüre aldıkları eksplantlarda oluşan kallusları BBD'lerinin bulunduğu MS besi ortamında alt kültüre alarak sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Petiyol eksplantlarında maksimum sürgün sayısını 3 mg/L⁻¹ BAP içeren (%80) MS besi ortamında, internod eksplantında ise 2 mg/L⁻¹ BAP ve 5 mg/L⁻¹ NAA içeren MS besi ortamında (%100) sağlandığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar oluşan sürgünleri 2 mg/L⁻¹ IAA ile desteklenmiş MS besi ortamında köklendirdikten sonra sera koşullarında yaklaşık 4 hafta kadar alıştırdıklarını ve başarıyla tarla koşullarına aktardıklarını bildirmişlerdir.

Kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde çeşitli doku kültürü yöntemleri uygulanmaktadır (Babaoğlu ve ark., 2002). Bununla birlikte tıbbi öneme sahip, endemik ve EN "Tehlikede" kategorisinde olan *Ajuga* cinsine ait, *Ajuga vestita* bitkisinin kallus kültürü ile ilgili herhangi bir literatüre

rastlanmamıştır. Bu amaçla, tez çalışmasında *in vitro* sürgünlerin farklı kısımları kullanılarak kallus oluşturma çalışmaları ve oluşan kallusların toplam fenolik, flavonoid ve total antioksidan aktiviteleri incelenmiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal

Çalışmada başlangıç materyali olarak kullanılan, *Ajuga vestita*'nın tohumları Mardin'in Savur ilçesinden yapılan arazi çalışmaları sonucu toplandı ve Prof. Dr. A. Selçuk ERTEKİN tarafından teşhis edildi. Deneysel çalışmalar Batman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araştırma Laboratuvarında yürütüldü.

Taksonomik Hiyerarşi

- Alem** :Plantae (Bitkiler)
Altalem :Tracheobionta (Damarlı Bitkiler)
Üstbölüm :Spermatophyta (Tohumlu Bitkiler)
Bölüm :Magnoliophyta (Kapalı Tohumlular)
Sınıf :Magnoliopsida (Çift Çenekliler)
Altsınıf :Asteridae
Takım :Lamiales
Aile :Lamiaceae (Ballıbagiller)
Cins :Ajuga (Mayasilotu)
Tür :*Ajuga vestita* BOISS.(Anonim, 2013)



Şekil 3.1. Mardin'in Savur ilçesinde doğal olarak bulunan *Ajuga vestita*'nın genel görünümü

Lamiaceae familyasından olan *Ajuga* cinsi, halk arasında birçok hastalığın tedavisinde kullanılmakta olup bu bitkilerden elde edilen bileşikler biyolojik, farmakolojik ve tıbbi özelliklere sahip olduğu için oldukça önemli bir genustur. *Ajuga* cinsinin, Güney Amerika dışındaki kıtalara yayılmış 300'den fazla türü, Türkiye'de ise 13 türü yetişmektedir (Anonim, 2013). Bunlardan *Ajuga vestita* Güneydoğu Anadolu

Bölgesinde sadece Mardin çevresinde yetişen, endemik olarak bilinen ve Ulusal Kırmızı Listede EN “Tehlikede” kategorisinde olan Ajuga türüdür (Davis, 1982; Davis ve ark., 1988; Saya ve ark., 2001; Anonim, 2018).

3.2. Yöntem

3.2.1. *İn vitro* kültür ön hazırlık uygulamaları

3.2.1.1. Sterilizasyon işlemleri

İn vitro kültür çalışmalarında kullanılan cam malzemeler, sıcak su ile yıkandıktan sonra saf sudan geçirildi ve etüv içerisinde 180 °C’de 3 saat boyunca (mezür, balon joje ve pipetler ise 80 °C’de) bekletilerek sterilize edildi. Magenta GA-7 kültür kapları aynı şekilde yıkanıp kurutulduktan sonra alüminyum folyolara sarıldı ve 121 °C’de, 1 atm basınç altında 25 dakika boyunca otoklavda sterilizasyonları sağlandı. Çalışmada kullanılan filtre kağıtları iki saat boyunca 180 °C’de, besi ortamında kullanılan saf sular ise üç saat boyunca 180 °C’de etüv içerisinde bekletilerek sterilizasyonu yapıldı. İnkübasyon işlemlerinde kullanılan bistüri ve pensler önce %96’lık alkol ile silindi daha sonra alüminyum folyoya sarılarak 300 °C’de 30 dakika boyunca kuru hava sterilizatörü içinde bekletilerek steril edildi.

İnkübasyon işlemlerinden bir gün önce röpikaj odasında bulunan dolaplar, kapı, masa, duvarlar ve zemin sodyum hipoklorit (NaOCI) yardımıyla silindi. Ayrıca inkübasyonun yapılacağı steril kabinin içi seyreltilmiş alkolle (%70) temizlendi. Daha sonra, ultraviyole lambası birkaç saat açık bırakılarak röpikaj odasının sterilizasyonu tamamlandı.

Büyüme odasında; 30-60 $\mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetine sahip civalı Flüoresan lambalar (400 w, MBFR/U, Thorn) ve ortam sıcaklığını $25\pm 2^\circ\text{C}$ de sabit tutan bir sıcaklık kontrol sistemi bulunmaktadır. Ayrıca büyüme odasının ışık periyodu 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olacak biçimde ayarlandı (3000-5000 lüks).

3.2.1.2. Besi ortamlarının hazırlanması ve sterilizasyonu

Bu araştırmada tüm deneylerde kullanılan Murashige ve Skoog (Murashige ve Skoog, 1962-MS) besi yerinin stok solüsyonlar aracılığıyla hazırlanması ve BBD’lerin miktarlarına ait çizelgeler aşağıda verildi (**Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2.**).

Çizelge 3.1. MS besi ortamında kullanılan stok çözeltiler ve miktarları

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

Çizelge 3.2. Besi ortamlarına ilave edilen Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin tip çeşitleri

BAP Ana Çözeltisi (10⁻³)		Kinetin Ana Çözeltisi (10⁻³)	
6-Benzilaminopurin	100 mg	Kinetin(6furfuroaminopurin)	100 mg
1N HCl	3-5 cc	Distile su ile	100ml'ye tamamlanır
Distile su	100ml'ye tamamlanır		
2,4-Diklorofenoksi Asit (2,4-D)			
2,4-D		100 mg	
%95 lik etil alkol ile		100 ml'ye tamamlanır	

Murashige ve Skoog (MS) besi ortamının hazırlanması;

Çalışmada kullanılan MS besi yeri **Çizelge 3.3.**'de verildiği gibi hazırlandı. Bunun için bir litrelik erlenmayere önce 750 ml steril saf su eklendikten sonra sırasıyla sakkaroz, ana solüsyon, MS-1, MS-2, kompleks kelatör, vitamin karışımı, B1 vitamini ilave edildi ve son olarak steril saf su ile bir L'ye tamamlandı. Daha sonra çalışmanın amacına uygun BBD'ler eklenerek pH'sı 5.7 'ye ayarlandı. Kültür besi ortamını katılaştırmak için 5.458 g agar ilave edildikten sonra 25 dakika süre ile 121 °C'de 1 atm basınç altında otoklavda sterilizasyonu sağlandı.

Sterilizasyonu saptanan besin ortamı solüsyonu röpikaj odasında steril kabin içinde Magenta GA-7 kaplarına 50-60 ml olacak şekilde bölüştürüldü.

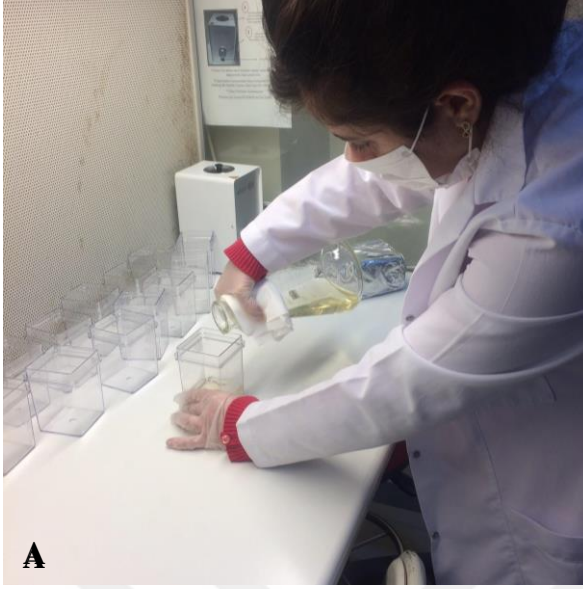
Çizelge 3.3. Standart MS besi ortamı içeriği (Murashige ve Skoog, 1962)

Agar	5.458 g
Sakkaroz	30 g
MS Ana Çözeltisi (Makro Elementler)	100 ml
MS Mikro Elementler-1	10 ml
MS Mikro Elementler-2	1 ml
Kompleks Kelatör	10 ml
Vitamin Karışımı	1 ml
B1 Vitamini Ana Çözeltisi	1 ml
Distile Su	1000 ml'ye tamamlanır

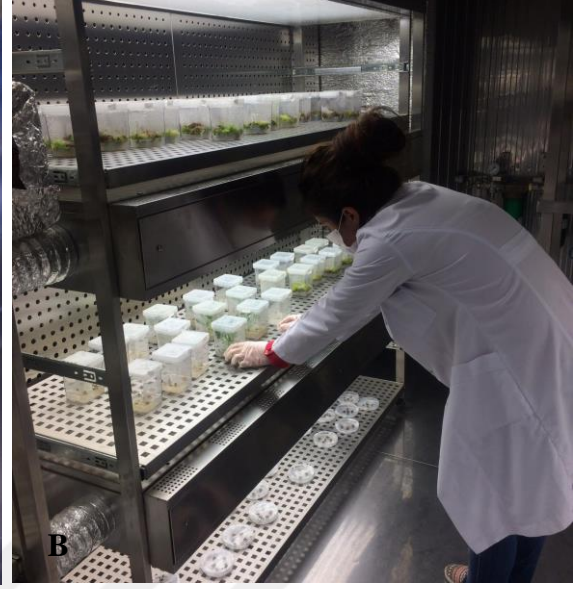
3.3. Kültür Başlatma Çalışmaları

Başlangıç materyali olarak kullanılan *Ajuga vestita*'ya ait olgun tohumların çimlenmesi için yıkandıktan sonra %70 lik alkolde 30 sn bekletilmek suretiyle ön sterilizasyonu yapıldı. Tohumlar %5'lik NaOCI solüsyonunda 15 dk bekletildi ve steril saf su içinde 5 kez 5'er dakika çalkalanarak NaOCI'den arındırıldı. Tohumların çimlenmesi ve büyümesi için 1/4 MS besi ortamına 30 g/L⁻¹ sakkaroz ilave edilerek pH'sı 5.8 olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra besi ortamına 5.465 g agar eklenerek 1 atmosfer basınçta 121 °C de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Hazırlanan besi ortamı, Magenta GA-7 kültür kaplarına, steril kabin içerisinde yaklaşık 50 ml olacak şekilde bölüştürüldü (**Şekil 3.2A.**).

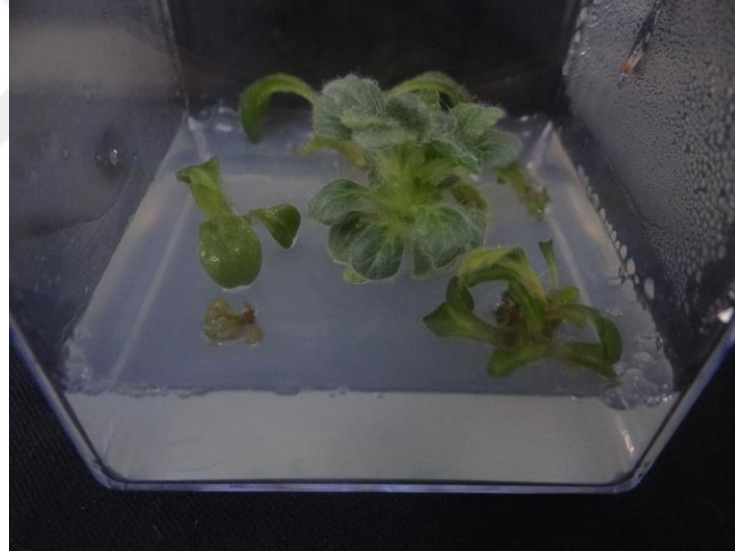
Steril tohumlar testası çatlatılmış olarak, her bir kültür kabında yaklaşık 5 tane olacak şekilde kültüre alınarak, büyüme odasında (büyüme odasının sıcaklığı 25±2 °C, ışık periyodu 16 saat aydınlık 8 saat karanlık; 3000-5000 lüx) çimlenmeye bırakıldı (**Şekil 3.2B.**). İki haftalık kültür periyodu sonunda çimlenen tohumların sürgün uçları, Akbaş ve ark. (2015) belirttiği gibi 0.125 mg/L⁻¹ Kinetin (Kin) içeren 1/1 MS besi ortamında kültüre alınarak çoğaltıldı ve böylece kallus oluşturma çalışmalarında başlangıç materyali olarak kullanılacak *in vitro* sürgünler elde edildi (**Şekil 3.3.**).



Şekil 3.2A. Besi ortamının hazırlanması



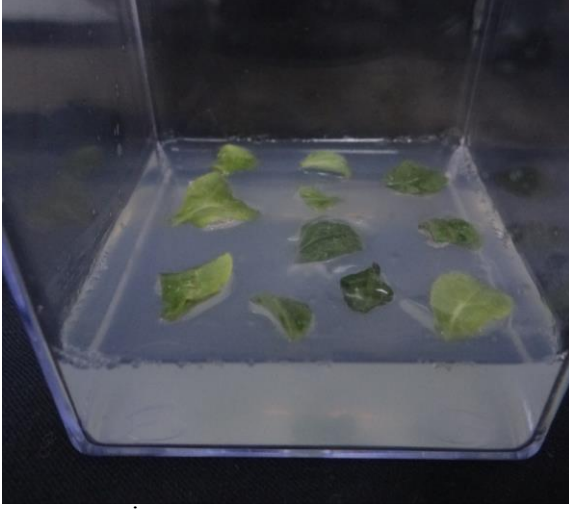
Şekil 3.2B. Ajuga tohumlarının büyüme odasında çimlenmeye bırakılması



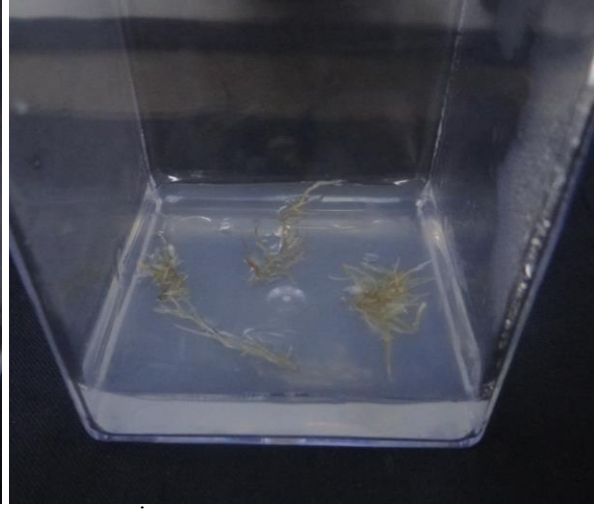
Şekil 3.3. Olgun tohumdan elde edilen *in vitro* sürgünler

3.4. Kallus Oluşturma Çalışmaları

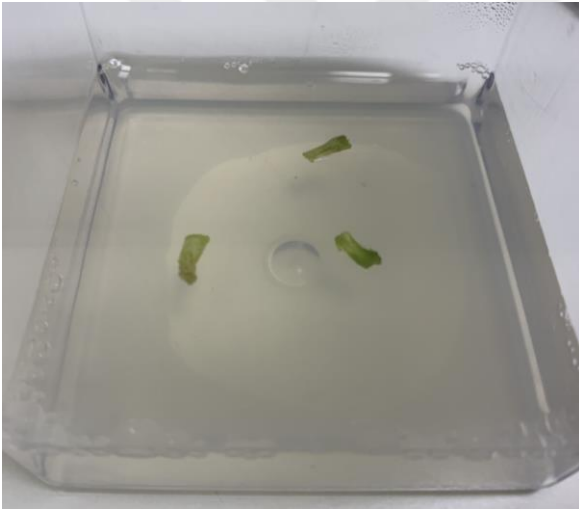
Kallus oluşturma çalışmalarında, *in vitro* sürgünlerin yaprak, gövde, kök kısımları ve testası çatlatılmış olgun tohumlar, Çizelge 3.4.'de belirtilen hormon kombinasyonlarının bulunduğu 1/1 MS besiyerinde ayrı ayrı kültüre alındı. Büyüme odasında gelişmeye bırakılan kallus kültürlerinin 4 hafta sonra morfolojik gözlemleri alınarak değerlendirildi (Şekil 3.4., Şekil 3.5., Şekil 3.6. ve Şekil 3.7.).



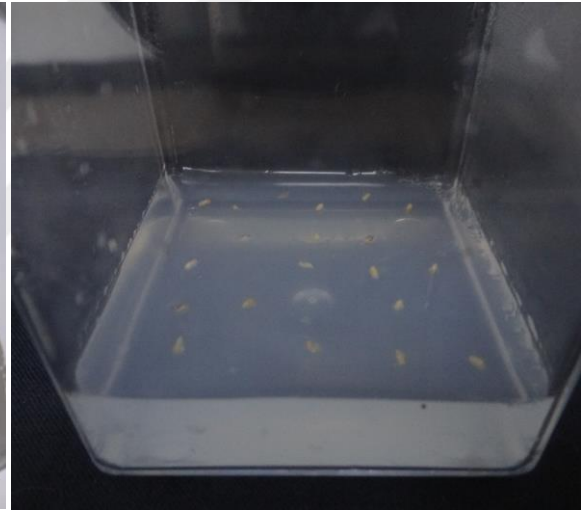
Şekil 3.4. *In vitro* yaprak eksplantlarından kallus başlatma



Şekil 3.5. *In vitro* kök eksplantlarından kallus başlatma



Şekil 3.6. *In vitro* gövde eksplantlarından kallus başlatma



Şekil 3.7. Testası çatlatılmış olgun tohum eksplantlarından kallus başlatma

Çizelge 3.4. Kallus oluşturma çalışmalarında test edilen hormon kombinasyonları

Eksplant	Besiyeri	Sitokinin	Oksin
Tohum	T _{M1}	-0.5 mg/L ⁻¹ Kin	2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	T _{M2}	-0.5 mg/L ⁻¹ BAP	2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	T _{M3}	-1.0 mg/L ⁻¹ Kin	2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	T _{M4}	-1.0 mg/L ⁻¹ BAP	2.0 mg l ⁻¹ 2,4-D
	T _{M5}	-0.5 mg/L ⁻¹ Kin	1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	T _{M6}	-0.5 mg/L ⁻¹ BAP	1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	T _{M7}	-1.0 mg/L ⁻¹ Kin	1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	T _{M8}	-1.0 mg/L ⁻¹ BAP	1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
Yaprak	Y _{M1}	-0.5 mg/L ⁻¹ Kin	2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	Y _{M2}	-0.5 mg/L ⁻¹ BAP	2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	Y _{M3}	-1.0 mg/L ⁻¹ Kin	2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	Y _{M4}	-1.0 mg/L ⁻¹ BAP	2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	Y _{M5}	-0.5 mg/L ⁻¹ Kin	1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	Y _{M6}	-0.5 mg/L ⁻¹ BAP	1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	Y _{M7}	-1.0 mg/L ⁻¹ Kin	1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	Y _{M8}	-1.0 mg/L ⁻¹ BAP	1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
Kök	K _{M1}	-0.5 mg/L ⁻¹ Kin	2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	K _{M2}	-0.5 mg/L ⁻¹ BAP	2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	K _{M3}	-1.0 mg/L ⁻¹ Kin	2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	K _{M4}	-1.0 mg/L ⁻¹ BAP	2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	K _{M5}	-0.5 mg/L ⁻¹ Kin	1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	K _{M6}	-0.5 mg/L ⁻¹ BAP	1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	K _{M7}	-1.0 mg/L ⁻¹ Kin	1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	K _{M8}	-1.0 mg/L ⁻¹ BAP	1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
Gövde	G _{M1}	-0.5 mg/L ⁻¹ Kin	2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	G _{M2}	-0.5 mg/L ⁻¹ BAP	2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	G _{M3}	-1.0 mg/L ⁻¹ Kin	1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D
	G _{M4}	-1.0 mg/L ⁻¹ BAP	1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D

3.5. Kallus Geliştirme Çalışmaları

Kallus geliştirme ve kallustan sürgün oluşturma potansiyeli için tüm materyallerden elde edilen kalluslar aşağıda belirtilen BBD'lerini içeren 1/1 MS besi ortamlarında ayrı ayrı kültüre alınarak büyüme odasında gelişmeye bırakıldı. 4 hafta sonra oluşan kallusların morfolojik gözlemleri alınarak değerlendirildi.

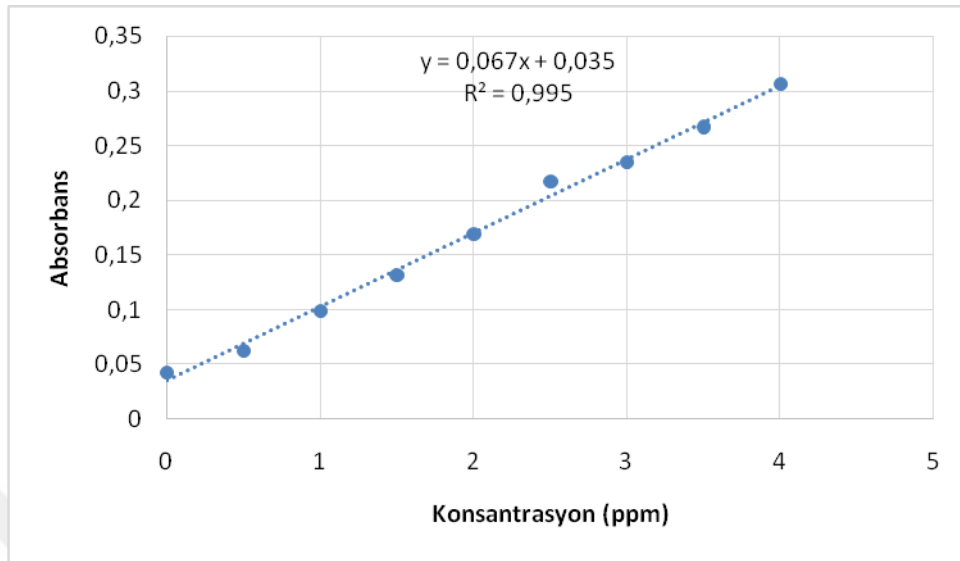
- 0.125 mg/L⁻¹ Kin
- 0.5 mg/L⁻¹ Kin
- 1.0 mg/L⁻¹ Kin
- 2.0 mg/L⁻¹ Kin
- 4.0 mg/L⁻¹ Kin
- 6.0 mg/L⁻¹ Kin
- 8.0 mg/L⁻¹ Kin
- 10.0 mg/L⁻¹ Kin
- 0.125 mg/L⁻¹ BAP
- 0.5 mg/L⁻¹ BAP
- 1.0 mg l⁻¹BAP
- 2.0 mg/L⁻¹ BAP
- 4.0 mg/L⁻¹ BAP
- 6.0 mg/L⁻¹ BAP
- 8.0 mg/L⁻¹ BAP
- 10.0 mg/L⁻¹ BAP

Kallus ekstralarının hazırlanışı: *In vitro* ortamda yetiştirildikten sonra kurutulan kallus örneklerinden 3'er g tartıldı. Kalluslar havanda iyice toz haline getirildikten sonra üzerine farklı erlenler içerisinde 50 ml metanol ve 50 ml aseton eklenerek 24 saat oda sıcaklığında 180 rpm'de orbital çalkalayıcıda karıştırıldı. Bu sürenin sonunda, ekstralar Whatman No:1 filtre kağıtlarından süzüldü ve rotary evaporatörde çözücüler uçuruldu. Elde edilen ekstralardan toplam fenolik, toplam flavonoid ve antioksidan aktivite tayininde kullanılmak üzere stok çözeltiler hazırlandı.

3.6. Toplam Fenolik Miktar Tayini

Kallus ekstralarının toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılmak üzere gallik asite eş değer olarak tespit edildi (Slinkard ve Singleton, 1977). Aseton ve metanolde hazırlanmış olan ekstraların 1000 ppm konsantrasyonda çözeltileri hazırlanarak 100 µg ekstre içeren örnek çözeltileri distile su ile 4.6 mL'ye tamamlandı. Bu karışıma 100 µL Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) ve 3 dakika sonra %2'lik Na₂CO₃ çözeltisinden 300 µL ilave edilerek oda sıcaklığında iki saat boyunca inkübe edildi. Farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltileri için de aynı işlem uygulanarak inkübasyon sonrasında 760 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm alındı.

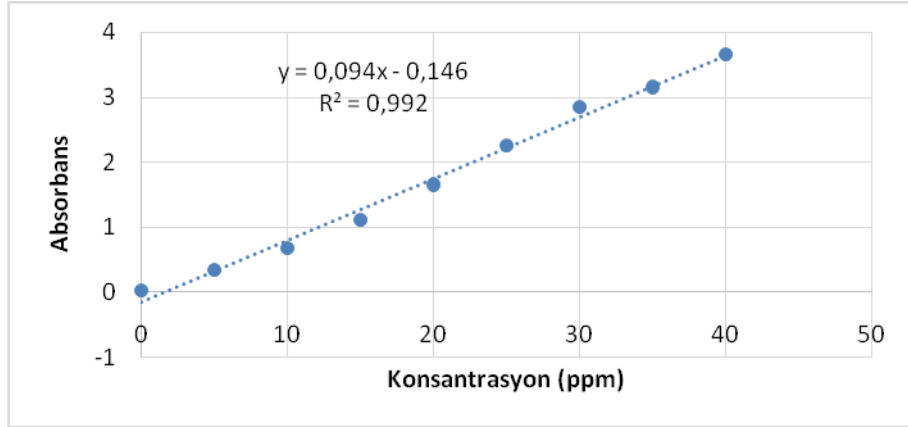
Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri standart gallik asit grafiğinden elde edilen gallik aside eş değer (GAE) eşitlik (Şekil 3.8.) olarak hesaplandı.



Şekil 3.8. Gallik asit standart eğrisi grafiği

3.7. Toplam Flavonoid Miktar Tayini

Kallus ekstrelerinin toplam flavonoid miktarları kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile belirlendi (Moreno ve ark., 2000). 1000 ppm'lik kersetin çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltilerden 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 ve 200 µL alınarak hacimleri %80'lik etanol ile 4.8 mL'ye tamamlandı. Daha sonra karışımın üzerine 0.1 mL 1 M potasyum asetat ve bir dakika sonra 0.1 mL %10'luk alüminyum nitrat ilave edildi. 40 dakika inkübasyon süresinden sonra 415 nm'de kontrole karşı UV spektrofotometresinde absorbansları okundu. Aynı işlem aseton ve metanol içeren ekstrelerin tek konsantrasyonda (100 ppm) hazırlanan çözeltileri içinde yapıldı. Ekstrelerin toplam flavonoid miktarları standart kersetin grafiğinden elde edilen eşitlik (Şekil 3.9.) kullanılarak belirlendi.



Şekil 3.9. Kersetin standart eğrisi grafiği

3.8. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi

Kallus ekstrelerinin serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil serbest radikali (DPPH) kullanılarak belirlendi (Blois, 1958). Bitkilerin metanol ve aseton ekstrelerinden 1 mg/L⁻¹ stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden son konsantrasyon 10, 25, 50, 100, 250 ve 500 µg/ml olacak şekilde alınarak hacimleri 1 ml'ye tamamlandı ve üzerlerine 0.1 mM DPPH çözeltisinden 4 mL ilave edildi. Çözelti karışımı karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 517 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm alındı. Standart olarak; Askorbik asit, BHA ve BHT kullanıldı.

Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formül değerine yerleştirilerek inhibisyon yüzdesi (%I) hesaplandı.

$$\%I = \left(\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) \times 100$$

Akontrol kontrol tüpünün (test bileşikleri dışında tüm ayraçları içeren tüp) absorbans değerini, Aörnek ise her bir konsantrasyon için hazırlanan tüpün absorbans değerini ifade etmektedir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Kallus Oluşturma Çalışmaları

4.1.1. Tohum eksplantında kallus oluşumu

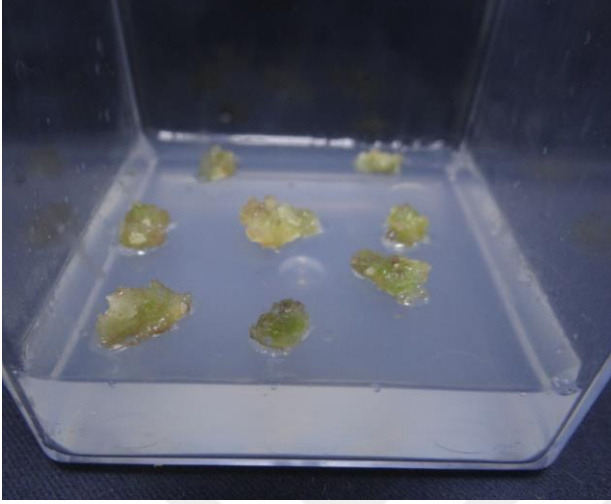
Testası çatlatılmış Ajuga tohumları **Bölüm 3.4.**'te belirtilen şekilde *in vitro* ortamda kültüre alınarak kallus oluşturma potansiyeli incelendi. 4 haftalık kültür periyodu sonunda elde edilen veriler **Çizelge 4.1.**'de gösterildi.

Çizelge 4.1. Testası çatlatılmış olgun tohumların farklı besi ortamlarında kallus oluşturma potansiyeli

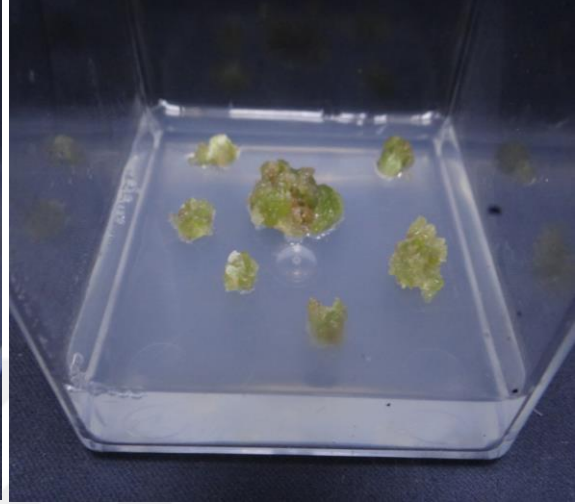
Besiyeri	Kallus Oluşturma Yüzdesi	Kallus Morfolojisi
T _{M1} -0.5 mg/L ⁻¹ Kin+2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%95	Sarı, şeffaf, taneli
T _{M2} -0.5 mg/L ⁻¹ BAP+2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%85	Açık kahverengi, şeffaf, taneli
T _{M3} -1.0 mg/L ⁻¹ Kin+2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%75	Sarı, şeffaf, taneli
T _{M4} -1.0 mg/L ⁻¹ BAP+2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%50	Açık kahverengi, şeffaf, taneli
T _{M5} -0.5 mg/L ⁻¹ Kin+1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%50	Sarı, şeffaf, taneli
T _{M6} -0.5 mg/L ⁻¹ BAP+1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%50	Sarı, şeffaf, dağınık
T _{M7} -1.0 mg/L ⁻¹ Kin+1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%50	Sarı, şeffaf, dağınık
T _{M8} -1.0 mg/L ⁻¹ BAP+1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%50	Sarı, şeffaf, dağınık

Veriler kültürün 28. gününde 10 eksplantın ortalamasını göstermektedir.

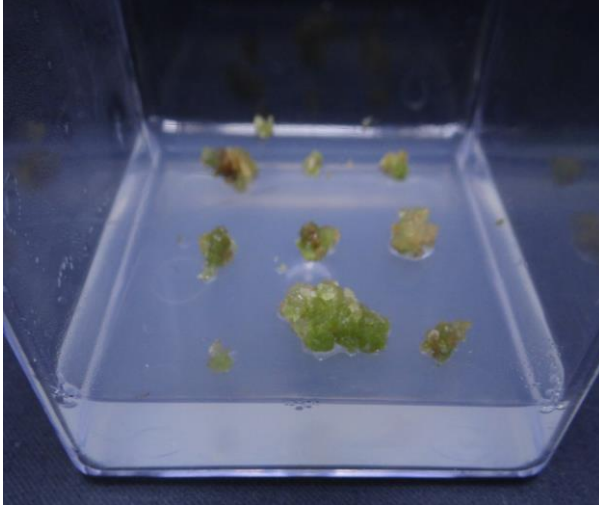
Çizelge 4.1.'de görüldüğü gibi, çeşitli BBD ile desteklenmiş 1/1 MS besi ortamında (T_{M1}, T_{M2}, T_{M3}, T_{M4}, T_{M5}, T_{M6}, T_{M7}, T_{M8}) kültüre alınan tohum eksplantlarında kallus oluşumu gözlemlendi. Ancak en yüksek kallus oluşumu %95 oranı ile T_{M1} besi ortamından elde edilmiştir. Genel olarak, oluşan kallus örnekleri morfolojik olarak incelendiğinde, taneli/dağınık dokulu, sarı/açık kahverenginde olup şeffaf görünümlü olduğu belirlendi. 1 haftalık kültür periyodu sonunda ilk kallus oluşumu T_{M1}, T_{M2}, T_{M3} ve T_{M4} besiyerlerinde inkübe edilen eksplantlarda görüldü ve 4 haftalık periyod sonunda oluşan kallusların başlangıç materyalinin 4-5 katı büyüklüğüne ulaştığı belirlendi (**Şekil 4.1.**, **Şekil 4.2.**, **Şekil 4.3.** ve **Şekil 4.4.**). Buna karşın T_{M5}, T_{M6}, T_{M7} ve T_{M8} besi ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda az miktarda kallus oluşumu ise 3. ve 4 hafta sonunda görüldü (**Şekil 4.5.** ve **Şekil 4.6.**). Kallus oluşumuna oksin–sitokin kombinasyonunun etkisi karşılaştırıldığında besi ortamında kullanılan sitokininden (BAP ve Kin) ziyade oksin (2,4-D) konsantrasyonunun daha etkili olduğu ve özellikle oksin 2.0 mg/L⁻¹ 2,4-D'nin yüksek konsantrasyonlarını içeren besi yerinde (T_{M1}, T_{M2}, T_{M3}) daha yoğun ve taneli yapıda kallus oluştuğu belirlendi.



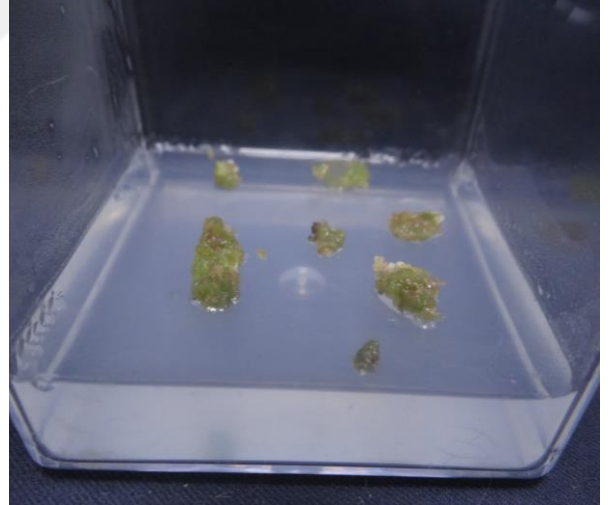
Şekil 4.1. T_{M1} besi ortamında tohum eksplantlarında kallus gelişimi



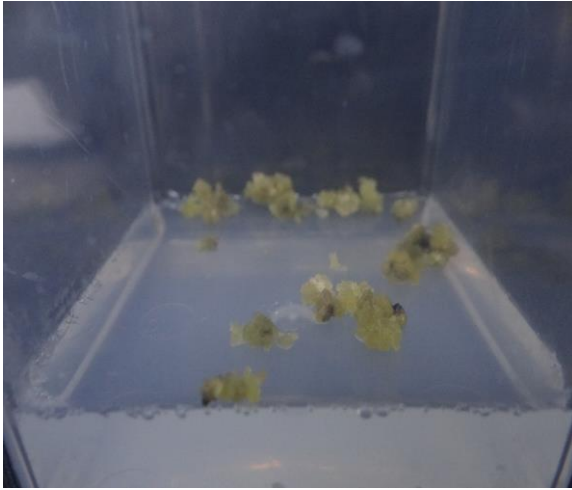
Şekil 4.2. T_{M2} besi ortamında tohum eksplantlarında kallus gelişimi



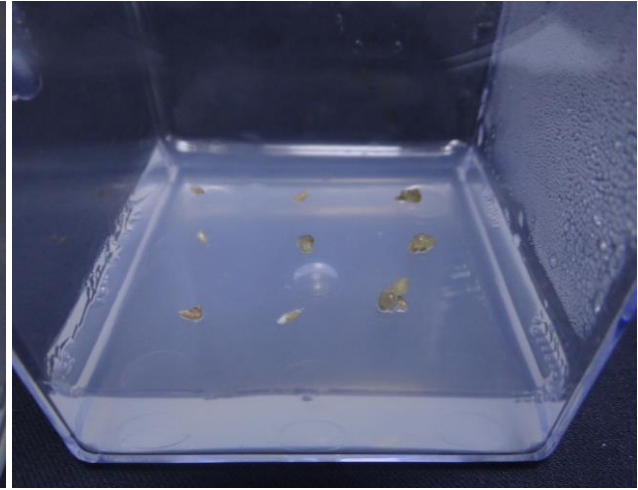
Şekil 4.3. T_{M3} besi ortamında tohum eksplantlarında kallus gelişimi



Şekil 4.4. T_{M4} besi ortamında tohum eksplantlarında kallus gelişimi



Şekil 4.5. T_{M5} besi ortamında tohum eksplantlarında kallus gelişimi



Şekil 4.6. T_{M6} besi ortamında tohum eksplantlarında kallus gelişimi

4.1.2. Yaprak eksplantında kallus oluşumu

İn vitro sürgünlerden **Bölüm 3.4.**'te belirtilen şekilde elde edilen yaprak eksplantları farklı hormon kombinasyonlarını içeren besi ortamlarında kültüre alınarak kallus oluşturma potansiyeli incelendi. 4 haftalık kültür periyodu sonunda elde edilen veriler **Çizelge 4.2.**'de gösterildi.

Çizelge 4.2. Yaprak eksplantının farklı besi ortamlarında kallus oluşturma potansiyeli

Besiyeri	Kallus Oluşturma Yüzdesi	Kallus Morfolojisi
Y _{M1} -0.5 mg/L ⁻¹ Kin+2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%96	Açık yeşil, şeffaf, taneli
Y _{M2} -0.5 mg/L ⁻¹ BAP+2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%75	Kahverengi, şeffaf, taneli
Y _{M3} -1.0 mg/L ⁻¹ Kin+2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%75	Açık yeşil, şeffaf, taneli
Y _{M4} -1.0 mg/L ⁻¹ BAP+2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%50	Açık yeşil, şeffaf, taneli
Y _{M5} -0.5 mg/L ⁻¹ Kin+1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%70	Açık yeşil, şeffaf, taneli
Y _{M6} -0.5 mg/L ⁻¹ BAP+1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%50	Açık yeşil, şeffaf, taneli
Y _{M7} -1.0 mg/L ⁻¹ Kin+1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%70	Açık yeşil, şeffaf, taneli
Y _{M8} -1.0 mg/L ⁻¹ BAP+1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%50	Kahverengi, şeffaf, taneli

Veriler kültürün 28. gününde 10 eksplantın ortalamasını göstermektedir.

Çizelge 4.2.'de görüldüğü gibi, 1/1 MS besi ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarında test edilen tüm hormon kombinasyonlarında (Y_{M1}, Y_{M2}, Y_{M3}, Y_{M4}, Y_{M5}, Y_{M6}, Y_{M7}, Y_{M8}) kallus oluşumu gözlemlendi. Yapılan gözlemlerde kültüre alındıktan 1 hafta sonra yaprak eksplantlarının şişerek hacimlerinin arttığı daha sonraki günlerde ise

şeffaf açık renkte kallus oluşturduğu belirlendi (**Şekil 4.7.**). 4 haftalık kültür periyodu sonunda, test edilen hormon kombinasyonları içerisinde en yüksek kallus oluşum yüzdesi %96 ile Y_{M1} besi ortamından elde edilmiştir (**Şekil 4.8.**). Oluşan kalluslar morfolojik olarak incelendiğinde genel olarak, taneli dokulu, yeşil, sarı/açık kahverenginde ve şeffaf görünümlü olduğu belirlendi.



Şekil 4.7. Y_{M1} besi ortamında kültüre alındıktan 1 hafta sonra yaprak eksplantlarında kallus gelişimi



Şekil 4.8. Y_{M1} besi ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra yaprak eksplantlarında kallus gelişimi

Kallus oluşumuna oksin–sitokin kombinasyonunun etkisi karşılaştırıldığında besi ortamında kullanılan sitokinininden (BAP ve Kin) ziyade oksin (2,4-D) konsantrasyonunun daha etkili olduğu ve özellikle oksin 2.0 mg/L^{-1} 2,4-D'nin yüksek konsantrasyonlarını içeren besi yerinde (Y_{M1} , Y_{M2} , Y_{M3}) daha yoğun ve taneli yapıda kallus oluştuğu belirlendi (**Şekil 4.9.**, **Şekil 4.10.** ve **Şekil 4.11.**). Test edilen BAP ve Kin konsantrasyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise Kin içeren hormon kombinasyonlarının (Y_{M5} -%70, Y_{M7} -%70) aynı miktarda BAP içeren hormon kombinasyonlarından (Y_{M6} -%50, Y_{M8} -%50) daha yoğun kallus oluşturduğu tespit edildi (**Şekil 4.12.** ve **Şekil 4.13.**). Bununla birlikte Y_{M1} besi ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarından 2 materyalde inkübasyondan yaklaşık 2 hafta sonra kallus oluşturmadan doğrudan kök oluşumu görüldü (**Şekil 4.14.** ve **Şekil 4.15.**).



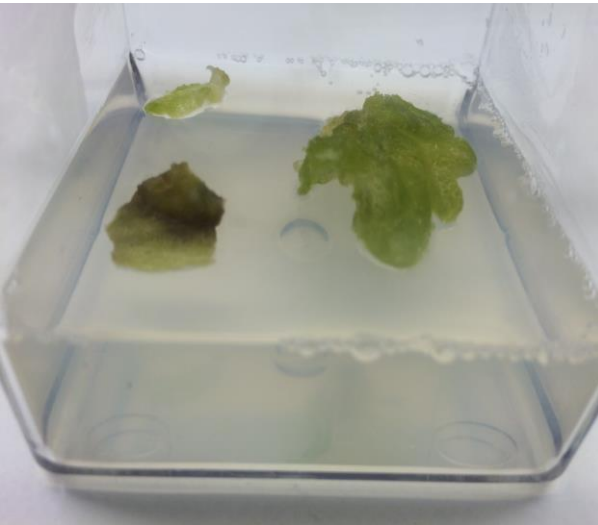
Şekil 4.9. Y_{M2} besi ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra yaprak eksplantlarında kallus gelişimi



Şekil 4.10. Y_{M3} besi ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra yaprak eksplantlarında kallus gelişimi



Şekil 4.11. Y_{M4} besi ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra yaprak eksplantlarında kallus gelişimi



Şekil 4.12. Y_{M5} besi ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra yaprak eksplantlarında kallus gelişimi



Şekil 4.13. Y_{M6} besi ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra yaprak eksplantlarında kallus gelişimi



Şekil 4.14. Y_{M1} besi ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarından doğrudan kök gelişimi



Şekil 4.15. Y_{M1} besi ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarından doğrudan kök gelişimi

4.1.3. Kök eksplantında kallus oluşumu

In vitro sürgünlerden **Bölüm 3.4.**'te belirtilen şekilde elde edilen kök eksplantları farklı hormon kombinasyonlarını içeren besi ortamlarında kültüre alınarak kallus oluşturma potansiyeli incelendi. 4 haftalık kültür periyodu sonunda elde edilen veriler **Çizelge 4.3.**'te gösterildi.

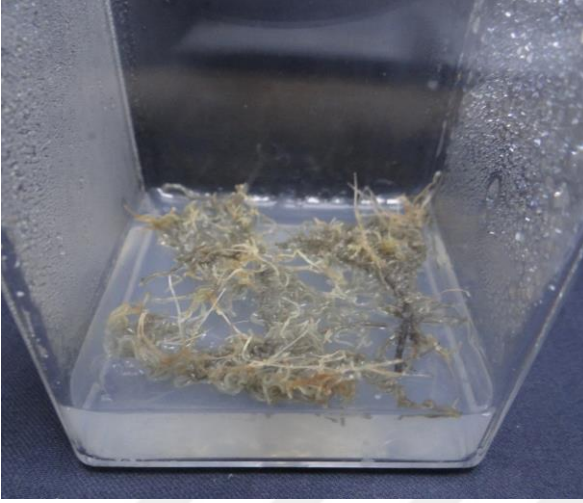
Çizelge 4.3. Kök eksplantının farklı besi ortamlarında kallus oluşturma potansiyeli

Besiyeri	Kallus Oluşturma Yüzdesi	Kallus Morfolojisi
K _{M1} -0.5 mg/L ⁻¹ Kin+2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%60	Sarı, şeffaf, taneli
K _{M2} -0.5 mg/L ⁻¹ BAP+2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%25	Koyu kahve, şeffaf, dağınık
K _{M3} -1.0 mg/L ⁻¹ Kin+2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%50	Koyu kahve, şeffaf, taneli
K _{M4} -1.0 mg/L ⁻¹ BAP+2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%25	Koyu kahve, şeffaf, dağınık
K _{M5} -0.5 mg/L ⁻¹ Kin+1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%50	Koyu kahve, şeffaf, dağınık
K _{M6} -0.5 mg/L ⁻¹ BAP+1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%25	Koyu kahve, şeffaf, dağınık
K _{M7} -1.0 mg/L ⁻¹ Kin+1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%50	Koyu kahve, şeffaf, dağınık
K _{M8} -1.0 mg/L ⁻¹ BAP+1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%25	Koyu kahve, şeffaf, dağınık

Veriler kültürün 28. gününde 10 eksplantın ortalamasını göstermektedir.

Çizelge 4.3.'te görüldüğü gibi, 1/1 MS besi ortamında kültüre alınan kök eksplantlarında test edilen tüm hormon kombinasyonlarında (K_{M1}, K_{M2}, K_{M3}, K_{M4}, K_{M5}, K_{M6}, K_{M7}, K_{M8}) kallus oluşumu gözlemlendi. İlk kallus oluşumu 1 haftalık kültür periyodu sonunda K_{M1}, K_{M3}, K_{M5}ve K_{M7} besiyerlerinde inkübe edilen eksplantlarda görüldü, 4

hafta sonunda ise gelişen kallusların başlangıç materyalinin 3-4 katı büyüklüğüne ulaştığı belirlendi. Buna karşın K_{M2} , K_{M4} , K_{M6} ve K_{M8} besi ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda az miktarda gelişen kallus oluşumu 3. ve 4. hafta sonunda görüldü. En yüksek kallus oluşumu %60 ile K_{M1} hormon kombinasyonunu içeren besi ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.16.). Gelişen kalluslar morfolojik olarak incelendiğinde, genel olarak taneli/dağınık dokulu, koyu kahverenginde ve şeffaf görünümlü olduğu belirlendi (Şekil 4.17. ve Şekil 4.18.).



Şekil 4.16. K_{M1} besi ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra kök eksplantlarında kallus gelişimi

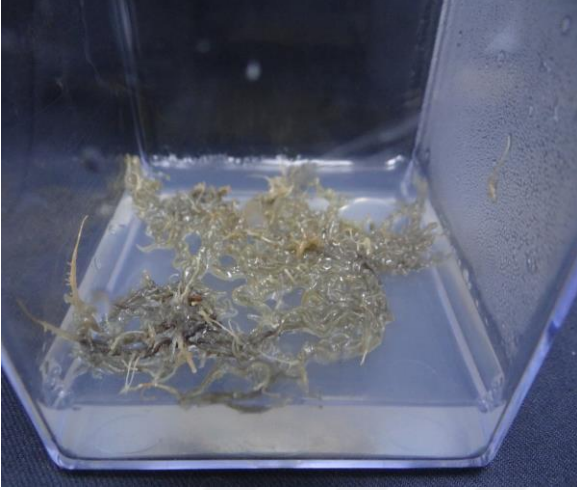


Şekil 4.17. K_{M2} besi ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra kök eksplantlarında kallus gelişimi



Şekil 4.18. K_{M3} besi ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra kök eksplantlarında kallus gelişimi

Besi ortamında kullanılan oksin (2,4-D) konsantrasyonunun oluşan kallusun morfolojik yapısında ve miktarında etkili olmadığı belirlendi (K_{M1} , K_{M3} , K_{M5} , K_{M7}). Test edilen sitokininler kendi aralarında karşılaştırıldığında ise Kin içeren hormon kombinasyonlarının ($K_{M5}\%50$, $K_{M7}\%50$) aynı miktarda BAP içeren hormon kombinasyonlarından ($K_{M6}\%25$, $K_{M8}\%25$) daha yoğun kallus oluşturduğu tespit edildi (Şekil 4.19., Şekil 4.20. ve Şekil 4.21.).



Şekil 4.19. K_{M5} besi ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra kök eksplantlarında kallus gelişimi



Şekil 4.20. K_{M6} besi ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra kök eksplantlarında kallus gelişimi



Şekil 4.21. K_{M8} besi ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra kök eksplantlarında kallus gelişimi

4.1.4. Gövde eksplantında kallus oluşumu

İn vitro sürgünlerden **Bölüm 3.4.**'te belirtilen şekilde elde edilen gövde eksplantları farklı hormon kombinasyonlarını içeren besi ortamlarında kültüre alınarak kallus oluşturma potansiyeli incelendi. 4 haftalık kültür periyodu sonunda elde edilen veriler **Çizelge 4.4.**'te gösterildi.

Çizelge 4.4. Gövde eksplantının farklı besi ortamlarında kallus oluşturma potansiyeli

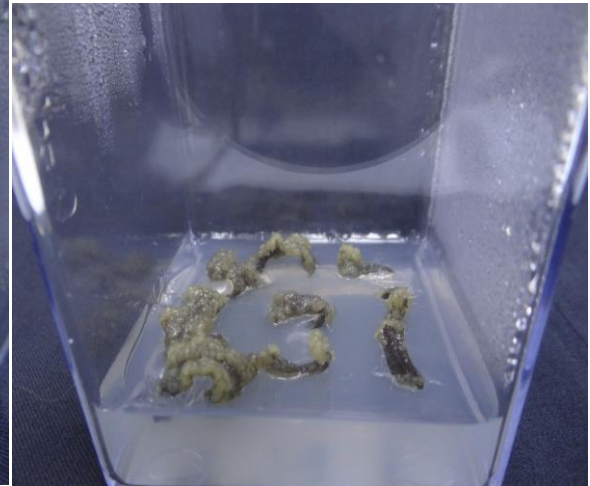
Besiyeri	Kallus Oluşturma Yüzdesi	Kallus Morfolojisi
G _{M1} -0.5 mg/L ⁻¹ Kin+2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%25	Açık kahve, şeffaf, dağınık
G _{M2} -0.5 mg/L ⁻¹ BAP+2.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%10	Koyu kahve, şeffaf, dağınık
G _{M3} -1.0 mg/L ⁻¹ Kin+1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%15	Koyu kahve, şeffaf, dağınık
G _{M4} -1.0 mg/L ⁻¹ BAP+1.0 mg/L ⁻¹ 2,4-D	%10	Koyu kahve, şeffaf, dağınık

Veriler kültürün 28. gününde 10 eksplantın ortalamasını göstermektedir.

Çizelge 4.4.'te görüldüğü gibi, 1/1 MS besi ortamında kültüre alınan gövde eksplantlarında test edilen tüm hormon kombinasyonlarında (G_{M1}, G_{M2}, G_{M3}, G_{M4}) kallus oluşumu gözlemlendi. Kök, yaprak, tohum eksplantlarından farklı olarak ilk kallus oluşumu daha geç (2 haftalık kültür periyodu sonunda) G_{M1}besiyerinde inkübe edilen eksplantlarda görüldü ve 4 haftalık periyod sonunda oluşan kallusların başlangıç materyalinin 2-3 katı büyüklüğüne ulaştığı belirlendi (**Şekil 4.22.**). Buna karşın G_{M2}, G_{M3}, G_{M4} besi ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda az miktarda oluşan kallus oluşumu 4. hafta sonunda görüldü (**Şekil 4.23.**). En yüksek kallus oluşum yüzdesi %25 ile G_{M1} hormon kombinasyonunu içeren besi ortamından elde edilmiştir. Genel olarak oluşan kalluslar morfolojik olarak incelendiğinde, dağınık dokulu, koyu kahverenginde olup şeffaf görümlü olduğu belirlendi. Besi ortamında kullanılan oksin (2,4-D) konsantrasyonunun oluşan kallusun morfolojik yapısında ve miktarında etkili olmadığı belirlendi (G_{M1}, G_{M3}). Test edilen sitokinler kendi aralarında karşılaştırıldığında ise Kin içeren hormon kombinasyonlarının (G_{M1}-%25, G_{M3}-%15) aynı miktarda BAP içeren hormon kombinasyonlarından (G_{M2}-%10, G_{M4}-%10) daha yoğun kallus oluşturduğu tespit edildi. Test edilen bütün eksplantların gelişim yüzdesi (%) karşılaştırıldığında; gövde eksplantlarında kallus gelişim yüzdesinin çok düşük oranlarda olduğu belirlendi.



Şekil 4.22. G_{M1} besi ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra gövde eksplantlarında kallus gelişimi



Şekil 4.23. G_{M2} besi ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra gövde eksplantlarında kallus gelişimi

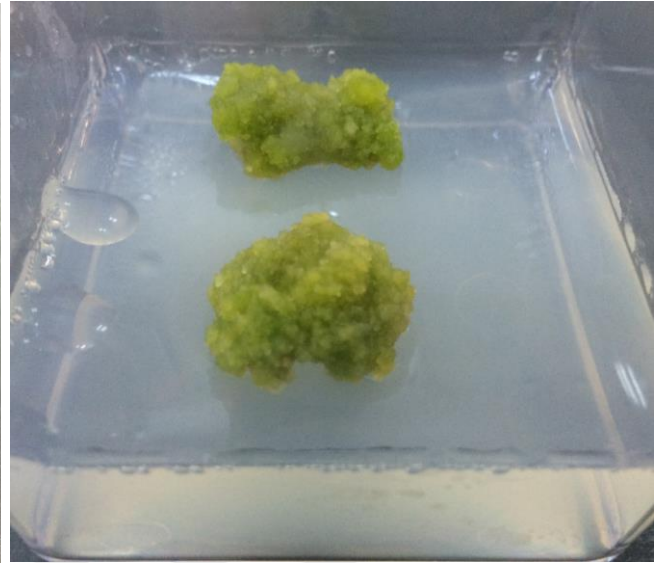
4.2. Kallus Geliştirme Çalışmaları

Ajuğa vestita'nın farklı eksplantlarından Bölüm 4.1.'de belirtilen şekilde oluşan kallus dokuları, önce 1/1 hormonsuz besi ortamında kültüre alındı ve yaklaşık 4 hafta bekletildi. Daha sonra gelişen kalluslar sürgün elde etme potansiyelinin incelenmesi için BAP-Kin'in farklı konsantrasyonlarına, belirli aralıklarla (4-5 hafta) birkaç kere alt kültüre alındı.

Hormonsuz besi ortamına aktarılan kallusların 4 haftalık kültür periyodu sonunda yoğunluk bakımından arttığı ve başlangıç eksplantının yaklaşık 2-3 katına ulaştığı belirlendi. Kök ve gövde eksplantlarında oluşan kallusların hormonsuz besi ortamına aktarıldığında koyu kahverengine dönüştüğü ve 4 haftalık kültür periyodu sonunda tamamıyla karardığı görüldü. Bu nedenle, bu eksplantlar kallus geliştirme ve sürgün elde etme çalışmalarında kullanılmadı. Buna karşın yaprak ve tohum eksplantlarından elde edilen kallus dokusunun hormonsuz besi ortamında yeşil renkte kallus oluşturduğu gözlemlendi ve oluşan bu kalluslar sürgün elde etme çalışmalarında kullanıldı (Şekil 4.24. ve Şekil 4.25.).



Şekil 4.24. Yaprak eksplantlarından elde edilen kallusların hormonsuz besi ortamında gelişimi



Şekil 4.25. Tohum eksplantlarından elde edilen kallusların hormonsuz besi ortamında gelişimi

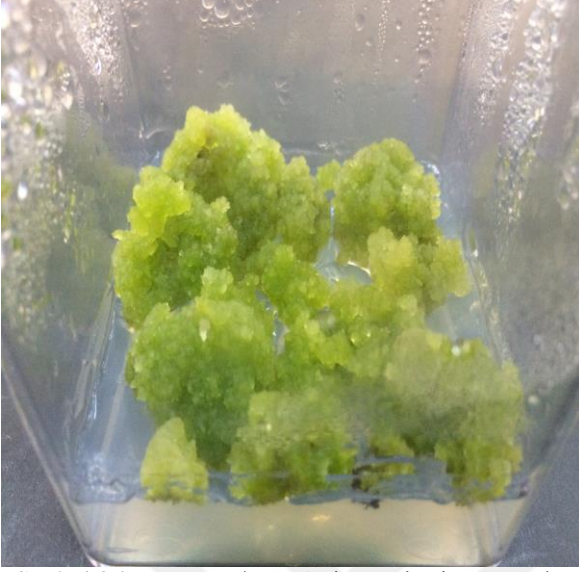
Çizelge 4.5. Kinetin içeren besi yerinde kallus ve sürgün elde etme potansiyeli

Besiyeri	Kallus Morfolojisi	Kök oluşumu	Sürgün oluşumu
0.125 mg/L ⁻¹ Kin	Yeşil, taneli, şeffaf	Yok	Tomurcuk oluşumu
0.5 mg/L ⁻¹ Kin	Yeşil, taneli, şeffaf	Çok sayıda	Tomurcuk oluşumu
1.0 mg/L ⁻¹ Kin	Yeşil, taneli, şeffaf	Yok	Tomurcuk oluşumu
2.0 mg/L ⁻¹ Kin	Açık kahverengi, taneli, şeffaf	Çok sayıda	Yok
4.0 mg/L ⁻¹ Kin	Açık kahverengi, taneli, şeffaf	Çok sayıda	Yok
6.0 mg/L ⁻¹ Kin	Yeşil, taneli, şeffaf	Çok sayıda	Tomurcuk oluşumu
8.0 mg/L ⁻¹ Kin	Açık kahverengi, taneli, şeffaf	Yok	Yok
10.0 mg/L ⁻¹ Kin	Açık kahverengi, taneli, şeffaf	Çok sayıda	Yok

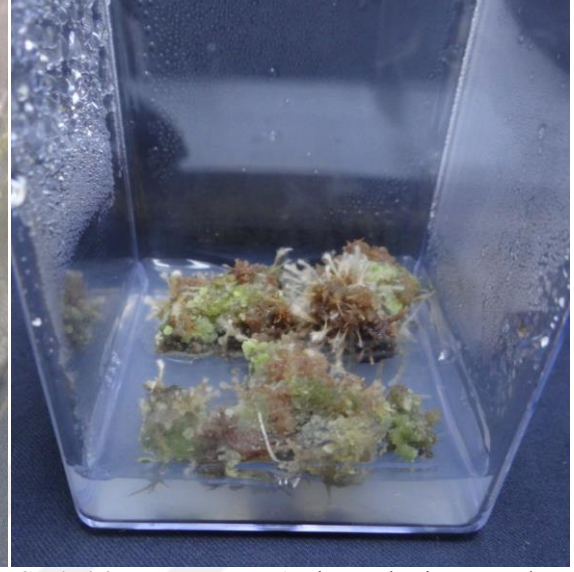
Veriler kültürün 28. gününde 10 eksplantın ortalamasını göstermektedir.

Sürgün elde etme amacı ile Kin'in farklı konsantrasyonlarını içeren besi yerine aktarılan eksplantların **Çizelge 4.5.**'de görüldüğü gibi yoğun bir şekilde gelişmeye devam ettiği belirlendi (**Şekil 4.26.**). Oluşan kalluslar morfolojik olarak incelendiğinde, yeşil-açık kahverenginde, taneli ve şeffaf olduğu gözlemlendi. Test edilen Kin'in tüm konsantrasyonlarında sürgün oluşumuna rastlanmadı. Ancak 0.5-2.0-6.0-10.0 mg/L⁻¹ Kin içeren besi ortamlarında oluşan kalluslarda kısa (yaklaşık 0.5-1.0 cm) ve çok sayıda kök oluşumu gözlemlendi (**Şekil 4.27.** ve **Şekil 4.28.**). Ancak 0.125-0.5-1.0-6.0 mg/L⁻¹ Kin içeren besi ortamında oluşan kallusların üzerinde yoğun tomurcuk oluşumu da belirlendi (**Şekil 4.29.**). Bu besi ortamındaki eksplantlar 4 hafta aralıklarla kendi besi ortamlarında alt kültüre alındığında kök veya sürgün oluşumuna rastlanmazken koyu

yeşil ve taneli çok yoğun kallus gelişimine devam ettiği tespit edildi (Şekil 4.30. ve Şekil 4.31.).



Şekil 4.26. 0.125 mg/L⁻¹ Kin içeren besi ortamında kallus gelişimi



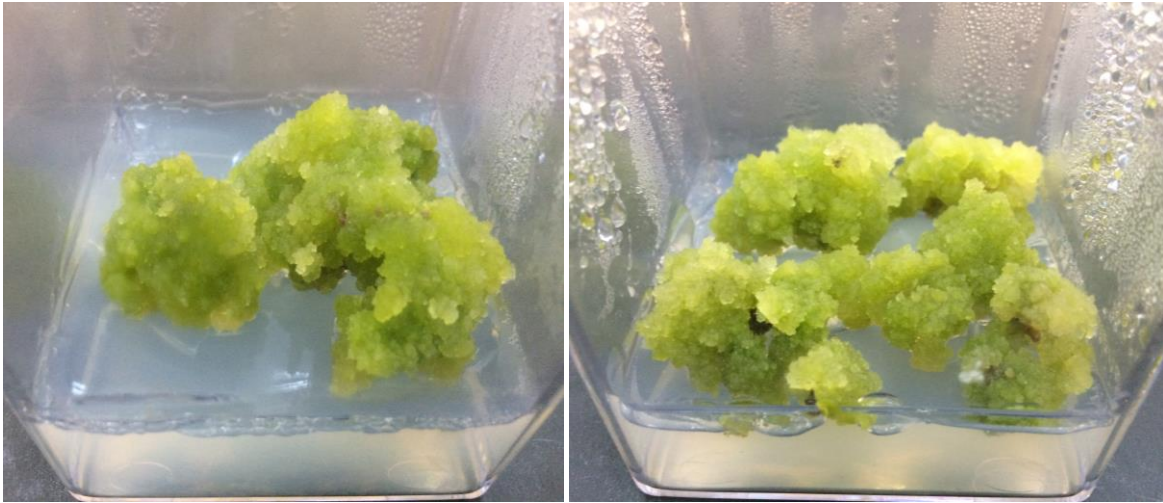
Şekil 4.27. 0.5 mg/L⁻¹ Kin içeren besi ortamında kültüre alınan kalluslarda kök gelişimi



Şekil 4.28. 4.0 mg/L⁻¹ Kin içeren besi ortamında kültüre alınan kalluslarda kök gelişimi



Şekil 4.29. 1.0 mg/L⁻¹ Kin içeren besi ortamında kallus gelişimi



Şekil 4.30. 6.0 mg/L⁻¹ Kin içeren besi ortamında alt kültüre alındıktan sonra kallus gelişimi

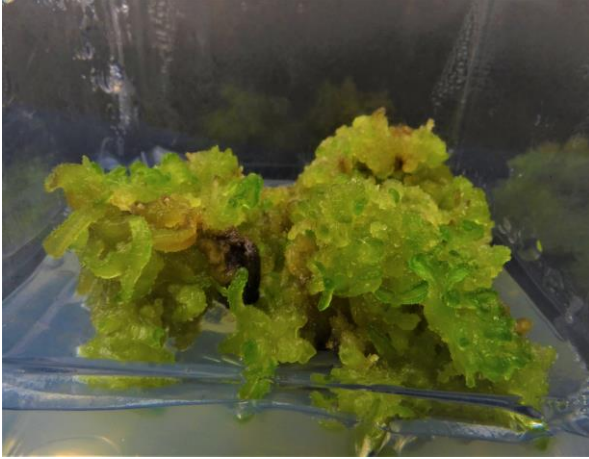
Şekil 4.31. 0.5 mg/L⁻¹ Kin içeren besi ortamında alt kültüre alındıktan sonra kallus gelişimi

Çizelge 4.6. BAP içeren besi yerinde kallus ve sürgün elde etme potansiyeli

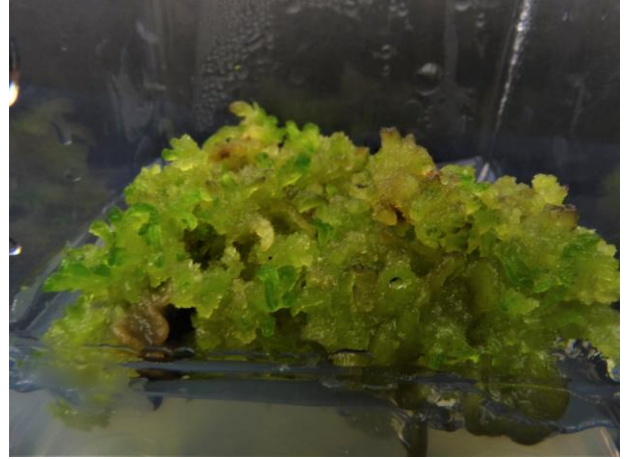
Besiyeri	Kallus Morfolojisi	Kök oluşturma	Sürgün oluşturma
0.125 mg/L ⁻¹ BAP	Açık kahverengi, taneli, şeffaf	Yok	Çok sayıda
0.5 mg/L ⁻¹ BAP	Yeşil, taneli, şeffaf	Yok	Çok sayıda
1.0 mg/L ⁻¹ BAP	Yeşil, taneli, şeffaf	Yok	Tomurcuk oluşumu
2.0 mg/L ⁻¹ BAP	Açık kahverengi, taneli, şeffaf	Yok	Yok
4.0 mg/L ⁻¹ BAP	Açık kahverengi, taneli, şeffaf	Çok sayıda	Yok
6.0 mg/L ⁻¹ BAP	Yeşil, taneli, şeffaf	Yok	Tomurcuk oluşumu
8.0 mg/L ⁻¹ BAP	Açık kahverengi, taneli, şeffaf	Yok	Yok
10.0 mg/L ⁻¹ BAP	Açık kahverengi, taneli, şeffaf	Çok sayıda	Yok

Veriler kültürün 28. gününde 10 eksplantın ortalamasını göstermektedir.

BAP'ın farklı konsantrasyonlarını içeren besi ortamında sürgün elde etme potansiyelini incelemek amacıyla aktarılan kallusların Çizelge 4.6.'da görüldüğü gibi kallus oluşturmaya devam ettiği belirlendi. Oluşan kalluslar morfolojik olarak incelendiğinde yeşil-açık kahverenginde, taneli yapıda olduğu gözlemlendi. 0.125 ve 0.5 mg/L⁻¹ BAP içeren besi ortamlarında kültüre alındıktan 5 hafta sonra sürgün oluşumu (Şekil 4.32. ve Şekil 4.33.), 4.0 ve 10 mg/L⁻¹ BAP içeren besi ortamında oluşan kalluslarda ise kök oluşumu tespit edildi (Şekil 4.34.). Tüm besi ortamındaki kalluslar 4 hafta aralıklarla kendi besi ortamlarında alt kültüre alındığında kök veya sürgün oluşumuna rastlanmazken koyu yeşil ve taneli çok yoğun kallus gelişimine devam ettiği tespit edildi (Şekil 4.35. ve Şekil 4.36.).



Şekil 4.32. 0.125 mg/L⁻¹ BAP içeren besi ortamında kültüre alınan kalluslarda sürgün gelişimi



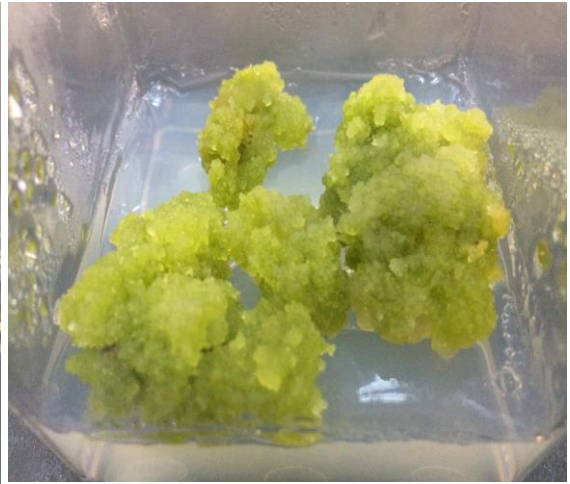
Şekil 4.33 0.5 mg/L⁻¹ BAP içeren besi ortamında kültüre alınan kalluslarda sürgün gelişimi



Şekil 4.34. 4.0 mg/L⁻¹ BAP içeren besi ortamında kültüre alınan kalluslarda kök gelişimi



Şekil 4.35. 6.0 mg/L⁻¹ BAP içeren besi ortamında kallus gelişimi



Şekil 4.36. 1.0 mg/L⁻¹ BAP içeren besi ortamında kallus gelişimi

4.3. Oluşan Kallusların Toplam Fenolik ve Flavonoid Miktarı

BAP ve Kin'in farklı konsantrasyonlarından elde edilen kallusların toplam fenolik ve flavonoid miktarları gallik asit ve kersetine eş değer olarak belirlendi, veriler **Çizelge 4.7.**'de verildi.

Çizelge 4.7. Kallus ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoid miktarı

Ekstreler	Toplam Fenolik İçeriği ($\mu\text{g GAE/mg ekstre}$)	Toplam Flavonoid İçeriği ($\mu\text{g QEs/mg ekstre}$)
Aseton	190.35 \pm 4.64	55.19 \pm 2.02
Metanol	164.39 \pm 3.40	44.49 \pm 1.53

Ajuga vestita'nın farklı kısımlarından elde edilen kalluslardan hazırlanan aseton ekstresinin toplam fenolik ve flavonoid miktarının metanol ekstresinden daha fazla olduğu belirlendi. **Çizelge 4.7.**'de görüldüğü gibi 1 mg aseton ekstresindeki gallik asite eş değer toplam fenolik madde miktarı 190 μg , kersetine eş değer toplam flavonoid miktarı ise 55 μg olarak belirlendi. Ayrıca 1 mg metanol ekstresindeki gallik asite eş değer toplam fenolik madde miktarı 164 μg , kersetine eş değer toplam flavonoid miktarı ise 44 μg olduğu tespit edildi.

4.4. Oluşan Kallusların DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi

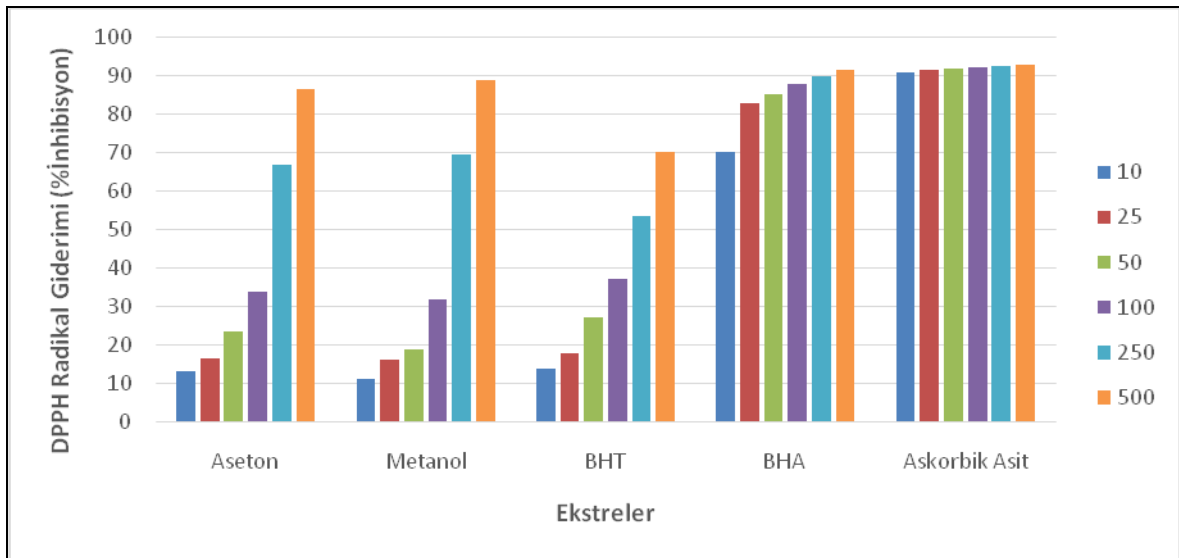
Ajuga vestita'nın farklı kısımlarından elde edilen kalluslardan hazırlanan aseton ve metanol ekstralarının DPPH serbest radikali giderim aktivitesi 6 farklı konsantrasyonda (10-25-50-100-250-500 $\mu\text{g/L}^{-1}$) belirlendi ve veriler **Çizelge 4.8.** ve **Şekil 4.37.**'de gösterildi.

Çizelge 4.8. Kallus ekstralarının ve pozitif kontrollerin serbest radikal giderim aktiviteleri (DPPH)

Konsantrasyonlar	Aseton	Metanol	BHT	BHA	Askorbik Asit
10 $\mu\text{g/L}^{-1}$	13.48 \pm 0.55	11.44 \pm 0.31	13.84 \pm 0.49	70.40 \pm 0.43	91.07 \pm 0.24
25 $\mu\text{g/L}^{-1}$	16.58 \pm 0.42	16.47 \pm 0.30	18.12 \pm 0.42	83.05 \pm 0.68	91.82 \pm 0.07
50 $\mu\text{g/L}^{-1}$	23.50 \pm 0.24	18.86 \pm 0.47	27.27 \pm 0.90	85.45 \pm 0.25	92.05 \pm 0.18
100 $\mu\text{g/L}^{-1}$	33.88 \pm 0.67	31.99 \pm 0.30	37.46 \pm 0.70	88.05 \pm 0.23	92.37 \pm 0.55
250 $\mu\text{g/L}^{-1}$	67.13 \pm 0.76	69.65 \pm 0.83	53.73 \pm 0.87	89.85 \pm 0.20	92.57 \pm 0.11
500 $\mu\text{g/L}^{-1}$	86.79 \pm 0.20	88.91 \pm 0.31	70.20 \pm 0.49	91.54 \pm 0.30	93.00 \pm 0.18

Kallus ekstralarının **Çizelge 4.8.**'de görüldüğü gibi test edilen aseton konsantrasyonları arasında, %86.79 inhibisyon ile 500 $\mu\text{g/L}^{-1}$ konsantrasyonunda en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiği belirlendi. Test edilen metanol

konsantrasyonları arasında ise, %88.91 inhibisyon ile yine 500 $\mu\text{g/L}^{-1}$ konsantrasyonunda en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiği tespit edildi.



Şekil.4.37. Kallus ekstralarının ve pozitif kontrollerin serbest radikal giderim aktiviteleri (DPPH)

Şekil 4.37.'de verilen sonuçlara göre kallus ekstralarının, DPPH yöntemiyle en yüksek antioksidan aktiviteyi 500 $\mu\text{g/L}^{-1}$ konsantrasyonundaki aseton ve metanol ekstralarının gösterdiği bunun yanında 250 ve 500 $\mu\text{g/L}^{-1}$ konsantrasyonundaki aseton ve metanol ekstralarının aynı konsantrasyonlardaki pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'den daha yüksek etkiye sahip oldukları tespit edildi.

Ajuga türleri sahip olduğu tıbbi öneminden dolayı fitokimyasal ve farmakolojik çalışmalarda kullanılmak için genellikle doğal habitat alanından toplanmaktadır. Bu durum doğanın tahribatı ile birlikte türün yok olmasında önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Genellikle zayıf tohum çimlenmesi, yavaş vejetatif çoğalma oranına sahip olması ve sağlıklı bitki materyalinin az olmasından dolayı Ajuga bitkisinin geleneksel yöntemler ile çoğaltılması oldukça zordur. Az sayıda tohum üreten ve tohum çimlenmesi güçlüğü bulunan yada sera şartlarında çimlenme sonrası fide gelişimi güçlüğü yaşayan tehlike altındaki türlerin *exsitu* üretimi söz konusu olduğu durumlarda bitki doku kültürü teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. *In vitro* bitki kültürü, nadir bitkilerin korunmasında, klonal çoğaltılmasında ve iyileştirilmesinde alternatif bir teknik olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Benson, 1999; Sivanesan ve Park, 2015a). Bu teknik kriyoprezervasyon, genetik mühendisliği, mutasyon ıslahı, hastaliksız bitki ve sekonder metabolitlerin üretimi, somaklonal varyasyon gibi çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda ve donör bitkide bulunan biyoaktif bileşiklerin

üretilmesinde kullanılmıştır (Park ve ark., 2017; Namli ve ark., 2018; Işıksalan ve ark., 2011).

Yaptığımız literatür taramalarına göre daha önce *in vitro* adventif sürgün rejenerasyonunun sadece üç *Ajuga* türü için yapıldığı belirlenmiştir. *Ajuga vestita* bitkisi ile ilgili yaptığımız kallus ve kallustan sürgün rejenerasyonunun sonuçları, bu bitki türü için bir ilk olma özelliği taşımaktadır.

Adventif sürgün rejenerasyonu potansiyeli tür, kullanılan eksplant tipi, kültür besi ortamı, BBD'leri ve kültür koşulları tarafından etkilendiği, ancak tüm çalışmalarda ortak olarak MS besi ortamının iyi sonuçlar verdiği vurgulanmıştır. *Ajuga* türlerinde adventif sürgün oluşumunun besi ortamına ilave edilen BBD'lere bağımlı olarak farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Park ve ark., 2017). Literatürle uyumlu olarak *Ajuga vestita* bitkisi ile ilgili farklı eksplant tipleri ve BBD'leri içeren tüm çalışmalarda MS besi ortamını kullandık ve olumlu sonuçlar elde edildi.

In vitro kültür çalışmalarında kullanılacak olan eksplantların seçimi önemlidir, çünkü eksplantlar türden türe farklılık gösteren sürgün rejenerasyonu potansiyeline sahip olmaktadır. Bununla birlikte totipotent özelliğin genç sürgün ve organlarda daha fazla olduğu bilinmektedir (Babaoğlu ve ark., 2002). Matkowski (2004), steril genç fiderlerden alınan eksplantların daha güçlü ve erken kallus verdiklerini rapor etmiştir. *Ajuga* türlerinde doğrudan veya dolaylı olarak sürgün rejenerasyonunda yaprak, yaprak sapı, internod ve kök eksplantları yaygın olarak kullanılmıştır (Sivanesan ve Jeong, 2014; Kaul ve ark., 2013; Jan ve ark., 2014; Sivanesan ve ark., 2011; Sivanesan ve ark., 2016). Bu literatür bilgisi ışığında *Ajuga vestita* bitkisi ile ilgili yaptığımız kallus ve kallustan sürgün rejenerasyonu çalışmasında, olgun tohumdan elde edilen *in vitro* aksenik sürgünlerin yaprak, gövde, kök kısımları ile testası çatlatılmış olgun tohumları başlangıç eksplantları olarak kullandık. Genel olarak farklı oksin ve sitokin kombinasyonlarının bulunduğu besi ortamında kültüre alınan tüm eksplant tiplerinde kallus oluşumu elde etmemiz ile birlikte yaprak (%96) ve testası çatlatılmış tohumların (%95) kallus kültürüne en iyi cevap veren eksplant tipleri olduğunu belirledik. Kaul ve ark. (2013) *Ajuga bracteosa*'nın yaprak, yaprak sapı ve kök eksplantlarını IAA ve BA içeren MS besi ortamında kültüre aldıklarında, üç eksplant çeşidi arasından, yaprağın en hızlı tepkiyi verdiğini yaprak sapının ise kallus oluşumu bakımında en kötü yanıtı verdiğini bildirmişlerdir.

Kallus oluşumu üzerinde besi ortamına tek başına veya birlikte kullanılan oksin ve sitokinler kallus miktarı ve yapısı üzerinde etkili olmaktadır. Örneğin A.

reptans'ın nodal eksplantlarından, 10 µM BA içeren MS besi ortamında (Preece ve Huetteman, 1994), *Ajuga bracteosa*'nın yaprak eksplantlarında 5.0 mg/L⁻¹ BAP, petiyoleksplantlarında 2.0 mg/L⁻¹ BAP+3.0 mg/L⁻¹ IAA ve internodal eksplantlarda 2.0 mg/L⁻¹ BAP+5.0 mg/L⁻¹ NAA içeren MS besi ortamlarında (Jan ve ark., 2014) maksimum kallus üretildiği bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada *Ajuga vestita* bitkisinin kültüre alınan eksplantlarında (yaprak, tohum, kök ve gövde) maksimum kallus oluşumunun test edilen hormon kombinasyonları arasından 0.5 mg/L⁻¹ Kin+2.0 mg/L⁻¹ 2,4-D içeren besi ortamında olduğu belirlendi.

Doku kültürü çalışmalarında kullanılan BBD'lerin cinsi ve dozu, amaca göre değişmekle birlikte, genellikle yüksek sitokinin/düşük oksin dozları aksillar sürgün oluşumunda olumlu sonuçlar verebilmektedir. Bununla birlikte sitokinin bazen tek başına kullanımı da yeterli olabilmektedir. Yaprak ve tohum eksplantlarından elde ettiğimiz kalluslardan sürgün elde etmek için, MS besi ortamlarına BAP ve Kin'in farklı konsantrasyonlarını (0.125, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mg/L⁻¹) ilave ettik. 0.125 ve 0.5 mg/L⁻¹ BAP içeren besi ortamlarında kültüre alınan kalluslarda yaklaşık 5 hafta sonra sürgün oluşumuna rastladık. 4.0-10.0 mg/L⁻¹ BAP içeren besi ortamında ve Kin konsantrasyonlarının çoğunda oluşan kalluslarda ise sadece kök oluşumu elde ettik. BAP, mikroçoğaltımda çok kullanılan ve olumlu sonuçlar verdiği bilinen bir sitokinin çeşididir. Yaptığımız çalışmada da BAP sürgün rejenerasyonu bakımından kinetinden daha olumlu sonuç verdi. Sonuçlarımızla paralel olarak Kayani ve ark.(2016), *Ajuga bracteosa*'nın yaprak sapından elde ettiği kallusun 3.6 mg/L⁻¹ BA içeren MS besi ortamında adventif sürgün oluşturduğunu bildirmişlerdir. Jan ve ark (2014), sürgün rejenerasyonu için, yaprak eksplantlarından elde ettikleri kallusu farklı oksin (IAA, NAA) ve sitokinin (BAP, Kinetin) içeren besi ortamına aktardıklarını ve 5.0 mg/L⁻¹ BAP ile desteklenmiş MS besi ortamında maksimum sürgün elde ettiklerini bildirmişlerdir. Yine Jan ve ark. (2018), *Ajuga bracteosa*'nın *in vitro* çoğaltma protokolünü geliştirmek için petiyol ve internod eksplantlarından itibaren oluşan kallusları BBD'lerinin bulunduğu MS besi ortamında alt kültüre alarak sürgün regenerasyonu elde etmişlerdir. Petiyol eksplantlarında maksimum sürgün sayısını 3 mg/L⁻¹ BAP içeren (%80) MS besi ortamında, internod eksplantında ise 2 mg/L⁻¹ BAP ve 5 mg/L⁻¹ NAA içeren MS besi ortamında (%100) sağlandığını rapor etmişlerdir. Preece ve Huetteman (1994), *A. reptans*'ın nodal eksplantlarından 10 µM BA içeren MS besi ortamında maksimum adventif sürgün (5.6 adet) elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Bununla birlikte Sivanesan ve ark. (2011), *A. multiflora*'nın yaprak ve

yaprak sapı eksplantlarının üç farklı sitokinin (BA, 2iP, TDZ) içerisinde 4 μ M TDZ içeren besi ortamında maksimum sayıda sürgün oluşturduğunu bildirmişlerdir. Sivanesan ve Jeong (2014), *A. multiflora*'nın yaprak ve yaprak sapı eksplantlarını, 12.2 μ M 2iP, 5.7 μ M IAA ve 7.2 mM'de silisyum içeren MS besi ortamında en iyi sürgün oluşumunun (eksplant başına 23 sürgün) gözlendiğini belirlemişlerdir.

Günümüzde sentetik maddelerin kullanımının yan etkiler yapması, doğal ürünlere olan talebin artmasına yol açmıştır. Buda kültür bitkilerinin daha çok ekimini yada doğal olarak yetişen bitkilerin doğadan daha fazla toplanması demektir. Bu durumda hem daha çok arazi tarım amaçlı kullanıma açılmak zorunda kalmakta hem de bitkinin neslinin tükenmesine yol açabilmektedir. Ayrıca elde edilecek ürün ekonomik açıdan çok değerli, buna karşılık elde edilen miktar çok düşük ise hem üretim maliyeti yükselmekte hem de zaman ve emek kaybı artmaktadır. Bu nedenle gerek farmasötik gerekse endüstriyel kullanım amacıyla bitkisel kökenli doğal bileşiklerin elde edilmesinde zaman ve emek kaybının önlenmesi, maliyetin düşürülmesi ve doğa tahribatının önlenmesi bakımından, bitki doku kültürleri yoluyla *in vitro* şartlarda üretilebilirler (Babaoğlu ve ark., 2002). *Ajuga* türlerinin antosiyanin, flavonoidler, fenolikler ve fitoekstroidler gibi değerli biyoaktif bileşiklerinin verimini arttırmak için, biyoteknolojik yaklaşımlar birçok araştırmacı tarafından *in vitro* hücre, organ, kallus ve saçak kök kültürleri yoluyla yapılmıştır (Terahara ve ark., 1996; Callebaut ve ark., 1997; Kim ve ark., 2005; Cheng ve ark., 2008; Sahakyan ve ark., 2010; Sivanesan ve ark., 2016; Ali ve ark., 2018). Filippova ve ark. (2003), *Ajuga reptans* L. kallus kültürlerinden hücre süspansiyon kültürlerini, 20-hydroxyecdysone (20E) içeriğinin doğal bitkiden 4-8 kat daha fazla olduğunu bildirmiştir.

Yaptığımız çalışmada aseton ekstresinin toplam fenolik (190.35 μ gGAE/mg ekstre) ve flavonoid (55.19 μ gQEs/mg ekstre) miktarının metanol (164.19 μ gQEs/mg ekstre-44.49 μ gGAE/mg ekstre) ekstresinden daha fazla olduğu tespit edildi. Haşimi (2012), doğadan topladığı *Ajuga vestita* bitkisine ait petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının toplam fenolik ve flavonoid içeriğini incelemiş ve metanol ekstresinin diğer ekstralardan daha fazla olduğunu belirtmiştir. Benzer şekilde Hemcinschi ve ark. (2009), *A. genevensis*'in metanol ekstresinin daha yüksek flavonoid içeriğine sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Çalışmamızda ayrıca, DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemi kullanılarak kalluslardan hazırlanan aseton ve metanol ekstralarının total antioksidan aktivite tayini incelendi. En yüksek antioksidan aktivite %88.91 inhibisyon ile 500

$\mu\text{g/L}^{-1}$ konsantrasyonundaki metanol ekstresinden 57 elde edildi. Sonucumuzla benzer şekilde Hemcinschi ve ark. (2009), *Ajuga reptans* ta, Delazar ve ark. (2012), *Ajuga chamaepytyste*, Sönmez (2016), endemik *Ajuga postii* Briq. Ve *Ajuga relictta* P.H. Davis'in DPPH yöntemini kullanarak antioksidan aktivitesini araştırmışlar ve metanol ekstresinin yüksek aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır.

Sahakyan ve ark. (2016), *A. genevensis*'in yaprak ve kök eksplantlarından elde ettiği kalluslar ile doğal ortamdaki bitkilerin biyolojik aktivitelerini ve kimyasal içeriğini karşılaştırmışlar ve kallus dokusunun doğal ortamdaki bitkilerden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir. Haşimi (2012), *Ajuga vestita*'nın doğal ortamdaki bitkilerinin DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemi kullanılarak petrol eteri, aseton ve metanol ekstrelerinin total antioksidan aktivitesini incelemiş ve en yüksek antioksidan aktivitenin %86.09 ile $500 \mu\text{g/L}^{-1}$ konsantrasyonundaki metanol ekstresinden elde edildiğini bildirmiştir. Araştırmacı $500 \mu\text{g/L}^{-1}$ konsantrasyonundaki aseton ekstresinin %70.67 aktiviteye sahip olduğunu saptamıştır. Yaptığımız çalışmada ise, kallusun $500 \mu\text{g/L}^{-1}$ konsantrasyonundaki aseton ekstresinin %86.79 aktivite gösterdi. Bu sonuç araştırmacının elde ettiği veriden anlamlı şekilde daha yüksek olduğundan dolayı yaptığımız çalışmanın sonuçları, Sahakyan ve ark. (2016), kallus dokusunun doğal ortamdaki bitkilerden daha yüksek antioksidan aktivite gösterebileceği savını destekler niteliktedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu araştırmadan elde edilen sonuç ve öneriler aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

1. *In vitro* sürgünlerin yaprak, gövde, kök kısımları ve testası çatlatılmış olgun tohumlar, sitokinin (Kin, BAP) ve oksinin (2,4-D) farklı konsantrasyonlarının bulunduğu 1/1 MS besi ortamında ayrı ayrı kültüre alındı. Çalışma sonucunda, kültüre alınan tüm eksplant çeşitleri test edilen hormon kombinasyonlarında kallus oluşturdu.
2. Kallus başlatma çalışmalarında tüm eksplant tiplerinde test edilen hormon kombinasyonları arasında en iyi cevap 0.5 mg/L^{-1} Kin+ 2.0 mg/L^{-1} 2,4-D içeren besi ortamından elde edildi.
3. 0.5 mg/L^{-1} Kin+ 2.0 mg/L^{-1} 2,4-D besi ortamında kültüre alınan yaprak (%96) ve testası çatlatılmış tohumların (%95) kallus kültürüne en iyi cevap veren eksplant tipleri olduğu saptandı.
4. Elde edilen kalluslar, önce hormonsuz besi yerinde 4 hafta kadar bekletildi. Kök ve gövde eksplantlarında oluşan kalluslar ise tamamıyla karardı.
5. Yaprak ve tohum eksplantlarından elde edilen kalluslar sürgün elde etme çalışmalarında kullanılmak üzere, BAP ve Kin'in farklı konsantrasyonlarını içeren 1/1 MS besi ortamlarında kültüre alındı.
6. 0.125 ve 0.5 mg/L^{-1} BAP içeren besi ortamlarında alt kültüre alındıktan 5 hafta sonra sürgün oluşumu görülürken 4.0 - 10.0 mg/L^{-1} BAP içeren besi ortamında ve Kin konsantrasyonlarının çoğunda oluşan kalluslarda ise sadece kök oluşumu tespit edildi.
7. BAP ve Kin'in farklı konsantrasyonlarından elde edilen kallusların toplam fenolik ve flavonoid miktarları gallik asit ve kersetine eş değer olarak belirlendi. Aseton ekstresinin fenolik ve flavonoid miktarının metanol ekstresinden daha fazla olduğu tespit edildi.
8. DPPH serbest radikal aktivitesi yöntemi kullanılarak kalluslardan hazırlanan aseton ve metanol ekstrelerinin total antioksidan aktivite tayini gerçekleştirildi. En yüksek antioksidan aktivite %88.91 inhibisyon ile $500 \text{ } \mu\text{g/L}^{-1}$ konsantrasyonundaki metanol ekstresinden elde edildi. 250 ve $500 \text{ } \mu\text{g/L}^{-1}$ konsantrasyonundaki aseton ve metanol ekstrelerinin aynı konsantrasyonlardaki pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'den daha yüksek etkiye sahip oldukları tespit edildi.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında *in vitro* çoğaltma yollarının araştırılması amacıyla *Ajuga vestita* 'nın kültüre alınan farklı eksplantlarından kallus ve kallustan sürgün elde edildi. Ayrıca oluşan kallusların toplam fenolik ve flavonoid miktarı ile DPPH serbest radikal giderim aktivitesi belirlendi.

Ajuga vestita 'nın özellikle germplazmasının korunması için *in vitro* ortamda çoğaltılması ve tekrar doğaya aktarılması kritik öneme sahiptir. Bununla birlikte bu konu ve sentetik tohum üretimi, kriyoprezervasyon, somatik embriyogenez gibi konular ile ilgili yayınlanmış çok az literatür bulunmaktadır. Bu bağlamda yaptığımız çalışmadan elde edilen veriler hem diğer *Ajuga* türlerine uygulanabilirliği açısından hemde nesli tehdit altında olan bitkimiz açısından büyük önem taşımaktadır. Son olarak, *Ajuga* türlerinin geniş çaplı çoğaltılması ve biyoaktif bileşiklerinin biyoteknolojik yöntemler ile üretilmesi için hücre süspansiyon kültürlerinin geliştirilmesi faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Akbas F., Kuru I.S., Orcan P.K. 2015, The effects of BAP and Kin on micropropagation of *Ajuga vestita* Boiss.; a rare endemic medicinal plant. 2nd Int Conference on Advances in environment, Agriculture & Medical Sciences (ICAEAM 15), June 11–12, 2015. doi: 10.17758/IAAST.A0615033.
- Akbaş F., Işıkalın Ç., Namlı S., Erol B. 2009, Effect of plant growth regulators on in vitro shoot multiplication of *Amygdalus communis* L. cv. Yalstinki African Journal of Biotechnology Vol. 8 (22), pp. 6168-6174.
- Aktaş, T., Çölgeçen, H., 2017, Farklı Bitki Türlerinden Bitki Doku Kültürü Teknikleriyle Flavonoidlerin Üretimi, *Kara elmas Fen ve Müh. Dergisi*, 7(2):665-673, 2017.
- Ali, H., Khan, M.A., Khan, R.S., Ullah, N. 2018, Impacts of hormonal elicitors and photoperiod regimes on elicitation of bioactive secondary volatiles in cell cultures of *Ajuga bracteosa*, *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 183 242–250.
- Ali, H., Khan, M.A., Kayanic, W.K., Khand, T., Mashwanie, Z.R., Ullaha, N.,Khana, 2018, Thidiazuron regulated growth, secondary metabolism and essential oil profiles in shoot cultures of *Ajuga bracteosa* R.S. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 183 242–250.
- Aliotta, G., Pollio, A. 1994, Useful plants in renal therapy according to Pliny the elder. *Am. J. Nephrol.*,14: 399-411.
- Anonim. 2007, “Ulusal Biyolojik Çeşitlilik Stratejisi ve Eylem Planı”, T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü Doğa Koruma Dairesi Başkanlığı, Ankara.
- Anonim. 2013, “*Ajuga xylorrhiza* Tür Koruma Eylem Planı”, T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü XV, Bölge Müdürlüğü Diyarbakır Şube Müdürlüğü, Ankara.
- Anonim.2018,<http://www.tehditalindabitkiler.org.tr/v2/index.php?sayfa=detay&id=NzQyNA> tehdit altında ajuga saat 10.53 31 temmuz 2018.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. 2002, “Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları” II. Baskı, Konya, Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Baytop, T. 1984, *Therapy with Medicinal Plants (Past and Present)*; Istanbul University Publications, Sayfa:298- 416, İstanbul.

- Benson, E.E. 1999, "Plant Conservation Biotechnology" Chapter 15 (V, C, Pence), London, UK: CRC Press, s:227–274 Ref in: Dayan, S, 2006, "Endemik ve Tehlike Altındaki *Thormopsis turcica* (Fabaceae)'nin *In Vitro* Çimlenmesi ve Mikroçoğaltımı" Afyon, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Blois, M. S. 1958, Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- Bremner, P. D., Simmonds, M. S. J., Blaney, W. M., Veitch, N. C., 1998, Neoclerodane Diterpenoid Insect Antifeedants from *Ajuga reptans* cv *Catlins Giant*, *Phytochemistry*, 47:7, 1227-1232.
- Callebaut A, Terahara N, de Haan M, Declaire M (1997), Stability of anthocyanin composition in *Ajuga reptans* callus and cell suspension cultures, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50: 195–201.
- Castro, A., Coll, J., Tandron, Y.A., Pant AK and Mathela C.S. 2008, Phytoecdysteroids from *Ajuga macro sperma* var. *brevi flora* roots. *J. Nat. Prod*, 71: 1294-1296.
- Cenkci, S., Temel, M., Kargioğlu, M., Dayan, S. 2009, Propagation of endangered *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüködük using conventional and *in vitro* techniques *Turk J. Biol*, 33:327-333.
- Chandel, S., Bagai, U. 2011, Screening of antiplasmodial efficacy of *Ajuga bracteosa* Wall ex Benth, *Parasitol Res*, 108:801–805.
- Chen, H., Tang, B.Q., Chen, L., Liang, J.Y., Sun, J.B. 2018, Neo-clerodane diterpenes and phytoecdysteroids from *Ajuga decumbens* Thunb. and evaluation of their effects on cytotoxic, superoxide anion generation and elastase release *in vitro*, *Fitoterapia* 129 7–12
- Cheng, D.M., Yousef, G.G., Grace, M.H., Rogers, R.B., Gorelick-Feldman, J., Raskin I ve Lila M.A. 2008, *In vitro* production of metabolism-enhancing phytoecdysteroids from *A. turkestanica*, *Plant Cell Tiss Cult. Organ*, 93:73-83.
- Cimanga, R.K., Kambu, K., Tona, L., Hermans, N., Apers, S., Totté, J., Pieters, L., Vlietnick, A.J. 2006, Cytotoxicity and *in vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents. *Journal of Ethnopharmacology*, 107: 83-90.
- Coll, J., 2002, NMR Shift Data of Neo-clerodane Diterpenes from the Genus of *Ajuga*, *Phytochemical Analysis*, 13:6, 372–380.
- Davis, P. H. 1982, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 7, Edinburgh.

- Davis, P. H., 1988, Flora of Turkey and The East Aegaen Islands. Edinburg University Press,10.
- Delazar, A., Delnavazi,M.R., Yassa,N., Parkhideh, S., Delazar, N., Nahar, L., Sarker S.D. 2012, Essential oil composition and isolation of free-radical-scavenging phenolic glycosides from the aerial parts of *Ajuga chamaepitys* growing in Iran, Brazilian Journal of Pharmacognosy, 22(2): 299-305.
- Erdoğan, U. 2010, Tehlike Altındaki Silene Sangaria Coode&Cullen' nın Mikroçoğaltımı, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 90 ss, Edirne.
- Erdemen, B.H., ve Aygün, A., 2016, Bazı Prunus Spp Türlerinin Tohumlarından Kallus Kütürlerinin Oluşturulması, Akademik Ziraat Dergisi 5(1):9-12.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N. 2000, "Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı" Ankara, TTKD ve Van 100. Yıl Üniversitesi Yayını, Van.
- Fekete, G., Polgár, L., Báthori, M., Coll J ve Darvas B. 2004, Peros efficacy of Ajuga extracts against sucking insects, Pest Manag, Sci, 60: 1099-1104.
- Ghita, G., Cionca, O., Gille, E., Necula, R., Zamfirache, M.M., Stanescu U. 2011, Contributions to the phytochemical study of some samples *A. reptans L.* and *A. genevensis L.* Bulletin of the Transilvania University of Braşov Series VI, Medical Sciences 4 (53) 2, 7-14.
- Gören, A.C., Zhou, B.N., Gülaçtı, T., Kökdil, G., Kingston, D.G. 2005, DNA damaging activities of methanol extract of *Ajuga postii* and iridoid glucoside reptoside. Natural Product Research, 19 (5) : 457–460.
- Gulluce, M., Agar, G., Baris, O., Karadayi, M., Orhan, F., Sahin, F. 2010, Mutagenic and Antimutagenic Effects of Hexane Extract of some Astragalus species Grown in the Eastern Anatolia Region of Turkey. Phytotherapy Research, 24: 1014-1018.
- Güven, A. ve Gürsul, I., 2014, Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Sentezi, Gıda, 39 (5), 299-306.
- Haşimi, N. 2012, *Ajuga Vestita* Ve *Ajuga Xylorrhiza* Bitkilerinin Petrol Eteri, Aseton Ve Metanol Ekstrelerinin Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Diyarbakır.
- Hemcinschi, A., Galeş, R., Stanescu, U., Toma, C. 2009, Comparative histo-anatomy and Chemical Composition two *Ajuga* Species from the Romanian Flora, Biologie Vegetale2, II, 33-45.

- How, F.W., Smith, M.N. 2003, Effect of Light/Dark Cycling on Growth and Anthocyanin Production of *Ajuga reptans* in Callus Culture, *J. Agric. Res. China*, 52; 291-296.
- Işıkalın Ç., Namli S., Akbas F., Erol Ak B. 2011, Micrografting of almond (*Amygdalus communis*) cultivar 'Nonpareil' ISSN: 1835-2707.
- Israili, Z.H., Lyoussi, B. 2009, Ethnopharmacology of The Plants of Genus *Ajuga*, *Pak. J. Pharm. Sci*, 22(4): 425-462.4
- Jan M, Singh S, Kaloo ZA, Maqbool F (2014), Callus induction and multiple shoot regeneration in *Ajuga bracteosa* Wall. ex Benth.—an important medicinal plant growing in Kashmir Himalaya. *J Sci Innov Res* 3:319–324
- Jan M, Singh S, Maqbool F 2018, Micropropagation of *Ajuga bracteosa* Wall ex. Benth.-an important medicinal plant growing in Kashmir Himalaya, *International Journal of Advance Research in Science and Engineering*, 7(4); 2010-2020.
- Jeong, B.R., Sivanesan, I. 2018, Impact of light quality and sucrose on adventitious shoot regeneration and bioactive compound accumulation in *Ajuga multiflora* Bunge, *Scientia Horticulturae* 236-222–228.
- Kaul, S., Das, S., Srivastava, P.S. 2013, Micropropagation of *Ajuga bracteosa*, a juhyönöm medicinal herb, *Physiol Mol Biol Plants*, 19(2):289–296
- Kayani WK, Fattahi M, Palazon J, Cusido RM, Mirza B (2016), Comprehensive screening of influential factors in the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the Himalayan elixir: *Ajuga bracteosa*.
- Kim OT, Manickavasagam M, Kim YJ, Jin MR, Kim KS, Seong NS, Hwang B 2005, Genetic transformation of *Ajuga multiflora* Bunge with *Agrobacterium rhizogenes* and 20 hydroxyecdysone production in hairy roots. *J Plant Biol* 48:258–262
- Kuria, K.A.M., Chepkwony. H., Govaerts, C., Roets, E., Busson, R., de Witte, P., Zupko, I., Hoornaert, G., Quiryne, L., Maes, L., Janssens, L., Hoogmartens, J., Laekeman, G. 2002, The antiplasmodial activity of isolates from *Ajuga remota*, *J. Nat. Prod*, 65: 789- 793.
- Kuria, K.A.M., Coster S.D., Muriuki G., Masengo W., Kibwage I., Hoogmartens J., Laekeman G.M. 2001, Antimalarial activity of *Ajuga remota* Benth (Labiatae) and *Caesalpinia 6 olkensis* Harms (Caesalpinaceae): *in vitro* confirmation of
- Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H., ve Nishino, H. 2000, Cancer chemopreventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide, from *Ajuga decumbens*, *Cancer Lett*, 157: 87-92.

- Kökçü, G., Gülaçtı, T., Gören, A.C., Wolfgang, V. 2002, Steroids and Terpenoids from *Ajuga reptans*. Zeitschrift für Naturforschung B Journal of Chemistry, 57 (b): 957-960.
- Kuete, V., Ngameni, B., Simo, C.C.F., Tankeu, R.K., Ngadjui, B.T., Meyer, J.J.M., Lall, N., Kuate, J.R. 2008, Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). Journal of Ethnopharmacology, 120: 17-24. ethnopharmacological use, / Journal of Ethnopharmacology 74 141–148.
- Larson, R. A. 1988, The antioxidants of higher plants. Phytochemistry, 27: 969– 978.
- Lineberger RD, Wanstreet AG 1983, Micropropagation of *Ajuga reptans* ‘Burgundy Glow’. Ohio Agric Res Dev Ctr Res Circ 274:19–22
- Mamadaliyeva, N.Z., El-Readi, M.Z., Ovidi, E., Ashour, M.L., Hamoud, R., Sagdullaev, S.S., Azimova, S.S., Tiezzi, A., Wink, M. 2013, Antiproliferative, antimicrobial and antioxidant activities of the chemical constituents of *Ajuga turkestanica*, Phytopharmacology, 4(1):1-18.
- Marc, E.B., Nelly, A., Annick, D.D., Frederic, D. 2008, Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. J. Ethnopharmacol., 120: 315-334.
- Matkowski, A. 2004, “*In vitro* isoflavonoid production in callus from different organs *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi” Journal of Plant Physiology, 161, 3, S 343–346.
- Mavi, A. 2005, İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum. 52–53.
- Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A. 2000, Comparison of the free radical-scavenging activity of Propolis from several regions of Argentina. Journal of Ethnopharmacology, 71: 109–114.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962, A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures, Plant Physiology, 15, 473-497 pp.
- Özen, H.Ç., Onay, A. 2013, Bitki Fizyolojisi Ders Kitabı 2. Basım, Nobel Akademik Yayıncılık.
- Özhatay, N., Byfield, A. 2005, “Türkiye’nin Önemli 122 Bitki Alanı” WWF Türkiye (Doğal Hayatı Koruma Vakfı) yayını, İstanbul.
- Park, H.Y., Kim, D.H., Sivanesan, I. 2017, Micropropagation of *Ajuga* species: a mini review Biotechnol Lett 39:1291–1298.

- Preece JE, Huetteman CA (1994), A laboratory exercise for axillary shoot proliferation using *Ajuga reptans*. *HortTechnology* 3:312–314
- Primack, R.B. 1993. *Essentials of Conservation Biology*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Ramachandra, R.S., Ravishankar, G.A., 2002, Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnology Advances*, 20, 101-153.
- Sahakyan N.Zh, Petrosyan M.T, Popov Yu. G, Volodin V.V, Matistov N.V, Gruzdev I.V, Shirshova T.I. 2010, Content of Neutral Lipid and Fatty Acids in Callus Culture and Leaves of Intact Plants of *Ajuga genevensis* and *Ajuga chia*, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24:sup1, 87-90, DOI: 10.1080/13102818.2010.10817817
- Sahakyan N, Petrosyan M, Trchounian A 2016, Comparative analysis of chemical composition and biological activities of *Ajuga genevensis* L. in *in vitro* culture and intact plants. *Int J Biol Biomol Agric Food Biotechnol Eng* 10:322–326
- Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M.M. 2006, et al. Conservation *in vitro* of threatened plants—Progress in the past decade, *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42: 206-214.
- Saya, Ö., Ertekin, S., Özen, H.Ç., Hoşgören, H., ve Toker, Z. 2001, GAP Yöresindeki Endemik ve Tıbbi Bitkiler, Türkiye Çevre Vakfı ve UNDP Global Environmental Facility, Ankara.
- Sivanesan I, Jeong BR 2014, Silicon promotes adventitious shoot regeneration and enhances salinity tolerance of *Ajuga multiflora* Bunge by altering activity of antioxidant enzyme. *Sci World J* 2014:10. doi:10.1155/2014/521703
- Sivanesan I, Park SW 2015a, Optimizing factors affecting adventitious shoot regeneration, *in vitro* flowering and fruiting of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Ind Crops Prod* 76:323–328
- Sivanesan I, Park SW 2015b, Effect of plant growth regulators on axillary shoot multiplication from nodal explants of *Ajuga multiflora* Bunge. *Propag Ornament Plants* 15:42–44
- Sivanesan I, Ko CH, Lee JP, Jeong BR 2011, Influence of cytokinins on adventitious shoot regeneration from leaf and petiole explants of *Ajuga multiflora* Bunge. *Propag Ornament Plants* 11:156–158
- Sivanesan I, Saini RK, Noorzai R, Zamany AJ, Kim DH 2016, *In vitro* propagation, carotenoid, fatty acid and tocopherol content of *Ajuga multiflora* Bunge. 3. *Biotech* 6:91. doi:10.1007/s13205-016-0376-z

- Slinkard, K., Singleton, V.L. 1977, Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Viticult*, 28: 49–55.
- Sökmen, A. and Gürel, E., 2001, Sekonder metabolit üretimi, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları, Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya, 211-261
- Sönmez E., KÖSE Y.B. 2016 Morpho-anatomical investigations on *Ajuga postii* Briq and *Ajuga relict*a P.H.Davis ISSN 1308-5301.
- Tekeli, Ç., 2006, Lamiaceae Familyasına Ait Bazı Türler Üzerinde Morfolojik Ve Anatomik Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Samsun.
- Tepe B., Daferera D., SihogluTepe A., Polissiou M., Sokmen A. 2007, Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub.-Mor. from Turkey Author links open overlay panel Pages 1358-1364.
- Terahara N, Callebaut A, Ohba R, Nagata T, Ohnishi-Kameyama M, Suzuki M 1996, Triacylated anthocyanins from *Ajuga reptans*
- Turkoglu, S., Turkoglu, I., Kahyaoglu, M., Celik, S. 2010, Determination of antimicrobial and antioxidant activities of Turkish endemic *Ajuga chamaepitys* (L.)Schreber subsp. *euphratica* P.H. Davis (Lamiaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(13): 1260-1268.
- Tshikalange, T.E., Meyer, J.M.M., Hussein, A.A. 2005, Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 515-519.
- Yağcı, C., Toker, M.C., Toker, G., 2008, Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoidler, *Türk Bilimsel Derlemler Dergisi*, 1 (1) 47-58.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Şerife (AYDINARIĞ) BULUŞ
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : PERVARİ/1991
Telefon : 05414032800
Faks :
e-mail : serife5633@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Anadolu Salim Yılmaz Lisesi/MERSİN	2009
Üniversite	: Batman Üniversitesi	2014
Yüksek Lisans	: Batman Üniversitesi	-

YAYINLAR

Bildiri: Endemik *Ajuğa vestita* BOISS.'in farklı eksplantlarından itibaren kallus oluşturma çalışmaları ŞERİFE (AYDINARIĞ) BULUŞ, Filiz AKBAŞ. II. Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu. 31 Ağustos-03 Eylül 2016. Mersin (Yüksek Lisans tezinden yapılmıştır)