T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞU VE GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİ'NDE YETİŞEN VE ENDEMİK BİR TÜR OLAN *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un İN VİTRO MİKROÇOĞALTIM YOLLARININ ARAŞTIRILMASI

Melek SÜRER HAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
2018

T.C

DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Melek SÜRER HAN tarafından yapılan "**Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Yetişen ve Endemik Bir Tür Olan *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un *İn vitro* Mikroçoğaltım Yollarının Araştırılması.**" konulu bu çalışma , jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyeleri

Başkan :Prof. Dr. Hasan ÇETİN ÖZEN

Üye : Prof. Dr. Yeşim KARA

Üye : Prof. Dr. Süreyya NAMLI (Danışman)

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 25/05/2018

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

Doç.Dr.Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜR V.

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Süreyya NAMLI'ya;

Çalıştığım bitkiyi önerip teşhisini sağlayarak yardımını hiç esirgemeyen Sayın Prof.Dr. A.Selçuk Ertekin'e;

Çalışmamın tez yazım aşamasında, istatistiki verilerin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen sayın Doç.Dr. Filiz AKBAŞ'a ve Araş. Gör. Dr. Pınar Karakuş'a;

Çalışmamıza verdiği maddi destekten dolayı Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (DÜBAP) teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bu zorlu tez sürecinde benden desteğini bir an için bile esirgemeyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli arkadaşım Zeynep Kabayel'e, tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan sevgili aileme değerli babam Abdullah SÜRER'e ve manevi desteğini her an yanımda hissettiğim değerli eşim İbrahim HAN' a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR I

İÇİNDEKİLER II

ÖZET IV

ABSTRACT V

ÇİZELGE LİSTESİ VII

ŞEKİL LİSTESİ VIII

KISALTMA VE SİMGELER X

1. GİRİŞ 1

2. KAYNAK ÖZETLERİ 3

3. MATERYAL VE METOT 7

3.1. MATERYAL 7

3.1.1. Çalışma Materyalinin Temini 8

3.2. METOT 8

3.2.1. Cam Malzeme ve Filtre Kağıtlarının Sterilizasyonu 8

3.2.2. Pens ve Bisturilerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu 8

3.2.3. Çalışma Ortamının Hazırlanması ve Sterilizasyonu 8

3.2.4. Besi Ortamlarının İçeriği ve Sterilizasyonu 9

3.2.4.1. Besi Ortamında Kullanılan Stok Çözeltiler 9

3.2.4.2. Murashige ve Skoog (MS) Besi Ortamının Hazırlanması 10

3.2.4.3. Bitki Büyüme Hormonlarının Hazırlanması 11

3.2.5. Çalışmada Kullanılan Tohumların Sterilizasyon Çalışmaları 12

3.2.6. Kültür Başlatma Çalışmaları 13

3.2.7. Sürgün Proliferasyon Çalışmaları 14

3.2.7.1. Sürgün Proliferasyonuna Farklı BAP Konsantrasyonlarının Etkisi 14

3.2.7.2. Sürgün Proliferasyonuna Farklı KİN Konsantrasyonlarının Etkisi..... 14

3.2.7.3. Sürgün Proliferasyonuna BAP ve Farklı Oksin Kombinasyonlarının Etkisi 14

3.2.7.4. BAP + Oksin Konsantrasyonlarında Köklenen Sürgünlerin Toprağa Adaptasyon Çalışmaları 15

4. ARAŞTIRMA BULGULARI 17

4.1. Kültür Başlatma Çalışmaları 17

4.2. Sürgün Proliferasyon Çalışmaları 18

4.2.1. Sürgün Proliferasyonuna Farklı BAP (Benzilaminopurin) Konsantrasyonlarının Etkisi 18

4.2.2. Sürgün Proliferasyonuna Farklı KİN (Kinetin) Konsantrasyonlarının Etkisi 22

4.2.3. BAP (Benzilaminopurin) + Farklı Oksin Kombinasyonlarının Sürgün ve Kök Proliferasyonuna Etkisi 25

4.2.4. Köklenen Sürgünlerin Dış Ortama Adaptasyon Çalışmaları 30

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 33

6. KAYNAKLAR 35

ÖZGEÇMİŞ 40

ÖZET

DOĞU VE GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİ'NDE
YETİŞEN VE ENDEMİK BİR TÜR OLAN
Nepeta baytopii Hedge & Lamond'un
İN VİTRO MİKROÇOĞALTIM YOLLARININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Melek SÜRER HAN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2018

Bu çalışmada, endemik bitki olarak potansiyel önemi olan *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un biyoteknolojik yöntemler ile uygun bir sterilizasyonu, çoğaltımı için uygun bir çalışma prosedürü tanımlanması ve araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızın ilk aşamasında doğal yetişme ortamından toplanan *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un tohumları için bir seri sterilizasyon denemeleri yapıldı. *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond 'un tohumları bitki büyüme düzenleyicisi (BBD) içermeyen MS (Murashige and Skoog, 1962) besi ortamında çimlendirildi.

İkinci aşamada sitokinin ve oksin tipine karar verilerek parametre çalışmaları gerçekleştirildi. Sürgün sayısı ve sürgün boyu açısından en iyi sitokinin oranı 0.125 mg/l BAP olduğuna karar verildi.

Nepeta baytopii Hedge & Lamond'un tohumlarından elde edilen sürgünler direkt sürgün rejenerasyonu deneyleri için eksplant kaynağı olarak kullanıldı. Bu eksplantlar BAP ve KİN'in (0.00-0.0625-0.125-0.25-0.5-1-1.5-2-2.5 mg/l) 9 farklı konsantrasyonunu içeren MS besi ortamında ayrı ayrı ekimi yapıldı. Bundan sonra, yeni sürgünler 3-4 haftada bir taze kültür ortamına aktarıldı.

Kültürün 21. gününde *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond tohumlarından elde edilen sürgünler 0.125 mg/l BAP ile desteklenmiş MS besi ortamında prolifere edildiler.

0.125 mg/l BAP ile NAA, IAA, IBA ve 2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarını (0.00-0.25-0.125-0.0625 mg/l) içeren besi ortamları ayrı ayrı hazırlanarak sürgün proliferasyonu üzerine oksin ve sitokininin kombine etkisi araştırılmıştır. En iyi köklenme oranı ise 0.125 mg/l BAP + 0.25 mg/L IBA içeren MS besin ortamında gelişen sürgünlerden elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen köklü sürgünlerin toprağa adaptasyonu için aklimatizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Bu çalışma, bu önemli endemik bitkinin çoğaltılması ve korunması için etkili bir alternatif yöntem sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mikroçoğaltım, *Nepeta baytopii*, Hedge & Lamond, BBD

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *IN VITRO* MICROPROPAGATION PATHWAYS OF ENDEMIC *Nepeta Baytopii* Hedge & Lamond GROWN IN EASTERN SOUTHEAST ANATOLIA REGION

M.Sc. THESIS

Melek SÜRER HAN

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2018

In this study, it has been aimed to describe a working procedure for micropropagation of *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond which has a potential value as endemic plant and investigate a suitable sterilization procedure and an appropriate working procedure for reproduction with biotechnological methods.

In the first stage our study, a series of sterilization experiments were carried out for the seeds of *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond collected from the natural growing environment.

The seeds of *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond were germinated on the hormone-free MS (Murashige and Skoog, 1962) medium supplemented with 30 g/l sucrose and 5.458 g/l agar (w/v).

İn the second stage, parameter studies were performed by deciding to the type cytokinin and auxin. It was decided that the best cytokine ratio in terms of shoot number and shoot height was 0.125 BAP mg/l. For direct shoots regeneration experiments, the were used as explant sources, the shoots obtained from seeds of *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond. This explants were cultured on MS medium containing nine different concentrations of BAP and Kinetin (0.00-0.0625-0.125-0.25-0.5-1-1.5-2-2.5 mg/l) seperately. After that, new shoots to on fresh culture medium every 3 to 4 weeks were subcultured. On the 21st day of culture, the shoots obtained from seeds of *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond were proliferated in the MS medium supplemented with 0.125 mg/L BAP.

In the third stage, the media containing 0.125 mg/l BAP and different concentrations of NAA, IAA, IBA and 2,4-D (0.00-0.25-0.125-0.0625 mg/l) were prepared separately and the combined effects of oxine and cytokinin on shoot proliferation were investigated. The best percentage of root formation was obtained from 0.125 mg/l BAP + 0.25 mg/l IBA supplemented MS medium. Acclimation studies has been done for adaptation of rooted shoots to soil.

This is the first report on the study *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond's direct plant regeneration.

This study presents an effective alternative method for propagation and preservation of this important endemic plant.

Keywords: Micropropagation, *Nepeta baytopii*, Hedge & Lamond, PGRs

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 3.1.	1/1 MS Besi Ortamının İçeriği	11
Çizelge 3.2.	*Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un tohumlarının çimlenmesi ve dekontaminasyonu üzerine NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının ve uygulama süresinin etkisi	13
Çizelge 3.2.	*Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un tohumlarının çimlenmesi ve dekontaminasyonu üzerine NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının ve uygulama süresinin etkisi	**1**3
Çizelge 3.2.	*Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un tohumlarının çimlenmesi ve dekontaminasyonu üzerine NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının ve uygulama süresinin etkisi	13
Ç**izelge 3.2.**	*Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un tohumlarının çimlenmesi ve dekontaminasyonu üzerine NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının ve uygulama süresinin etkisi	13
Çizelge 4. 1.	**S**ürgün gelişimi üzerine farklı BAP konsantrasyonlarının etkisi	19
Çizelge 4. 2.	Sürgün gelişimi üzerine farklı KİN konsantrasyonlarının etkisi	22

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 3.1.	Yetişme Alanında *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond bitkisinin genel görünüşü	7
Şekil 4.1.	*Nepeta baytopii* Hedge & Lamond bitki tohumlarının genel görünüşü	17
Şekil 4.2.	Hormonsuz 1/1 MS besi ortamında kültüre alınan *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un tohumlarının genel görünüşü	17
Şekil 4.3.	*Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un çimlenen tohumlarının genel görünüşü	18
Şekil 4.4.	0.0625 mg/l BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü	20
Şekil 4.5.	0.125 mg/l BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü	20
Şekil 4.6.	0.25 mg/l BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü	20
Şekil 4.7.	0.5 mg/l BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü	20
Şekil 4.8.	1 mg/l BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü	21
Şekil 4.9.	1.5 mg/l BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü	21
Şekil 4.10.	2 mg/1BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü	21
Şekil 4.11.	2.5 mg/1 BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü	21
Şekil 4.12.	0.0625 mg/l KİN ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü	23
Şekil 4.13.	0.125 mg/l KİN ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü	23
Şekil 4.14.	0.25 mg/l KİN ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü	24
Şekil 4.15.	0.5 mg/l KİN ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü	24
Şekil 4.16.	1 mg/l KİN ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü	24
Şekil 4.17.	1.5 mg/l KİN ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü	24
Şekil 4.18.	2 mg/l KİN ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü	25
Şekil 4.19.	2.5 mg/l KİN ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü	25

Şekil 4.20. Kontrol grubundaki sürgünlerin genel görünüşü 25

Şekil 4.21. 0.125 mg/l BAP + 0.25 mg/l NAA ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü 26

Şekil 4.22. 0.125 mg/l BAP + 0.0625 mg/l NAA ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü 26

Şekil 4.23. 0.125 mg/l BAP + 0.0625 mg/l IBA ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü 27

Şekil 4.24. 0.125 mg/l BAP + 0.125 mg/l IBA ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü 27

Şekil 4.25. 0.125 mg/l BAP + 0.25 mg/l IBA ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü 27

Şekil 4.26. 0.125 mg/l BAP + 0.25 mg/l IAA ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü 28

Şekil 4.27. 0.125 mg/l BAP + 0.0625 mg/l IAA ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü 28

Şekil 4.28. 0.125 mg/l BAP + 0.125 mg/l IAA ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü 29

Şekil 4.29. 0.125 mg/l BAP + 0.25 mg/l 2,4-D ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü 30

Şekil 4.30. 0.125 mg/l BAP + 0.125 mg/l 2,4-D ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü 30

Şekil 4.31. 0.125 mg/l BAP + 0.625 mg/l 2,4-D ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü 30

Şekil 4.32. Aklimatizasyon çalışmalarının 10.gününde bitkilerin genel görünüşü 31

Şekil 4.33. Bitkiciklerin toprağa adaptayon çalışmaları 31

KISALTMA VE SİMGELER

2,4-D	:2,4 Diklorofenoksi asetikasit
Atm	:Atmosfer
BAP	:6-Benzilaminopurin
BBD	:Bitki Büyüme Düzenleyicileri
°C	:Santigrat derece
Dk	:Dakika
D.Ü.	:Dicle Üniversitesi
EN	:Endemik
Gr	:Gram
gr/l^{-1}	:Gram/Litre
IAA	:İndolasetik asit
IBA	:İndolbütirik asit
KİN	:Kinetin
MS	:Murashige ve Skoog
mg	:Miligram
mm	:Milimetre
mg/l^{-1}	:Miligram/Litre
NAA	:Naftalin asetik asit
NaOCl	:Sodyumhipoklorit
PGRs	:Bitki büyüme düzenleyicileri
w/v	:Ağırlık/Hacim
v/v	:Hacim/Hacim

1.GİRİŞ

Teknolojik alandaki hızlı gelişmeler sayesinde yaşamın her alanında ileri düzeyde çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle, geleneksel tedavi alanında kullanılan ve tedavi edici özelliğe sahip olan bitki türlerini kapsayan çalışmalar önem kazanmıştır. Bu çalışmalar sonucu elde edilen bilgiler, tedavi özelliği gösteren doğal sağlık ürünlerinin yaygın olarak kullanılmasına olanak sağlamıştır.

Günümüzde bitki kimyası ile ilgili çalışmalar, halk arasında geniş bir kullanıma sahip olan Lamiaceae familyası türleri üzerinde yoğunlaşmıştır (Nunez ve De Castro 1992). Lamiaceae familyası Dünya'da iyi bilinen bir familyadır. Güneybatı ve Orta Asya, Afrika, Avrupa, Kuzey Amerika olmak üzere geniş yayılış alanına sahiptir (Hedge 1986). Türkiye florası'nda Lamiaceae familyası 45 cins, 565 tür ve 735 taksonla temsil edilmektedir. Lamiaceae, Türkiye'de endemik tür sayısı en fazla olan familyalar arasında olup endemizm oranı % 45'tir (Güner ve ark. 2000). Lamiaceae familyasının Türkiye'deki endemik türlerinin yoğunlaştığı alanlar Anadolu çaprazı, Toroslar ve Amanoslar'dır (Hedge 1986). Çalışma konumuz olan *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond, Türkiye Florası'ndan Lamiaceae familyasının bir üyesidir. Nepeta'nın Dünya'da tahmin edilen tür sayısı 250 civarında olup, Türkiye' deki tür sayısı 37 olup 40 takson ile temsil edilmektedir. Bu türün habitatı genellikle yol kenarları ve volkanik alanlardır. Yetiştiği yükseklik ise 1000-1200 m'dir. Nepeta cinsi türlerinin Türkiye'deki başlıca yayılış alanları Batı, Güney ve Doğu Anadolu bölgesi olup, çiçeklenme dönemi temmuz ayıdır (Dirmenci 2003).

Lamiaceae familyası türleri eski çağlardan günümüze kadar halk arasında tıbbi olarak ve baharat amacıyla kullanılmıştır (Baytop 2000). Örneğin; *Nepeta cataria* bitkisi 17. yüzyıldan beri kuvvetlendirici, dezenfektan, soğuk algınlıkları tedavi edici olarak halk arasında kullanılmıştır.

Tıbbi öneme sahip olan Lamiaceae familyası üyeleri üzerinde birçok kimyasal içerikli çalışmaların yapıldığı bilinmektedir. Bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli olan özellikleri 1926 yılından beri laboratuvarlarda araştırılmaktadır. Lamiaceae familyası tüm dünyada uçucu yağları ile en çok tanınan ve çalışılan bitkileri kapsar.

Bu çalışma ile *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un mikroçoğaltımı ve elde edilen sürgünlerin aklimatizasyonunun gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Daha önce biyoteknolojik olarak çalışılmamış ve endemik bir tür olan *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımı ile doğada devamlılığını sağlamak ve doğal vejetasyon alanlarına zarar vermeden bir protokol geliştirmek temel hedef olarak amaçlanmıştır.

Bu çalışma ile mikroçoğaltım yolları araştırılacaktır. Elde edilen veriler ışığında bölgemizde yetişen diğer endemik tıbbi bitkilerin biyoteknolojik yöntemler kullanılarak mikroçoğaltımının gerçekleştirilmesi toprağa adaptasyonun yapılması ve sekonder metabolit içeriklerinin araştırılması yönünde yapılacak çalışmalara ve araştırıcılara yardımcı olacağı kanaatindeyiz.

Nepeta baytopii Hedge & Lamond'un tohumlarının *in vitro* ortamda çimlenmesi sağlandıktan sonra yetiştirilen kültürlerde, bitki rejenerasyonuna; bitki büyüme düzenleyicilerinin çeşit ve konsantrasyonunun etkileri ve elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi ile doğaya adaptasyonu gerçekleştirilecektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bölgemizde yayılış gösteren ve endemik bir tür olan *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un daha önce sistematikteki yeri belirlenmesine, morfolojik ve anatomik yapısı çeşitli araştırıcılar tarafından araştırılmasına rağmen biyoteknolojik yöntemler ile mikroçoğaltımı yapılmamıştır.

Lamiaceae familyası türleri ekonomik olarak önemlidir. Çünkü içeriklerinde aromatik bileşikler ve temel yağlar vardır. Bu nedenle parfümeri ve gıda sanayisi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Clive ve Stace 1980, Estilai ve Hatemi 1990). Ticareti yapılan bitki türleri arasında Lamiaceae familyası ilk sırada yer almaktadır (Anonymous 1996, Arslan ve ark. 2000).

Nepeta türlerinin büyük bir kısmı önemli tıbbi bitkilerdendir. Bazı Nepeta türlerinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan infüzyon, Anadolu'da halk arasında midevi ve uyarıcı olarak kullanılmaktadır (Baytop 1984). Bazı taksonları tıbbi önemi ile insan sağlığına güven vermekte; Kalp-damar, karaciğer, mide-bağırsak hastalıkları için önemli bir tedavi kaynağıdır (Damirov ve ark. 1983, Baytop 1999). Lamiaceae familyası üyelerinin eskiden beri bilinen tıbbi önemi üzerinde birçok kimyasal içerikli çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca bu bitki türlerinin içerdiği kimyasal bileşikler, sistematik ayrımlarda da kullanılmaktadır. Familyanın yurdumuzda bulunan üyeleri üzerinde de kimyasal içerikli çalışmalar yapılmış (Baser ve ark. 1999) ve yapılmaya devam etmektedir. Familya üyeleri, nektar yönünden zengin olduğundan arıcılık için önemli bir bitki grubudur. Hekimlikte kullanılan türler olduğu gibi sebze olarak kullanılanı da vardır ve bazı türleri ise süs bitkisi olarak yetiştirilir (Baytop 1984). Halk arasında;Kedi nanesi, Arıotu, Pisik otu, Nezle otu adlarıyla bilinmektedir (Baytop 1997). Bu familya bitkileri aynı zamanda ülkemizin önemli ihraç maddeleri arasında da yer almaktadır (Baytop 1999). Eterik yağ kaynağı olarak Nepeta cinsinden olan taksonlara bakılmaktadır. Eterik yağları önemli duruma getiren onların yapısındaki sitral, sitronel, geraniol ve başka bu gibi güzel kokulu bileşenlerdir (Sajjadi 2005, Barazandeh 2006). Nepeta türleri sadece eterik yağlar değil, aynı zamanda flavonoid, triterpen bileşenleri, vitaminler ve ayrıca, insan sağlığı için çok önemli olan bileşenleri de ihtiva etmektedir (Kobaisy ve ark. 2005, Rustaiyan ve ark. 2006). Azerbaycan' da Nepeta taksonlarının bazıları kültür ortamında çoğaltılmaktadır. Çalışmalarda amaç

eterik yağ açısından sanayi önem arz eden taksonların kültür ortamında çoğaltma yöntemlerini öğrenmektir. Söz konusu 22 taksonun 7 adedi artık kültüre alınmış ve sanayi açısından önemi belirlenmiştir (Mammadova ve Mammadov 2014). Bunların yanı sıra bazı türlerin uçucu yağlarından dolayı ekonomik değeri vardır. Örneğin; Rusya türü olan *Nepeta Padostachys*' in yağ oranı % 0.04'ü geçmeyenleri, *Nepeta cataria*'nın yağ oranı % 3'e kadar olan kemotipleri parfüm sanayiinde kullanılmaktadır (Shishkin 1954). *Nepeta ucrainica* L. Kazakistanda gastrik hastalıkların tedavisinde bitkisel çay olarak kullanılmaktadır (Akbay ve ark. 2002). *Nepeta cataria* uçucu yağının *Spodoptera littoralis* larvasına karşı toksik olduğu belirlenmiştir (Pavela 2005). *Nepeta cataria*'nın ergenliği geciktirdiği gözlenmiştir (Bernardi ve ark. 1998). *Nepeta nuda* uygulandıkları bitki tohumlarında fizyolojik ve genotoksik hasarlar oluşturdukları belirlenmiştir (Kokdil ve ark. 1999). Elde ettikleri uçucu yağları *Raphanus sativus* L. ve *Lepidium sativum* L. türlerine uygulayan araştırıcılar (Mancini ve ark. 2009) içeriklerin hedef bitkinin kök ve gövde uzamasını engellediğini tespit etmişlerdir. Lamiaceae familyası türleri çiçek morfolojisi açısından arıların nektar emmesine uygun bir yapıda olup, aynı zamanda iyi birer polen ve nektar kaynağıdır. Bu nedenlerden dolayı bu bitkiler arıcılık ve bal üretimi açısından da oldukça önemli türlerdir (Erbil 2012). Bazı Nepeta türleri antioksidan özelliklere (Dapkevicius 1998), fungus (Cigremis ve ark. 2010), bakteri (Rigano ve ark. 2011), virüs ve kene türleri üzerinde önemli etkilere sahiptir (Bourrel ve ark. 1993, Nostro ve ark. 2001, Calmasur ve ark. 2006, Cigremis ve ark. 2010, Rigano ve ark. 2011). Yapılan pek çok gözlemde *Nepeta meyeri*'nin doğal çevrede allelopatik özelliğe sahip olduğu ve diğer yabani türlerin gelişmesine izin vermediği belirlenmiştir (Mutlu ve Atıcı 2009). Nepeta türleri, genellikle antispazmatik, diüretik, antiseptik olarak kullanılmaktadır. *Nepeta racemosa*'nın Kars-Karaurgan'da çorbalara katıldığı, *Nepeta meyeri*'nin Iğdır taraflarında kaynatılarak içildiği ve karın ağrısına iyi geldiği tespit edilmiştir (Dirmenci 2003). Halk arasında antitussif, antispazmotik, antiastmatik, antipiretik, diüretik, fungisidal, antiviral ve antibakteriyel kullanımlarının yanısıra cilt döküntülerinde, yılan ve akrep ısırmalarında topikal olarak antiseptik ve astrenjan özelliklerinden dolayı kullanımları bulunmaktadır (Miceli 2005). *Nepeta cataria* halk arasında diş ağrısı için kullanılmakta olup, ayrıca kansızlık, başağrısı ve tuberküloz tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir (Duke 1986). *Nepeta caesarea* mide rahatsızlığı için ve uyarıcı olarak kullanılan türüdür (Saraçoğlu ve ark.

1989).

Nepeta nuda ssp.L.'nin mikroçoğaltımından sonra alan transfer ile ilgili çalışmalarında yapraklardaki elektron taşınmasının uzun süreli değişimlerindeki adaptasyonu araştırmışlar. Araştırıcılar 1.0 mg/l BAP ile takviye edilen ortamda büyüme sonrasında klorofil a içeriğinde hafif bir artış tespit etmişler. Sitokinin 6-benzilaminopurin (BAP) ve oksin indol-3-bütirik asidin (IBA) bir dizi konsantrasyonun (0.1-1.0 mg /l) etkisi araştırılmış ve kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında sürgün sayısında önemli bir artışı 0,8 mg/l BAP ile desteklenmiş MS ortamından elde etmişler. IBA'nın, kök oluşumunu uyardığı ve yüksek konsantrasyonlarda (0.7-1.0 mg L^{-1}) sürgünün uzunluğunu arttırdığını rapor etmişler. Sonuç olarak mikroçoğaltılmış bitkilerin alandaki değişken çevreye uyumunun düzenlenmesinde epigenetik mekanizmaların dahil edilmesini önermektedirler. Nepeta bitkileri karakteristik olarak hem absorpsiyon emilim hem de verim etkinliğini sınırlayarak herhangi bir fotoinhibisyon prosesini önlediğini tespit etmişlerdir (Dragolova ve ark. 2015).

Nepeta rtanjensis Diklić & Milojević'in 3 populasyonundaki fotosentetik etkinliğinin tahmini üzerine yaptıkları araştırmalarında, bu bitkilerin elverişli fotosentetik verimliliğininin doğal alana başarılı bir şekilde adaptasyonu ile ilgili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Araştırıcılar bu türün tehlike statüsünde oluşunu azalan fotosentetik aktivitenin bir sonucu olmadığını, bitki verimliliği araçlarında düşük fotosentetik kapasitesinin olduğunu tahmin etmektedirler (Mijović ve ark. 2007).

Dirmenci tarafından *Nepeta baytopii* Hedge & Lamound'un, Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı'nda tehlike kategorisinde olması gerektiğini ve florada sadece tip yerinden bilinmekte olduğu belirtilmiştir. Populasyon gözlemlerine göre, habitatındaki birey sayısı 500 civarındadır ve populasyonu oldukça zayıftır. Bu tür için koruma önlemlerinin alınması gerektiğini ve bu nedenle türün tehlike kategorisi CR olarak önermiştir (Dirmenci 2003).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYAL

Nepeta (Lamiaceae) özellikle yol kenarları, volkanik, kıraç ve çalılık alanlarda yetişen çok yıllık otsu (nadiren tek yıllık) bir bitki cinsidir. Çiçekler, hermafrodit veya unisexualdır. Bu cinse ait taksonların yaprakları pembe, beyaz, mavi veya leylak renginde olabilir ve çiçekler sapların ucuna doğru birkaç kümede meydana gelir. Çiçekler; şekil olarak boru biçiminde ve küçük mor noktalarla seçilir. Kaliks 5, korolla 2 ağızlı, tüp ince uzun, üst dudak 2, alt dudak 3 lopludur.

Sistematikteki yeri:

Alem : Plantae

Bölüm : Magnoliophyta

Sınıf : Magnoliopsida

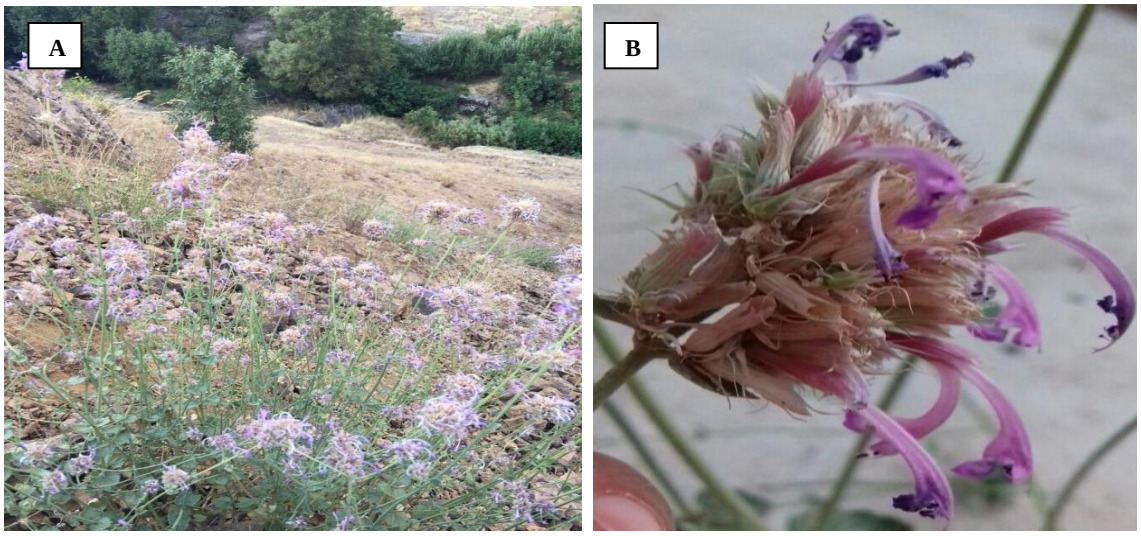
Altsınıf :Asteridae

Takım : Lamiales

Familya: Lamiaceae (Labiate)

Cins : Nepeta L.

Tür : *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond (Hedge ve Lamond 1968)



Şekil 3.1. Yetişme Alanında *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond bitkisinin genel görünüşü

3.1.1. Çalışma Materyalinin Temini

Araştırmada kullandığımız *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un bitkisi Diyarbakır-Bingöl arası Genç ilçesinden 25 km sonraki güzergah üzerindeki yol kenarlarından toplanıp kurutulup tohumları ayıklanmıştır. Bu araştırma D.Ü. Fen Fakültesi Dekanlığı bünyesinde bulunan Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür. Araştırmanın materyalini oluşturan türün temini yüksek lisans öğrencisi Zeynep KABAYEL, teşhisi ise Prof. Dr. A. Selçuk ERTEKİN tarafından yapılmıştır.

3.2. METOT

3.2.1.Cam Malzeme ve Filtre Kağıtlarının Sterilizasyonu

Çalışma esnasında kullanılan cam malzemelerden özellikle erlenmayer ve beher fırça ile temizlenip, sıcak sudan geçirildi. 3 kez saf sudan geçirilmek suretiyle etüvde 180 °C'de 3 saat bekletildi. Kullanılan diğer cam malzemeler olan balon joje, mezür ve pipetler belli boylardaki fırçalar ile yıkanarak, sıcak sudan geçirildi. 3 kez saf sudan geçirilerek 80 °C'de etüvde 3 saat süre ile steril edildi. Kültür kapları (Magenda GA-7) sıcak suda yıkanıp, 3 kez saf sudan geçirilip kurutuldu. Daha sonra kültür kapları alüminyum folyo ile 2 kat sarıldı. 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 25 dakika otoklavda sterilizasyonu gerçekleştirildi. Çalışma esnasında kullanılan filtre kağıtları, 180 ºC'de 2 saat, besiortamı ve çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan saf sular da etüvde 180 ºC'de 3 saat bekletilerek steril edildi.

3.2.2. Pens ve Bisturilerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu

% 96'lık alkolle pens ve bisturiler silinip 10'arlı grup halinde alüminyum folyo ile sarılarak paketlendi. Fırında 300 °C'lik bir ısıda 30 dakika tutularak steril edildi.

3.2.3. Çalışma Ortamının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Çalışmaya başlamadan 1 gün önce röpikaj odası ve odadaki tüm malzemeler % 53'lük sodyum hipoklorit (NaOCI) ile temizlenmiştir. Steril kabinin tamamı ise %70'lik alkol ile dezenfekte edildi. Ultraviyole lambası oda temizlendikten sonra ekim işlemlerinden bir gece önce 2 saat açık bırakılarak, odadaki sterilizasyon tamamlanmıştır.

Kültür odasında 3000-5000 lüx'lük ışık şiddetine sahip floresan ampuller ile aydınlanma sağlanmaktadır. Ortamın sıcaklığı 25±2 ºC ye ayarlanmış sıcaklık kontrol

sistemi bulunmaktadır. Ayrıca fotoperiyod, bir zaman ayarlayıcısı yardımı ile aydınlık/karanlık, 16 saat / 8 saat olacak şekilde ayarlandı.

3.2.4. Besi Ortamlarının İçeriği ve Sterilizasyonu

Yapılan deneysel çalışmaların tümünde, Murashige ve Skoog (MS-1962)'un modifiye edilmiş temel besi ortamı kullanıldı.

3.2.4.1. Besi ortamında Kullanılan Stok Çözeltiler

Makro Elementler Çözeltisi

NH_4NO	316.5 g
KNO	319.0 g
$CaCl_2.2H_2O$	4.4 g
$MgSO_4.7H_2O$	3.7 g
KH_2PO	41.7 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlandı.

Mikro 1 Elementler Çözeltisi

H_3BO_3	620 mg
$MnSO_4.4H_2O$	1695 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	860 mg
KI	83 mg
$Na_2MoO_4.2H_2O$	25 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlandı.

Mikro 2 Elementler Çözeltisi

$CuSO_4.5H_2O$	25 mg
$CoCl_2.6H_2O$	25 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlandı.

Kompleks Kelatör Çözeltisi

$FeSO_4.7H_2O$	3.725 g
Na_2EDTA	2.785 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlandı.

Vitamin Karışımı Çözeltisi

Nikotinikasit	50 mg
Glisin	200 mg
Pridoksin HCl	50 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlandı.

B1 Vitamini Çözeltisi (10^{-3})

TiaminHCl	100 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlandı.

3.2.4.2. Murashige ve Skoog (MS) Besi Ortamının Hazırlanması;

Deneyler esnasında MS besi ortamı (1 Litre) çizelge 3.1'de belirtilmiş olup verilen ölçülerde hazırlanmıştır. Araştırmanın amacına göre uygun oksin ve sitokinin seçilip eklenerek besi ortamının pH'ı pH metre ile 5.8 olacak şekilde ayarlanmıştır. Katılaştırma ajanı olarak kültür besi ortamına 5.458 g agar eklenmiş ve hazırlanan besi ortamı, 25 dakika süre ile 121 ºC'de 1 atm basınç altında, otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra besi ortamı, steril kabin içerisinde Magenta GA-7 kaplarına bölüştürülmüştür.

Çizelge 3.1. 1/1 MS Besi Ortamının İçeriği

Agar	5.458 g
Sakkaroz	30 g
Makro Elementler	100 ml
Mikro Elementler-1	10 ml
Mikro Elementler-2	1 ml
Kompleks Kelatör	10 ml
Vitamin Karışımı	1 ml
B1 Vitamini Çözeltisi	1 ml
Distile Su	1000 ml'ye tamamlandı.

3.2.4.3. Bitki Büyüme Hormonlarının Hazırlanması

Stok çözeltilerin tümü genellikle g/ml konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin (BBD) hazırlanması için, büyüme hormonları için gerekli olan miktarlar bir parça alüminyum folyo içinde tartılmıştır. 50 veya 100 ml'lik steril balon jojeler içerisine bırakılmıştır ve her madde az miktarda (5-10 ml) 1 M KOH veya HCl ya da alkolde çözdürülmüştür. Bazı maddeler ise (2,4-D için) alkolde eritilmiştir. Çözülen bitki büyüme düzenleyicisi steril saf suyla, 50 ml veya 100 ml'ye tamamlanmıştır. Büyüme maddelerinin hazırlanan stok çözeltileri buzdolabında +4 ºC'de saklanarak, her 2-3 haftada bir yeniden taze solüsyonlar hazırlanmıştır.

BAP Çözeltisi (10^{-3})

6-Benzilaminopurin (BAP)	100 mg
1N HCl	3-5 cc
Distile su	100 ml'ye tamamlandı.

Kinetin Çözeltisi (10^{-3})

Kinetin (6-furfuroaminopurin)	100 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlandı.

NAA Çözeltisi (10^{-3})

α Naftalen asetik asit (NAA)	100 mg
% 95'lik Etil Alkol	3-5 cc

Distile su	100 ml'ye tamamlandı.

IAA Çözeltisi (10^{-3})

İndolasetikasit (IAA)	100 mg
% 95'lik Etil Alkol	5-10 cc
Distile su	100 ml'ye tamamlandı.

2,4- D Çözeltisi (10^{-3})

2,4 Diklorofenoksi asetikasit (2,4-D)	100 mg
% 95'lik Etil Alkol	100 ml

IBA Çözeltisi (10^{-3})

IBA	100 mg
%95'lik Etil Alkol	3-5 cc
1N NaOH	1 cc
Distile su	100 cc'ye tamamlandı.

3.2.5.Çalışmada Kullanılan Tohumların Sterilizasyon Çalışmaları

Nepeta baytopii Hedge & Lamond'un tohumları %70 alkolde 30 saniye ön sterilizyona tabi tutulmuştur. 1. denemede %3, %5, %7 ve %10'luk NaOCl'de sırasıyla 10'ar dakika ve 2. denemede ise 15'er dakika bekletildi. 5 kez 5'er dakika saf suda çalkalanarak NaOCl arındırıldı (Çizelge 3.2a ve Çizelge 3.2b), 3.denemede ise sadece %7 ve % 10 NaOCl'de 15'er dakika 4. denemede ise %7 ve %10 NaOCl'de 10'ar dakika bekletildi. 5 kez 5'er dakika saf suda çalkalanarak NaOCl arındırıldı. Bu parametrelerde ise farklı olarak son çalkalama suyundan sonra saf suda 10 dakika bekletildikten sonra suyun dibine çöken ve üstünde kalan tohumların ayrı ayrı ekimleri yapıldı (Çizelge 3.2c ve Çizelge 3.2d). Her parametre için 100'er tohum kullanıldı. Steril tohumların, çimlenmesi ve büyümesi için 1/1 MS besi ortamına 30 g/l sakkaroz ve 5.458 g/l agar ilave edildi. Besi ortamının pH'ı agar ilavesinden önce 5.8 olacak şekilde ayarlanarak 1 atm basınçta 121 ºC'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi.

Hazırlanan besi ortamı, magenda GA-7 kültür kaplarına, steril kabin içerisinde

bölüştürüldü. Steril kabin içinde, steril pens ve bistüri yardımı ile steril filtre kağıtları arasında tohumların birer birer kültür kaplarına ekimi yapıldı. Kültürü yapılan tohumlar sıcaklık ayarı 25 ± 2 ^{o}C olan ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyoda ayarlanmış kültür odasında gelişmeye bırakıldı. Kültüre alınan tohumlar; gelişimleri ve çimlenme oranları gözlemlenerek değerlendirme yapıldı.

Çizelge 3.2. *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un tohumlarının çimlenmesi ve dekontaminasyonu üzerine NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının ve uygulama süresinin etkisi
A:

İşlem	Uygulanan süre (dk)	Çimlenen tohum (%)	Çimlenmeyen tohum (%)	Enfekte olan tohum (%)
%3 NaOCl	10	22.0	45.0	33.0
%5 NaOCl	10	34.0	32.0	38.0
%7 NaOCl	10	58.0	42.0	0.0
%10 NaOCl	10	46.0	28.0	26.0

Sonuçlar kültürün 21.gününde ve 100 tohumun ortalamasını göstermektedir.

Çizelge 3.2. *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un tohumlarının çimlenmesi ve dekontaminasyonu üzerine NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının ve uygulama süresinin etkisi
B:

İşlem	Uygulanan süre (dk)	Çimlenen tohum (%)	Çimlenmeyen tohum (%)	Enfekte olan tohum (%)
%3 NaOCl	15	18.0	48.0	34.0
%5 NaOCl	15	32.0	43.0	25.0
%7 NaOCl	15	51.0	44.0	5.0
%10 NaOCl	15	40.0	42.0	18.0

Sonuçlar kültürün 21.gününde ve 100 tohumun ortalamasını göstermektedir.

Çizelge 3.2. *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un tohumlarının çimlenmesi ve dekontaminasyonu üzerine NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının ve uygulama süresinin etkisi
C:

	Uygulanan süre (dk)	Çimlenen tohum (%)	Çimlenmeyen tohum (%)	Enfekte olan tohum (%)
%7 NaOCl	15	52.0	40.0	8.0
%10 NaOCl	15	33.0	45.0	22.0

Sonuçlar kültürün 21.gününde ve 100 tohumun ortalamasını göstermektedir.

Çizelge 3.2. *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un tohumlarının çimlenmesi ve dekontaminasyonu üzerine NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının ve uygulama süresinin etkisi
D:

İşlem	Uygulanan süre (dk)	Çimlenen tohum (%)	Çimlenmeyen tohum (%)	Enfekte olan tohum (%)
%7 NaOCl	10	62.0	32.0	6.0
%10 NaOCl	10	40.0	38.0	22.0

Sonuçlar kültürün 21.gününde ve 100 tohumun ortalamasını göstermektedir.

3.2.6. Kültür Başlatma Çalışmaları

Çalışmanın bu aşamasında sterilizasyon parametrelerinin uygulamasından sonra *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un tohumları 1/1 MS hormonsuz besi ortamında kültüre alındı. Tohumların kültüre alınmasından 14-21 gün sonra ilk çimlenme

belirtileri olan radikula gelişimi ve takip eden günlerde ise yaprak gelişimi görülmüştür.

3.2.7. Sürgün Proliferasyon Çalışmaları

İn vitro koşullarda gerçekleştirilen sürgün proliferasyonu çalışmalarında sadece hormon çeşidi değil aynı zamanda konsantrasyonu da etkilidir. Bu nedenle bundan sonraki aşamalarda sitokinin çeşidi olan BAP (Benzilaminopurin) ve KİN'in (Kinetin) farklı konsantrasyonları denendi.

3.2.7.1. Sürgün Proliferasyonuna Farklı BAP Konsantrasyonlarının Etkisi

1/1MS hormonsuz besi ortamında kültüre alınan tohumların çimlenmesinden sonra, mikroçoğaltma çalışmalarının başlatılması için sürgün gelişimi üzerine BAP'ın farklı konsantrasyonlarının (0.00-0.0625-0.125-0.25-0.5-1-1.5-2-2.5 mg/l) etkisi araştırılmıştır. BAP'ın farklı konsantrasyonlarını içeren 1/1 MS besi ortamlarına çimlenme çalışmalarından elde edilen genç sürgünler, her bir kapta 4 adet sürgün olacak şekilde 9 farklı besi ortamında kontrol ile birlikte kültüre alınarak, büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır. Sürgün sayısı, sürgün boyu ve morfolojik gözlemler haftalık olarak alınmış ve veriler kaydedilmiştir.

3.2.7.2. Sürgün Proliferasyonuna Farklı KİN Konsantrasyonlarının Etkisi

Kinetinin farklı konsantrasyonlarını içeren (0.00-0.0625-0.125-0.25-0.5-1-1.5-2-2.5 mg/l), 1/1MS besi ortamlarına çimlenme çalışmalarından elde edilen genç sürgünler 9 farklı besi ortamında, kontrol ile birlikte kültüre alınarak Kinetinin etkisi araştırılmıştır. Kültüre alınan sürgünler büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır. Haftalık gözlemler; sürgün sayısı, sürgün boyu ve morfolojik gözlemler olarak veriler kaydedilmiştir.

3.2.7.3. Sürgün Proliferasyonuna BAP ve Farklı Oksin Kombinasyonlarının Etkisi

Sürgün proliferasyonu üzerine test edilen BAP ve KİN'in parametreleri arasında 0.125 mg/l BAP oranının sürgün çoğaltımı için en uygun oran olduğu saptandı. Sürgün proliferasyonuna sitokinin ve farklı oksin konsantrasyonlarının etkileri araştırıldı. Bu bilgiler doğrultusunda 0.125 mg/l BAP ile NAA, IAA, IBA ve 2,4 D'nin farklı konsantrasyonlarını içeren besi ortamları (0.00-0.25-0.125-0.0625 mg/l) hazırlanarak

mikroçoğaltım üzerine oksin ve sitokininin kombine etkisi araştırılmıştır. Besi ortamında 0.125 mg/l BAP oranı sabit tutularak NAA, IAA, IBA ve 2,4 D'nin farklı konsantrasyonlarını (0.00-0.25-0.125-0.0625 mg/l) içeren besi ortamları hazırlandı. Besi ortamı pH'ı agar ilavesinden önce 5.7 - 5.8 olacak şekilde ayarlanarak 1 atm basınçta 121 ºC'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Köklendirme çalışmaları için genç sürgünler NAA, IAA, IBA ve 2,4 D 'nin farklı konsantrasyonlarını (0.00-0.25-0.125-0.0625 mg/l) içeren besi ortamlarında ayrı ayrı kültüre alınmıştır. Sürgünlerin besi yerlerine aktarımından sonra kültür kapları kapatılıp parafilm ile sarılarak büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır.

Bu çalışmada 0.125 mg/l BAP ve IBA'nın farklı konsantrasyonlarının (0.00-0.25-0.125-0.0625 mg/l) etkisi morfolojik gözlemler ile sürgün boyu, sürgün sayısı değerlendirilmiştir.

3.2.7.4. BAP + Oksin Konsantrasyonlarında Köklenen Sürgünlerin Toprağa Adaptasyon çalışmaları

Elde edilen köklü bitkiciklerin büyük bir kısmının toprağa adaptasyonu sağlanarak, bitki doku kültürü tekniği ile kısa zamanda çok daha hızlı bir şekilde sürgün çoğaltımı yoluna gidilmiştir.

İn vitro ortamda elde edilen köklü fideciklerin toprağa adaptasyonu aşamalı olarak gerçekleştirildi. İn vitro ortamda kök oluşturan fideler kültür kaplarından çıkarılıp musluk suyunda iyice yıkanarak jelinden arındırıldı. Turbiyer toprağın bulunduğu saksılar bolca sulandı ve köklü fideler, hazırlanan bu saksılara ekildi. Hava almayacak şekilde saksıların üzeri plastik torbalar ile kapatıldı. Saksılara ekimi yapılan fideler 16/8 fotoperiyoda 25 ± 2 ºC'deki kültür odasına gelişmeye bırakıldı. 3. gün saksıların üzerini örten plastik torbalarda küçük delikler açıldı. Bu sayı 9-10. güne kadar aşamalı olarak artırıldı. 10. gün saksıların üzerindeki plastik torbalar 5 dakika süre ile tamamıyla çıkarıldı. Torbaların saksılardan çıkarılma süresi 20-25 güne kadar kademeli olarak artırıldı. 20-25 günden sonra plastik torbalar tamamen çıkarıldı ve saksılardaki bitkiler büyüme odasında büyümeye bırakıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kültür Başlatma Çalışmaları

Nepeta baytopii Hedge & Lamond'un tohumları (Şekil 4.1.) %70 alkolde 30 saniye ön sterilizyona tabi tutulmuştur. 1. denemede %3, %5, %7 ve %10 NaOCl'de sırasıyla 10'ar dakika ve 2. denemede ise 15'er dakika, 3. denemede ise sadece %7 ve % 10 NaOCl'de 15'ar dakika 4. denemede ise %7 ve %10 NaOCl'de 10'ar dakika bekletildi. 5 kez 5'er dakika saf suda çalkalanarak NaOCl arındırıldı. 3. denemede diğer 2 denemeden farklı olarak son çalkalama suyundan sonra saf suda 10 dakika bekletildikten sonra suyun dibine çöken ve üstünde kalan tohumların ayrı ayrı ekimleri Çizelge 3.2a, Çizelge 3.2b, Çizelge 3.2c, Çizelge 3.2d'de görüldüğü gibi yapıldı.

Nepeta baytopii Hedge & Lamond'un tohumlarının sterilizasyonunda %7 NaOCl'de 10 dakika bekletildikten sonra 5 kez 5'er dakika saf suda çalkalanarak NaOCl arındırıldı. Son çalkalama suyundan sonra saf suda 10 dakika bekletilmesi esnasında tohumların bir kısmının suyun dibine çöktüğü, bir kısmının ise suyun üzerinde toplandığı görüldü. Bu tohumlar magenta GA7 kültür kaplarına ayrı ayrı ekildi.

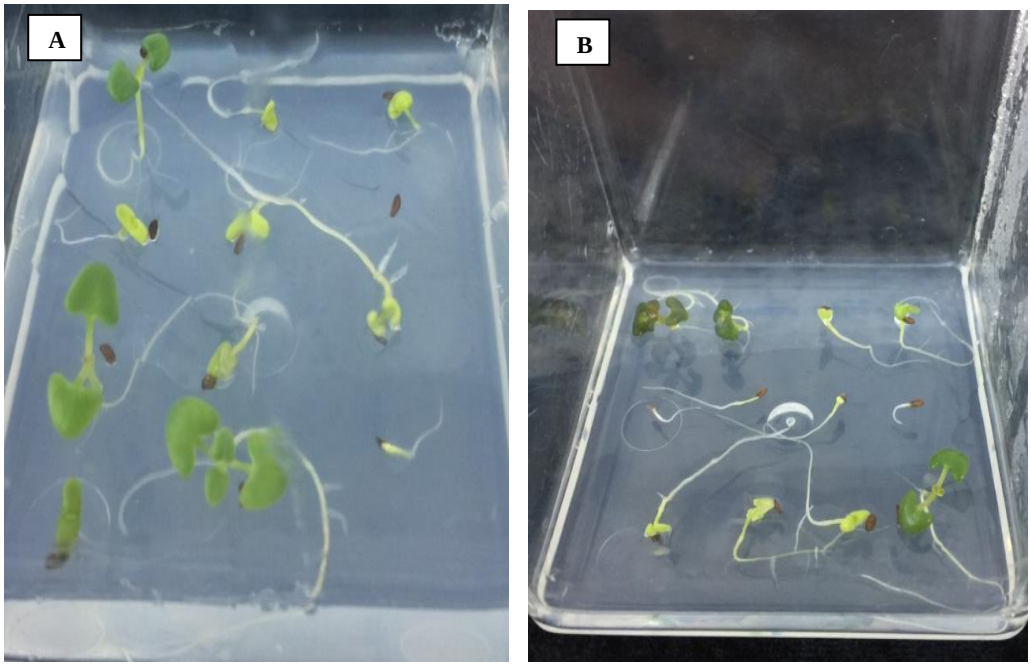
Tohumların sterilizasyonu üzerine test ettiğimiz denemelerden 4. denemenin çimlenme ve dekontaminasyon üzerine etkili olduğu görüldü. Steril tohumlar hormonsuz 1/1 MS ortamında kültüre alındıktan 14-21 gün sonra çimlenmenin belirtileri kendini göstermiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3).



Şekil 4.1. *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un bitki tohumlarının genel görünüşü



Şekil 4.2. Hormonsuz 1/1 MS besi ortamında kültüre alınan *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un tohumlarının genel görünüşü



Şekil 4.3. *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un çimlenen tohumlarının genel görünüşü

4.2. Sürgün Proliferasyon Çalışmaları

4.2.1.Sürgün Proliferasyonuna Farklı BAP (Benzilaminopurin) Konsantrasyonlarının Etkisi

İn vitro şartlarda çimlenen tohumlardan elde edilen sürgünler, proliferasyon çalışmalarının başlatılması için, sitokinin çeşidi olan BAP'ın 9 farklı konsantrasyonunun (0.00-0.0625-0.125-0.25-0.5-1-1.5-2-2.5 mg/l) etkisini araştırmak amacı ile Bölüm 3.2.7.1.'de belirtildiği şekilde kontrol ile birlikte kültüre alınarak, büyüme odasında gelişmeye bırakıldı.

Kültür işlemlerinden 3 hafta sonra sürgün proliferasyonuna BAP'ın farklı konsantrasyonlarının etkisi hem morfolojik açıdan gözlemlenmiş hem de sürgün boyu ve sürgün sayısı açısından değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1.). BAP için denenen tüm parametreleri kontrol ile birlikte kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman sürgün sayısı ve sürgün boyu açısından en iyi cevap veren besi ortamının 0.125 mg/l BAP (Sürgün sayısı 5.5000 ± 2.59190^{a} ve sürgün boyu 1.8725 ± 0.95084^{a}) olduğu testpit edilmiştir (Şekil 4.4.). Ayrıca morfolojik gözlemlerimiz sonucunda, 0.125 mg/l'den yüksek olan BAP konsantrasyonlarında (0.25-0.5-1-1.5-2-2.5 mg/l) sürgün sayısı fazla olmuş olsa dahi yeni sürgün oluşumunun, yaprak gelişiminin ve sürgün uzunluğunun doğal ortamda büyüyen bitkilerdeki görünümünü kaybettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.5-4.6-4.7-4.8). Besi ortamındaki BAP miktarı artıkça sürgünlerin genel görünümünde (yapraklarda

klorofil kaybı, materyalin besiyeri ile temas ettiği yerlerde kararma) istenmeyen belirtiler kendini göstermiştir. Kontrol grubunda sürgünlerdeki gelişim iyi değildi. 5 materyalde zayıf kök oluşumu gözlendi. Taban kallusu oluşumu görülmedi. 0.0625 mg/l BAP'lı ortamda 2 adet taban kallusu, 0.125 mg/l BAP'lı ortamda 14 adet taban kallusu gözlendi. 0,25 mg/l BAP'lı ortamda 1 adet taban kallusu ile birlikte vitrifikasyon ve aşırı derece klorofil kaybı görüldü. 0,5 mg/l BAP'lı ortamda sürgünlerin gövdelerinde, kahverengileşme ve sertleşme ile birlikte 1 adet taban kallusu oluşumu görüldü. 1 mg/l BAP'lı ortamda kallus oluşumuna rastlanmazken sürgünlerin klorofillerini tamamen kaybettiği ve vitrifiye olduğu gözlenmiştir. 1,5 mg/l BAP'lı ortamda genel itibari ile bu parametrede kallus gelişimi sıkı yapılı değildi. Sürgün gelişimi ve boy uzunluğu iyi değildi. 41 adet taban kallusu ve 48 adet primer kök oluşumu gözlendi. Morfolojik gözlemlerimizde, bu parametredeki sürgünlerden oluşan kalluslar sıkı değildi. Sürgün gelişimi ve sürgün boyundaki gelişim normal değildi.

2 mg/l BAP'da bitkilerin genel görünümü kötü, klorofil kaybı çok, sürgünler vitrifiye olmuş ve sağlıksız sürgünler olarak gelişti. 30 adet taban kallusu ve 36 adet primer kök oluşumu gözlendi. Genel görünüş itibarı ile sürgün gelişimi zayıf, klorofil kaybı ve vitrifikasyon ileri aşamada. 2,5 mg/l BAP'lı besi ortamında gelişen sürgünlerde ise gelişim zayıf, ileri aşamada vitrifikasyon ve klorofil kaybı ile birlikte hemen hemen sürgünlerin hepsinde taban kallusu ve primer kök oluşumu gözlendi. Sürgün yapraklarında deformasyon, yaprak pedisellerinde kahverengileşme söz konusu idi. 25 adet taban kallusu ve 20 adet primer kök gözlendi.

Çizelge 4. 1. Sürgün gelişimi üzerine farklı BAP konsantrasyonlarının etkisi

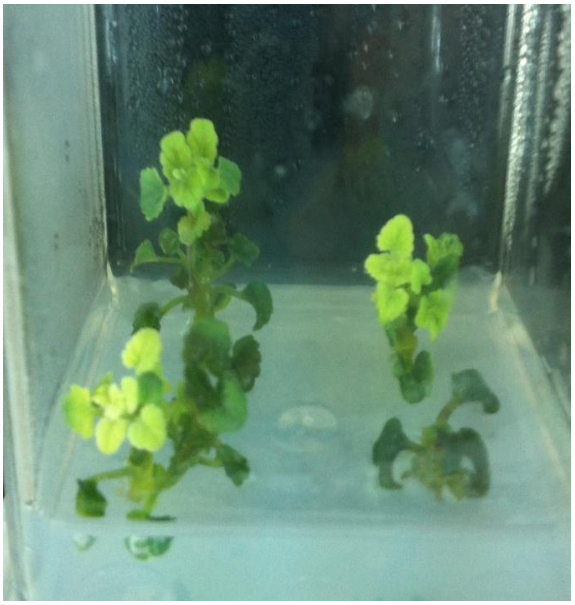
	SÜRGÜN SAYISI (Ortalama ± Standart Sapma)	**SÜRGÜN BOYU** (Ortalama ± Standart Sapma)
KONTROL	1.10 ± 0.87^{d}	0.66 ± 0.36 ^{d}
0.0625 mg/l BAP	3.17 ± 2.42^{c}	1.39 ± 0.47 ^{b}
0.125 mg/l BAP	5.50 ± 2.59^{a}	1.87 ± 0.95 ^{a}
0.25 mg/l BAP	0.92 ± 0.76^{d}	0.64 ± 0.29 ^{d}
0.5 mg/l BAP	0.80 ± 0,40^{d}	0.57 ± 0.36 ^{d}
1 mg/l BAP	0.97 ± 0.69^{d}	0.62 ± 0.39 ^{d}
1.5 mg/l BAP	4.12 ± 2.01^{b}	1.13 ± 0.59 ^{c}
2 mg/l BAP	3.70 ± 1.88^{cb}	1.08 ± 0.74 ^{c}
2.5 mg/l BAP	4.27 ± 2.08^{b}	0.95 ± 0.58 ^{c}

Rakamlar kültürün 4. haftasında 20 materyalin ortalamasını göstermektedir.

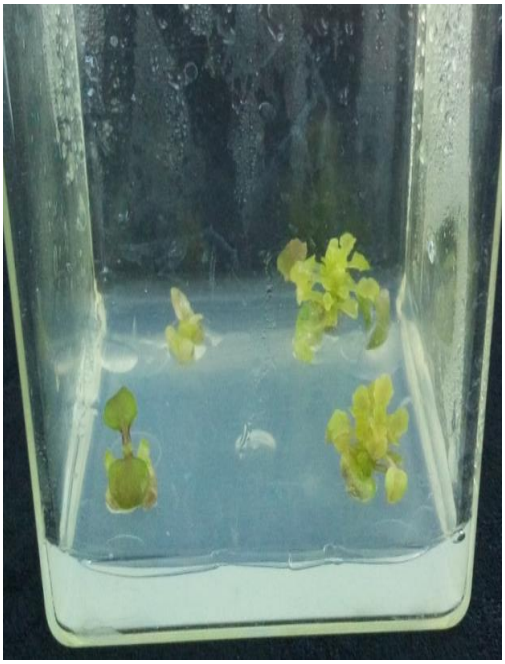
İstatistiksel olarak sürgün boyu ve sürgün sayısı için DUNCAN testi uygulanmıştır. Ortalamalar arasındaki farklılık P>0.01 oranında değerlidir. Gelişigüzel seçilen explantlardan elde edilen sonuçlarda SPSS Paket Programı (20.0) uygulanmıştır. Uygulamalar arasındaki farklılıkların önemine vurgu yapmak için Duncan yöntemi yani tek yönlü varyans analizi test edilmiştir. Explant sayıları parametreler için ayrı ayrı seçilmiştir. Güvenirlik oranı her test için ($p < 0.05$) %95 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. 0,0625 mg/l BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü



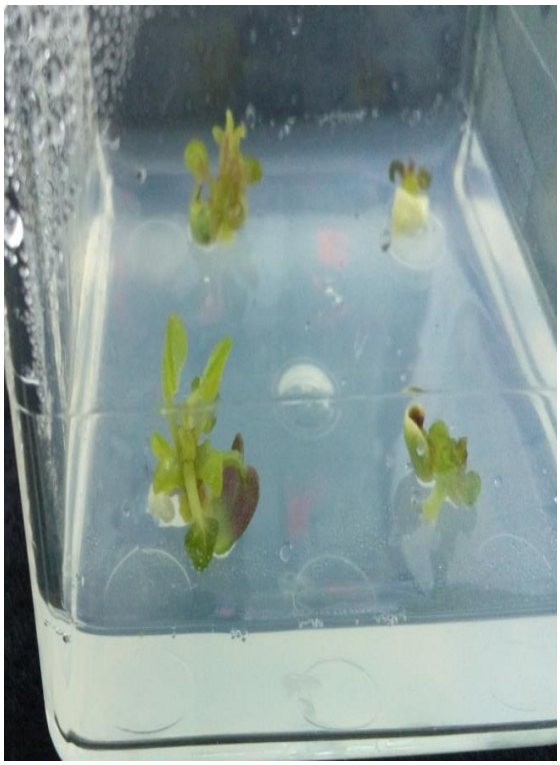
Şekil 4.5. 0,125 mg/l BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.6. 0.25 mg/l BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.7. 0.5 mg/l BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.8. 1 mg/l BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.9. 1,5 mg/l BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.10. 2 mg/1BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.11. 2.5 mg/1 BAP ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü

4.2.2.Sürgün Proliferasyonuna Farklı KİN (Kinetin) Konsantrasyonlarının Etkisi

İn vitro şartlarda çimlenen tohumlardan elde edilen sürgünler proliferasyon çalışmalarının başlatılması için, sitokinin çeşidi olan Kinetinin 9 farklı konsantrasyonun (0.00-0.0625-0.125-0.25-0.5–1-1.5–2-2.5 mg/l) etkisini araştırmak amacı ile Bölüm 3.2.7.2.'de belirtildiği şekilde kontrol ile birlikte kültüre alınarak, büyüme odasında gelişmeye bırakıldı (Şekil 4.12-4.13-4.14-4.15-4.16-4.17-4.18). Haftalık gözlemler, sürgün sayısı, sürgün boyu ve morfolojik gözlemler çizelge 4.2'de görüldüğü gibi değerlendirildiğinde, her parametrede hafif kallus oluşumuna rastlandı ve kalluslar soluk yeşil, gevşek idi.

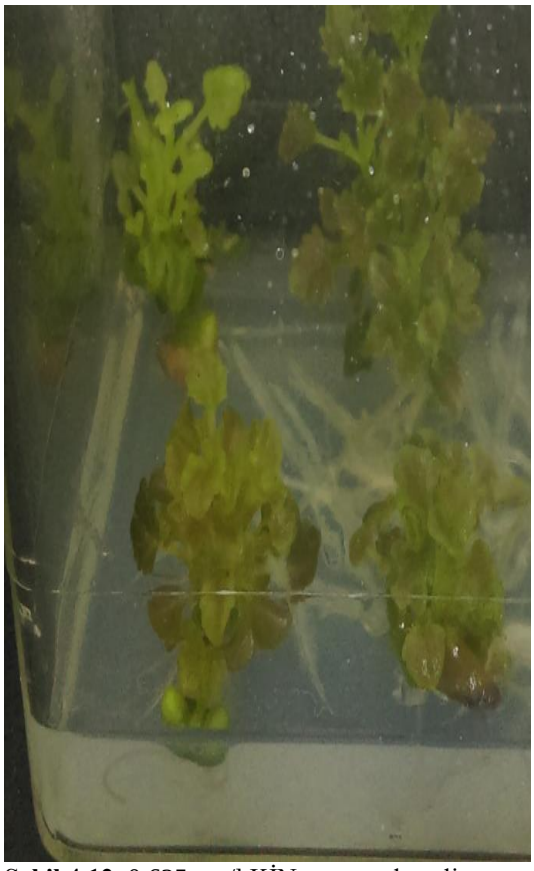
Kontrol grubunda, sürgün boyunda belirgin bir uzama olmadığı, sürgün sayısının ise kinetinin diğer parametrelerine (1.5 mg/l KİN hariç) yakın olduğu görüldü. Kinetinin hemen hemen tüm parametrelerinde gelişen sürgünlerin ve yeni sürgün oluşmayan kültürlerde de kallus oluştuğu görüldü. 1.5 mg/l KİN'den elde edilen sürgünler, kinetinin diğer parametreleri ile karşılaştırıldığında her ne kadar sürgün sayısı diğer parametrelere göre yüksek olmuş olsa dahi, kallus oluşumu içsel hormon miktarının artmasına neden olduğundan oluşan kalluslardan aşırı sürgün gelişim söz konusu olmuştur.

Fakat oluşan sürgünler kullanıma uygun olmayan sağlıksız sürgünlerdir. Besiyeri ile temas eden bölgeler de sürgünlerde kararma kahverengileşme görülürken aynı zamanda sürgünlerin kırılgan bir hal aldığı ve vitrifikasyonun geliştiği tespit edildi.

Çizelge 4. 2. Sürgün gelişimi üzerine farklı KİN konsantrasyonlarının etkisi

	SÜRGÜN SAYISI (Ortalama ± Standart Sapma)	**SÜRGÜN BOYU** (Ortalama ± Standart Sapma)
KONTROL	2.42 ± 1.31 **c**	1.41 ± 0.97 **d**
0.0625 mg/l KİN	3.82 ± 1.66 **b**	2.34 ± 1.56 **c**
0.125 mg/l KİN	2.75 ± 1.03 **cb**	1.37 ± 1.14 **d**
0.25 mg/l KİN	3.35 ± 1.61 **cb**	1.54 ± 0.71 **d**

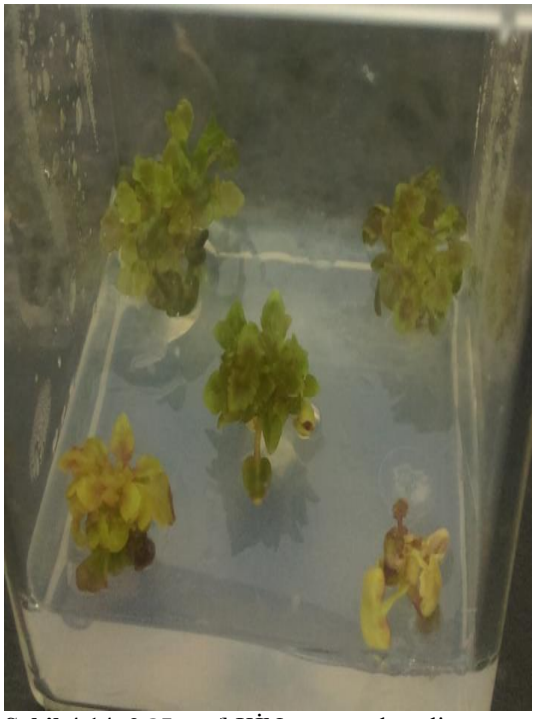
0.5 mg/l KİN	2.60 ± 1.33 ^{cb}	1.13 ± 0.52 ^{d}
1 mg/l KİN	3.97 ± 2.21 ^{b}	1.62 ± 0.73 ^{d}
1.5 mg/l KİN	13.37 ± 2.70 ^{a}	4.47 ± 2.44 ^{a}
2 mg/l KİN	1.65 ± 1.12 ^{d}	1.34 ± 0.74 ^{d}
2.5 mg/l KİN	3.65 ± 1.98 ^{b}	3.19 ± 2.21 ^{b}



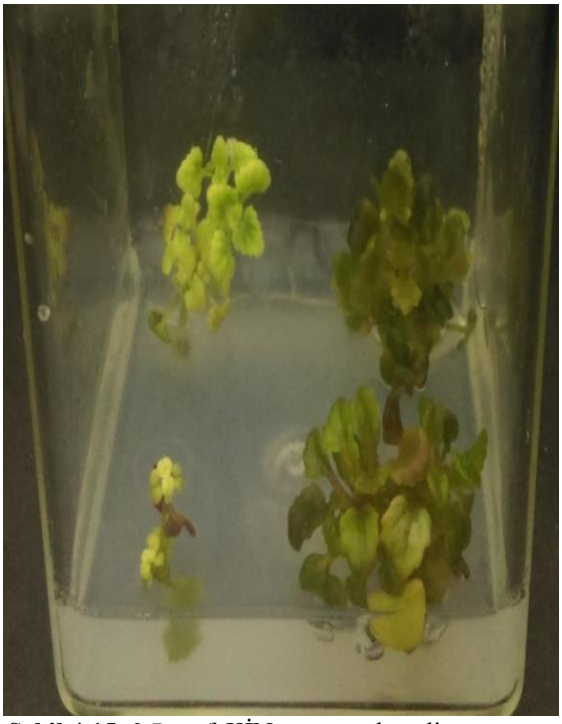
Şekil 4.12. 0.625 mg/l KİN ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.13. 0.125 mg/l KİN ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.14. 0.25 mg/l KİN ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.15. 0.5 mg/l KİN ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.16. 1 mg/l KİN ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü



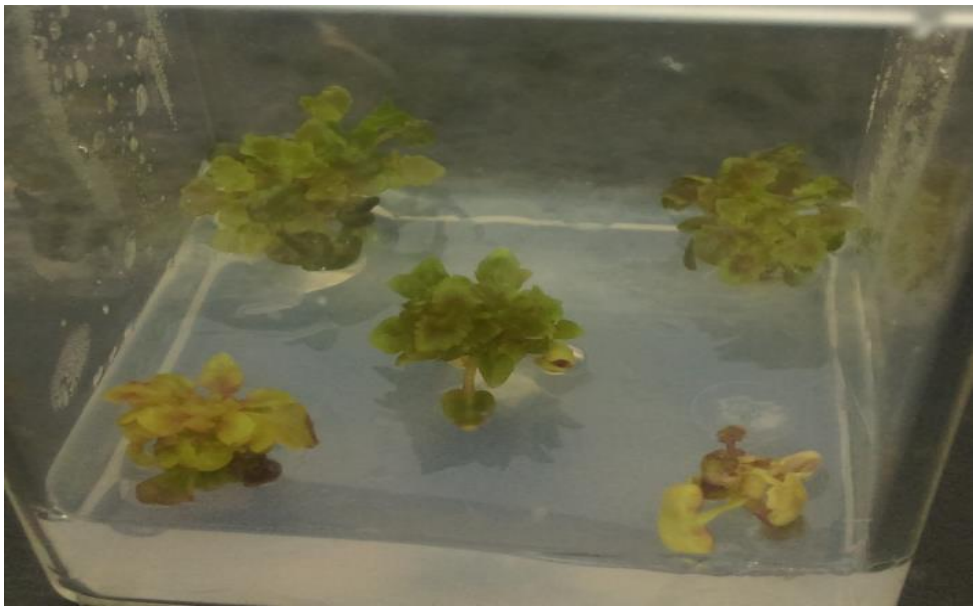
Şekil 4.17. 1,5 mg/l KİN ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.18. 2 mg/l KİN ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.19. 2.5 mg/l KİN ortamında gelişen sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.20. Kontrol grubundaki sürgünlerin genel görünüşü

4.2.3.BAP (Benzilaminopurin) + Farklı Oksin Kombinasyonlarının Sürgün ve Kök Proliferasyonuna Etkisi

Sürgün proliferasyonu üzerine test edilen BAP ve KİN'in parametreleri arasında 0.125 mg/l BAP oranının sürgün çoğaltımı için uygun olduğuna karar verildikten sonra

besi ortamında 0.125 mg/l BAP oranı sabit tutularak NAA, IAA, IBA ve 2,4 D'nin farklı konsantrasyonlarını (0.00-0.25-0.125-0.0625 mg/l) içeren besi ortamları hazırlandı. Besi ortamı pH'ı agar ilavesinden önce 5.8 olacak şekilde ayarlanarak 1 atm basınçta 121 ºC'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Çimlenmeden sonra elde edilen genç sürgünler, 0.125 mg/l BAP'ın yanına NAA, IAA, IBA ve 2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarını (0.00-0.25-0.125-0.0625 mg/l) içeren besi ortamlarında ayrı ayrı kültüre alındı. Kültür işlemlerinden 3 hafta sonra morfolojik gözlemlerimizi değerlendirdiğimizde aşağıdaki sonuçları elde ettik.

-0.125mg/l BAP + NAA:

Sürgün boyları iyi fakat köklenme zayıf idi. Her 3 parametre için de her kapta 1 veya 2 materyalde boy uzaması vardı. Genel olarak sürgün boyu gelişimi ve köklenme zayıf, sürgün gelişiminde pek bir değişim olmadı (Şekil 4.21). NAA'nın litredeki oranı azaldıkça sürgün boyunda uzama görüldü. NAA'nın litredeki oranı artıkça da zayıf kök oluşumuna rastlandı (Şekil 4.22).



Şekil 4.21. 0.125 mg/l BAP + 0.25 mg/l NAA ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü



Şekil 4.22. 0.125 mg/l BAP + 0.0.0625 mg/l NAA ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü

-0.125 mg/l BAP + IBA:

0.25 mg/l IBA da sürgün gelişimi normal, yapraklar açık yeşil renkteydi. Her kapta 3 veya 4 materyalin hepsinde sürgün gelişimi vardı. IBA'nın litredeki oranı azaldıkça sürgünlerin alt yapraklarında kuruma ve kök oluşumu gerçekleşmeden kararma görüldü. 0.0625 mg/l IBA da gelişen sürgünlerdeki kök gelişim, 0.25 mg/1 IBA'ya göre daha zayıf ve kökler çok kısa, yapraklar açık yeşildi (Şekil 4.23). 0.125 mg/l BAP + 0.125 mg/l IBA ortamında köklü fideciklerin genel görünüş itibari ile materyalin besiyeri ile temas eden yüzeyinde kök oluşumu görülmeden kararma olduğu tespit edildi (Şekil 4.24). Köklenme, oksinin diğer çeşitlerindeki (NAA, 2.4-D, IAA) tüm parametrelerine göre daha iyi gelişmişti. IBA'nın tüm parametrelerinde kök oluşumu tespit edildi. Kök oluşumuna en iyi cevap veren 0.25 mg/l IBA idi (Şekil 4.25).



Şekil 4.23. 0.125 mg/l BAP + 0.0625 mg/l IBA ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü



Şekil 4.24. 0.125 mg/l BAP + 0.125 mg/l IBA ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü



Şekil 4.25. 0.125 mg/l BAP + 0.25 mg/l IBA ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü

-0.125 mg/l BAP + IAA:

0.25 mg/l IAA'lı ortamda, aşırı bir kallus oluşumu görüldü. Sürgün boyu diğer IAA 'in parametrelerine göre daha iyi idi. Materyalin besiyeri ile temas eden yerlerinde kararma ve kırmızılaşma vardı (Şekil 4. 26). Kök gelişiminin zayıf olduğu materyallerde sürgün gelişimide zayıf oldu. Yaprak yapısı doğal görünümünü kaybetmeye başladı. 0.0625 mg/l IAA'li ortamda yapraklardaki klorofil kaybı aşırı olduğunda sürgünlerde gelişim olmadı. Hemen hemen her materyalde taban kallusu görüldü. Yapraklar kurumaya başladı. Besiyeri ile temas edilen bölgelerde kararma vardı (Şekil 4. 27). 0.125 mg/l IAA'lı ortamda gelişen sürgünlerin hemen hepsinde taban kallusu görüldü. Yapraklar normalden küçük ve açık yeşil, zayıf bir kök gelişimi vardı. Alt yapraklarda kahverengileşme vardı (Şekil 4.28). IAA'in tüm parametrelerinde kök oluşumu yok denecek kadar azdı.



Şekil 4.26. 0.125 mg/l BAP + 0.25 mg/l IAA ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü



Şekil 4.27. 0.125 mg/l BAP + 0.0625 mg/l IAA ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü



Şekil 4.28. 0.125 mg/l BAP + 0.125 mg/l IAA ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü

-0.125 mg/l BAP + 2,4-D:

0.25 mg/l 2,4-D'li ortamda 2 kapta 1-2 materyalde sürgün gelişimi görülmesine rağmen kaplarda sürgün gelişimi yok denecek kadar azdı. Yapraklar normal görünümünden daha küçük ve açık yeşil idi. 0.25 mg/l 2,4-D'li bu ortamda yoğun kallus oluşumu görüldü (Şekil 4.29). 0.125 mg/l 2,4-D'li ortamda aynı kapta (Magenta GA7) sürgünlerin bazıları hiç gelişmezken bazıların da ise anormal sayılacak gelişme rastlandı. Besiyeri ile materyalin temas ettiği yerlerde kararma tespit edildi. Taban kallusu oluşumu vardı. Fakat kallus oluşumu 0.25 mg/l 2,4-D kadar iyi değildi. Yapraklar sık ve küçük gövde uzaması diğer parametrelere göre nispeten daha iyi ama vitrifiye olmuştu (Şekil 4. 30). 0.0625 mg/l 2,4-D'li ortamda ise yapraklar çok küçük ve klorofil kaybı yoğundu. 2,4-D'nin diğer 2 parametresine göre köklenme daha iyi kallus oluşumu zayıftı, fakat denediğimiz oksin çeşitlerinden IBA'nın 0.25 mg/l'den daha iyi değildi. 2,4-D'nin tüm parametrelerinde tam bir kallus ve taban kallusu oluşumu vardı. (Şekil 4.31). Kültürlerin ekimden 3 hafta sonra morfolojik gözlemlerimiz sonucunda 0.125 mg/l BAP + 0.25 mg/l IBA ortamında köklenmenin diğer parametrelere göre daha iyi olduğu gözlendi.



Şekil 4.29. 0.125 mg/l BAP + 0.25 mg/l 2,4-D ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü



Şekil 4.30. 0.125 mg/l BAP + 0.125 mg/l 2,4-D ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü

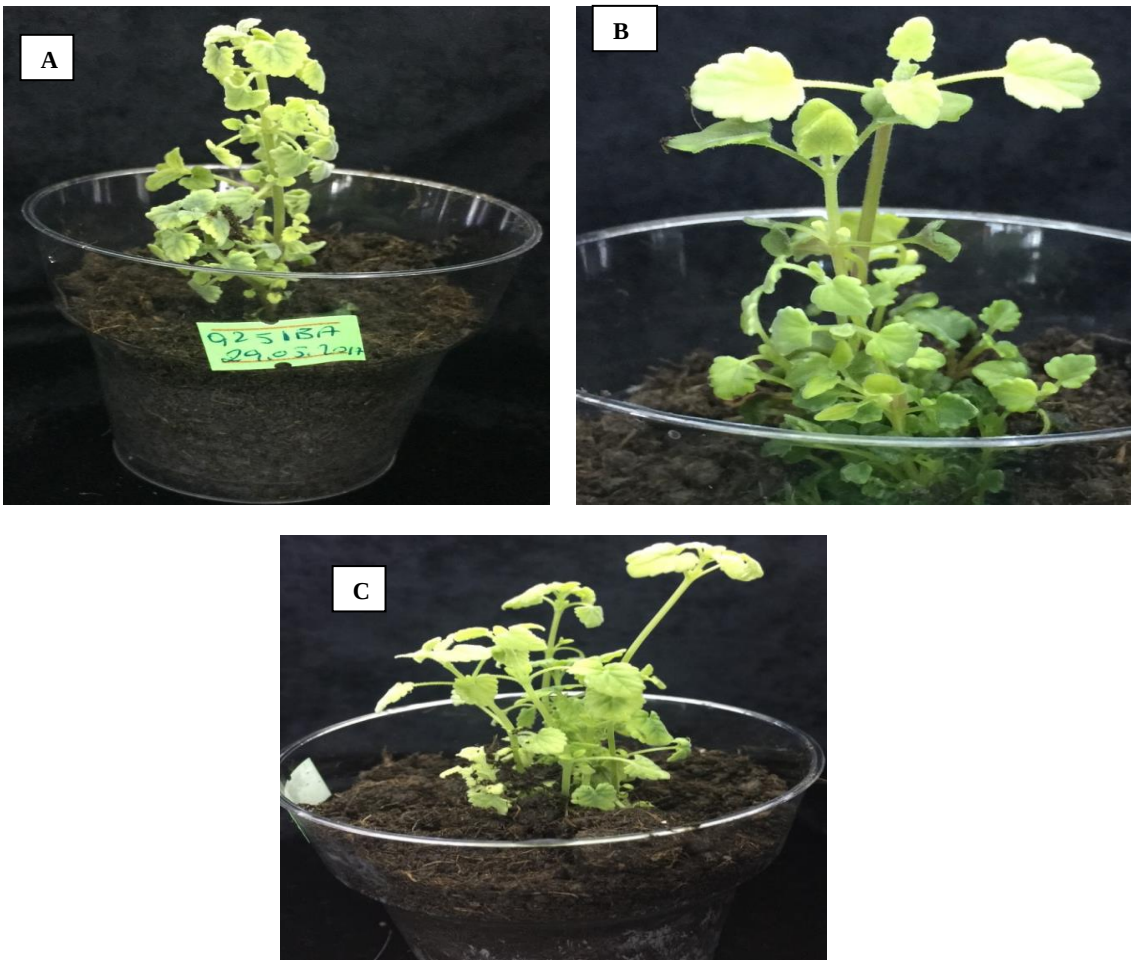


Şekil 4.31. 0.125 mg/l BAP + 0.625 mg/l 2,4-D ortamında köklü fideciklerin genel görünüşü

4.2.4. Köklenen Sürgünlerin Dış Ortama Adaptasyon Çalışmaları

İn vitro ortamda elde edilen köklü fideler kültür kaplarından çıkarılarak musluk suyunda iyice yıkanarak jellerinden arındırıldı. Turbiyer toprağın bulunduğu plastik bardaklara yerleştirildi. Hava almayacak şekilde saksıların üzeri plastik torbalar ile kapatıldı. Daha sonra saksılar 16/8 fotoperiyoda 25 ± 2 ºC'deki kültür odasında büyümeye bırakıldı. 3.gün plastik bardakların üzerini örten plastik torbalarda küçük delikler açıldı. Bu sayı 9-10 güne kadar kademeli olarak artırıldı. 10.gün bardakların üzerindeki plastik torbalar tamamen çıkarıldı. Köklü fideler turbiyer toprağının

bulunduğu saksılara ekildi. Gelişim için büyüme odasına bırakıldı (Şekil 4.32 A, Şekil 4.32 B, Şekil 4.32 C, Şekil 4.33 A,B).



Şekil. 4.32. Aklimatizasyon çalışmalarının 10.gününde bitkilerin genel görünüşü



Şekil 4. 33. Bitkiciklerin toprağa adaptayonu çalışmaları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada amacımız, Türkiye'deki başlıca yayılış alanları Batı, Güney ve Doğu Anadolu bölgesi olan *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un tohumları için uygun bir sterilizasyon protokolü oluşturmak ve aynı zamanda proliferasyon için uygun sitokinin çeşidini ve konsantrasyonunu tespit etmekti. Yaptığımız literatür araştırmasında, bitkisel materyal olarak kullandığımız *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond ile ilgili hiçbir *in vitro* çalışmaya rastlamamış olmamız, ayrıca bu bitkisel materyalin endemik bir tür oluşu bizi bu yönde çalışmaya teşvik etmiştir.

Bir çok bitki türü için rapor edilmiştir ki düşük konsantrasyonlu bir oksin ile bir sitokininin kombinasyonu sürgün oluşumunu ve gelişimini pozitif yönde etkilemektedir. (Yuan ve ark. 1994, Vandemoortele ve ark. 1996, Kaur ve ark. 1998, Sıngh & Sehgal 1999, Meszaros ve ark. 1999, Cuenca ve ark. 1999, Martın 2003). Çalışmamızda bu bilgiyi desteklemektedir.

Çalışmamızın sonunda sterilizasyon protokolü başarı ile sağlanmış olup ve en ideal sterilizasyon şartlarının %7 NaOCI'de 10 dakika bekletilmesinin ardından son çalkalama suyunda 10 dakika bekletilmesinden sonra suyun dibine çöken tohumların kültür ortamına ekimi ile, çimlenme yüzdesinin diğer denemelere göre daha fazla olduğu görüldü.

Literatür çalışmaları esnasında karşılaştığımız tek çalışma olan Danijela M. Mısıc ve ark. (2005) Sırbistan'da yetişen çok yıllık bitki, endemik ve tehlike sınırında olan *Nepeta rtanjensis*'in mikroçoğaltımı ve yeniden üretimi ile ilgili araştırmalarında, bu tür için bir sterilizasyon, çoğaltım ve köklenme protokolü geliştirmeye yönelik bir parametre çalışması göremedik. Ayrıca bu türün tohumlarından sürgün proliferasyonu için hormonsuz ortamlar veya düşük seviyelerde BAP (0.05-0.5 mg/l) ve (0.1 mg /l) IAA ile takviye edilmiş ortamların, sürgün çoğaltılması için en iyi kombinasyonlar olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamız da ise *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un sürgün proliferasyonu için bir sitokinin olan BAP'ın sürgün boyu, sürgün sayısı ve morfolojik görünümü açısından değerlendirdiğimiz zaman, 0.125 mg/l BAP'ın en uygun parametre olduğunu gördük ve bu oranda çok sayıda sağlıklı sürgünler elde ettik.

Mikroçoğaltım için kullanılan sitokinin çeşidi yönünden bizim sonuçlarımız araştırıcıların sonuçları ile uyuşmakta, fakat tespit edilen oranlar açısından farklılık

vardır. Bu veriler hormon çeşidi açısından aynı olsa dahi kullanılan hormon konsantrasyonunun türden türe değiştiğini gösterir. Köklendirme çalışmalarında ise oksinlerin 4 tipini (NAA-IBA-2,4-D-IAA) ve her oksininde 3 parametresini denedik. Köklü sürgün oluşumuna en iyi cevap veren parametrenin 0.25 mg/l IBA olduğunu tespit ettik. Oysa Danijela M. Mısıc ve ark. (2005). *Nepeta rtanjensis*'in *in vitro* ortamda köklenmesi için en iyi oksin tipinin IAA ve oranın ise 0.1 mg /l olduğunu bulmuşlar. Bizim sonuçlarımız ile örtüşmemektedir. Danijela M. Mısıc ve ark. (2005) *Nepeta rtanjensis*'in *in vitro* ortamda doğal ortamdan toplanan tohumlarının çimlenmesi üzerinde çok düşük bir oran (-1%) elde etmişlerdir.

Biz çalışmamızda *Nepeta baytopii* Hedge & Lamond'un tohumların çimlenmesinde, uygulanan sterilizasyon yönteminin iyi belirlenmesi gerektiğini ve bu tür çalışmalarda parametre denemelerinin çok önemli olduğunu, çimlenme %'si üzerinde direkt etki ettiğini tespit ettik. Sterilizasyon üzerine yaptığımız parametre çalışmaları sonunda çimlenme için geliştirdiğimiz sterilizasyon protokolü için %7 NaOCI'de 10 dakika bekletilmesinin en etkili yöntem olduğunu bulduk.

Böylece *in vitro* ortamda biyoteknolojik yöntemler ile bu tür için ilk kez bir sterilizasyon, sürgün çoğaltımı ve köklenmesi için de başarılı bir protokol oluşturmayı başardık. Bu çalışma ile, bu alanda gelecekte yapılacak araştırmalara ve araştırıcılara faydalı olacağımız kanısındayız.

6.KAYNAKLAR

Ahmad, V.U., Bano, S., Voelter, W. and Fuchs, W. 1981.Chemical examination of Nepeta *hindostana* (Roth) Hains. ***Tetrahedron Lett***, 22(18): 1715-1718.

Ahmad, V. U., Noorwala, M., Mohammad, F. V., Shah, M. G. and Parvez, A. 1993. Nepehinal: A new triterpenoidal aldehyde from *Nepeta hindostana* (Roth) Hains. ***Planta Medica***, 59(4): 366-368.

Akbay, P., Calis, I., Ündeger, Ü., Basaran, N., Ahmet Basaran, A. 2002. *In vitro* immunomodulatory activity of verbascoside from *Nepeta ucrainica* L. Phytotherapy Research. 16 (6): 593–595.

Anonymous. 1996. Agricultural Statistics of Turkey. Export reports, DIE, Ankara.

Arslan, N., Yılmaz G., Akınerdem, F., Özgüven M., Kırıcı S., Arıoğlu, H., Gümüşçü, A., Telci, İ. 2000. Tütün Ve Tıbbi-Aromatik Bitkilerin Tüketim Projeksiyonları Ve Üretim Hedefleri. 5. Türkiye Ziraat Müh. Teknik Kongresi Nişasta-şeker. S, 453.

Barazandeh, M.M. 2006. Essential oil composition of *Nepeta menthoides* Boiss.& Bushe from Iran. Journal Essent Oil Research, 18, 144–145.

Baser, K.H.C., Demirci, B., Kürkçüoglu, M., Tümen, G. 1999. Essential Oil of *Thymus zygioides* Griseb var. zygioides from Turkey. J. Essent. Oil Res., 11, 409.

Baytop, T. 1984. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). İstanbul Üniversitesi Yayınları, 340.

Baytop, T. 1984. Therapy with Medicinal Plants in İstanbul University Press Turkey. No:3255. pp. 185.

Baytop, T. 1997. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. Ankara Türk Dil Kurumu Yayınları, 227.

Baytop, T. 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün.İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, İstanbul. 550s.

Baytop, T. 2000. Anadolu Dağlarında 50 Yıl "Bir Bitki Avcısının Gözlemleri. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.

Bernardi, M.M., Fernandes, S., Zodi, A.L., Spinosa, H.S., Gorniak, S.L. 1998. Toxic effects of catnip (*Nepeta cataria*) exposure during embryogenetic period in mice. ***Toxicon*** 36(9): 1261-1262.

Bourrel, C., Perineau, F., Michel, G., Bessiere, J.M. 1993.Catnip (Nepeta cataria L.) essential oil analysis of chemical constituents, bacteriostatic and fungistatic properties. Journal Essent

Oil Research, 5(2): 159–167.

Calmasur, O., Aslan, I., Sahin, F. 2006. Insecticidal and acaricidal effect of three Lamiaceae plant essential oils against Tetranychus urticae Koch and Bemisia tabaci Genn. Industrial Crops and Products, 23: 140–146.

Cigremis,Y., Ulukanli, Z., Ilcım A., Akgoz, M. 2010. *In vitro* antioxidant and antimicrobial assays of acetone axtracts from N. meyeri Bentham. European Review Medical Pharmacolocigal Sciences, Aug 14, (8): 661-8.

Clive, A., Stace, C. 1980. Plant Taxonomy and Biosistematics. London.

Cotrium, H., C., Barroso, J., G., Figueiredo, A., C., Pais, M., S., S., Scheffer, J., C. 2006.Composition of the essential oil from inflorescences of *Nepeta tuberosa* L. ssp. Tuberosa. Flavour and Fragrance Journal, 9 (2), 71-73.

Cuenca S., AMO-MARCO J.B., PARRA R. 1999. Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant Centaurea paui Loscos ex Willk. (Coinpositae). ***Plant Cell Rep***., 18: 674-679.

Damirov, İ.A., Prilipko, L.İ., Şükürov, D.E., Kerimov, Y.B. 1983. Lekarstvennaye Rasteniya Azerbaydjana. İzdatelstvo Maarif, Baku, 84–85.

Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, R., Linssen, J.P.H. 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. ***Journal of Science of Food and Agriculture***, 77: 140–146.

Dirmenci, T. 2003. Türkiye'de Yetişen Nepeta L. (Lamiaceae) Türleri Üzerinde Taksonomik Araştırmalar. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

Dragolova, D., Dimitrova, M., Stefanov, D., Dankov, K., Goltsev, V., Kapchina,V. 2015. Long-Tıme Adaptıve Changes In Photosynthetıc Electron Transport In Leaves Of Catmınt (*Nepeta Nuda* Ssp. Nuda, L.) Mıcropropagated Plants After Theır Transfer To The Fıeld. BIOLOGIE, Cilt 68, No: 7.

Duke JA. 1986. Handbook of Medicinal Herbs. Boca Raton, FL: CRC Press.

Erbil, N.2012.Ardahan Yöresinde Yetişen Lamiaceae (Labiatae) Familyasına Ait Bazı Türlerin Biyoaktiviteleri. Doktora Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.

Estilai, A., Hatemi, A. 1990. Chromosome Number and Meiotic Behavior of Cultivated Chia, *Salvia hispanica* (Lamiaceae) . ***Hortscience***, 25 (12): 1646-1647.

Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Baser, K.H.C. 2000.Flora of Turkey and the EastAegean Islands. Supplement 2, 158-159, Edinb. Un. Press, Edinburgh.

Hedge, I. C. 1986. Lamiaceae of south-west Asia: diversity, distribution and endemism. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, 89B: 23-25.

Kaur K.,Verma B., Kant U. 1998. Plants obtained from the Khair tree (Acacia catechu Willd.) using mature nodal segments. ***Plant Cell Rep***., 17: 427-429.

Kobaisy, M., Tellez, M.R., Dayan, F.E., Mamonov, L.K., Mukanova, G.S., Sitpaeva, G.T., Gemejieva, N.G. 2005. Composition and phytotoxic activity of *Nepeta pannonica* L. Essential oil. Journal Essent Oil Research, 17, 704–707.

Kokdil, G., Yalcin, S. M., Topcu, G. 1999. Nepetalactones and other Constituents of *Nepeta nuda* ssp. albiflora.Turk. J. Chem. 23: 99-104.

Mammadova, Z., Mammadov, R. 2014. Nahcivan ÖzerkCumhuriyeti (Azerbaycan) Arazisinde Yayılış Gösteren Nepeta L. Türleri. Afyon Kocatepe University Journal of Science & Engineering, Vol.14 Issue 2, p1-5. 5p.

Mancini E., Apostolides A.N., Feo V., Formisano C., Rigano D., Piozzi F. i F. 2009. Phytotoxic effects of essential oils of *Nepeta curviflora* Boiss. And *Nepeta nuda* L. subsp. albiflora growing wild in Lebanon. J. Plant. ***Interact***, 4(4): 253-259.

Martın K.P. 2003.Rapid *in vitro* multiplication and ex vitro rooting of *Rotula aquatica* Lour, a rare rhoeophytic woody medicinal plant. Plant Cell Rep., 21: 415-420.

Meszaros A., Bellon A., Pınter E. & Horvath G. 1999. Micropropagation of lemon balm. Plant Cell Tiss.Organ Cult. 57: 149-152.

Miceli N., Taviano M.F., Giuffrida D., Trovato A., Tzakou O. i E.M. 2005.Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Bentham. J. Ethnopharmacol. 97: 261-266. Galati.

Mijović, A., Popović, Z., Mišić, D., Karadžić, B. 2007. Estimation on photosynthetic efficiency in three populations of *Nepeta rtanjensis* Diklić & Milojević. Bocconea, 21: 297-301, ISSN 1120-4060.

Misic, D.M., Ghalawenji, N.A., Grubisic, D.V., Konjevic, R.M. 2005.Micropropagation and Reintroduction of Nepeta rtanjensis, an Endemic and Critically Endangered Perennial of Serbia. Phyton-Ann. Rei Bot., Cilt 45: 9-20.

Murashige, T., Skoog, F.A. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco

tissue cultures. *hysiologia Plantarum*, 15, 473– 479.

Mutlu, S., Atici, O. 2009. Allelopathic effect of *Nepeta meyeri* Benth.extracts on seed germination and seedling growth of some crop plants. Acta Physiologiae Plantarum, 31, 1, 89-93.

Nostro, A., Cannatelli, M.A., Crisafi, G., Alonzo, V. 2001. The effect of Nepeta cataria extract on enzyme production of *Staphylococcus aureus*. International Journal Antimicrobial Agents, 18: 583–585.

Nunez, R.D., De Castro, C.O. 1992. Palaeoethnobotany and Archaeobotany of The Lamiaceae in Europa and The Near East. Advances in Labiatae Science, 437-454s.

Pavela R. 2005. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of Spodoptera littoralis. ***Fitoterapia***, Vol. 76, Issues 7–8, 691-696.

Rigano, D., Nelly, A.A., Conforti, F., Menichini, F., Formisano, C., Piozzi, F., Senatore, F. 2011.Characterisation of the essential oil of *Nepeta glomerata* montbret & Aucher ex Bentham from Lebanon and its biological activites. Natural Product Research, Vol. 25 No: 6614-626.

Rustaiyan, A., Jamzad, M., Masoudi, S., Ameri, N., 2006.Volatile constituents of *Nepeta hellotropifolia* Lam., Menthamozaffarianii Jamzad and *Ziziphorapersica Bunge*. Three labiatae herbs growing wild in Iran. Journal Essent Oil Research, 18, 348–351.

Sajjadi, S.E. 2005. Analysis of the essential oil of *Nepeta sintenisii* Bornm. from Iran. ***Daru Journal of Pharmaceutical Sciences***, 13(2): 61-64.

Saraçoğlu, İ., Başaran, A., Çalış, İ. 1989. Türkiyede halk ilaçı ve çay olarak kullanılan bitkilerin *Nepeta caesarea* Boiss. Lamiaceae üzerinde ön araştırmalar. Uluslaraarası Eczacılık Bilimleri Sempozyomu, Ankara ÜN.Ecz.Fak., 21-23 haziran 1989.

Shishkin, B.K. (ed.) 1954. Flora of The U.S.S.R, Vol. XX, Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moskva-Leningrad. Translated from Russian Israel Program For Scientific Translations, Jerussalem (1976).

Sıngh N.K., Sehgal C.B. 1999. Micropropagation of 'Holy Basil' (*Ocimum sanctum* Linn.) from young inflorescences of mature plants. ***Plant Growth Regul***., 29: 161-166.

Vandemoortele J.L., Bıllard J.P., Boucaude J., Gaspar T. 1996. Micropropagation of parsley through axillary shoot proliferation. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 44: 25-30.

Yuan Y.J., Hu T.T., Yang Y.M. 1994.Effects of auxins and cytokinins on formation of Cataranthus roseus G. Don multiple shoots. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 37: 193-196.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Melek SÜRER HAN

Doğum Yeri : Diyarbakır

Doğum Tarihi : 12.09.1987

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lise : Muazzes Sümer Anadolu Kız Meslek Lisesi /2002-2006

Lisans :Dicle Üniversitesi /2010-2014

YüksekLisans :Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü/2015-

Proje ve Sertifika

Pedagojik Formasyon Eğitim Sertifikası / D.Ü. Ziya Gökalp Eğitim Fak.

Sosyal Etkileşim Projesi: Dicle ve Ankara Üniversiteleri Aarasında Bilimsel İşbirliği ve Deneyim Paylaşımı

DÜPTAM Uygulamalı Moleküler Teknikler ve Workshop I: Western Blot ve Hücre Kültürü Uygulamaları /2017

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI İNTİHAL RAPORU FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Melek SÜRER HAN
ÖĞRENCİ NO	15801006
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2017/2018
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	BİYOLOJİ
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Yetişen ve Endemik Bir Tür Olan ***Nepeta baytopii*** Hedge & Lamond'un *İn vitro* Mikroçoğaltım Yollarının Araştırılması.
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	40
BENZERLİK ORANI	% 15
RAPORLAMA TARİHİ	28/05/ 2018

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam **40** sayfalık kısmına ilişkin, **7/05/2018** tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı **% 15** 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

☒ Kabul/Onay sayfaları hariç,
☒ Kaynakça hariç
☐ Alıntılar hariç/dâhil
☐ Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

(İmza)
Melek SÜRER HAN

(İmza)
22/06/2018
Prof. Dr. Süreyya NAMLI
Tez Danışmanı

(İmza)
22/06/2018
Prof. Dr. Yüksel ÇOŞKUN
Anabilim Dalı Başkanı