T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Centaurea depressa BIEB.'İN *IN VITRO* BİTKİ REJENERASYONU VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Ahmet Çağlar KAYA
I. DANIŞMAN: Doç. Dr. Nurhan KESKİN
II. DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Mahsa POURALI KAHRIZ

VAN-2022

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Centaurea depressa BIEB.'İN *IN VITRO* BİTKİ REJENERASYONU VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Ahmet Çağlar KAYA

VAN-2022

KABUL VE ONAY SAYFASI

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Nurhan KESKİN danışmanlığında, Ahmet Çağlar KAYA tarafından sunulan "*Centaurea depressa* BIEB.'in *in vitro* Bitki Rejenerasyonu ve Antibakteriyel Aktivite Özelliklerinin Belirlenmesi" isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 27/12/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Khalid Mahmood KHAWAR İmza:

Üye: Doç.Dr. Nurhan KESKİN İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Solmaz NAJAFI İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun …./..../….. tarih ve .....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Ahmet Çağlar KAYA

ÖZET

CENTAUREA DEPRESSA BIEB.'İN *IN VITRO* BİTKİ REJENERASYONU VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

KAYA, Ahmet Çağlar
Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
I. Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nurhan KESKİN
II. Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mahsa POURALI KAHRIZ
Ocak 2022, 42 sayfa

Centaurea depressa Bieb. Türkiye florasında önemli bir tıbbi aromatik ve süs bitkisi olmasına rağmen, mikroçoğaltımı üzerinde çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu çalışmada, i*n vitro* koşullarda çimlendirilmiş *C. depressa* tohumlarından gelişen *in vitro* bitkiciklerin; hipokotil, gövde, yaprak, kotiledon, boğum ve sap boğum organlarından mikroçoğaltım gerçekleştirilmiş ve bitki ekstraktlarının antibakteriyel aktiviteleri belirlenmiştir. Eksplantlar 0.20 mg/l BAP (6-Benzil amino pürin); 0.10, 0.15, 0.30, 0.45 ve 0.60 mg/l NAA (Naftalen asetik asit) içeren MS (Murashige ve Skoog) ortamda kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda 0.20 mg/l BAP ve 0.15 mg/l NAA içeren MS ortamında kotiledonlardan rejenerasyon elde edilmiş ve sürgünler farklı IBA (İndol-3-bütirik asit) konsantrasyonları içeren ortamlarda köklendirilerek dış koşullara alıştırılmıştır. Ek olarak, farklı 2,4-D (2,4-Diklorofenoksi asetik asit) konsantrasyonları içeren MS ortamında yaprak, aksiller tomurcuk ve kotiledon eksplantlarından somatik embriyogenez elde edilmiştir. En iyi somatik embriyogenez 0.6 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kaydedilmiştir. Antibakteriyel aktivite çalışmaları sonucunda ise *C. depressa*'nın gövde ve yaprak ekstraktlarının *Staphylococcus aureus* ATTCC25923, gram (+) *Escherichia coli* ATCC8739 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC25823 gram (-) bakterilerine karşı belirgin düzeyde etkili olduğu gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Bitki doku kültürü, *Centaurea* sp., Ekstrakt, Floristik zenginlik, Tıbbi ve aromatik bitki.

ABSTRACT

DETERMINATION OF *IN VITRO* PLANT REGENERATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Centaurea depressa* BIEB.

KAYA, Ahmet Çağlar
MSc. Thesis Horticulture
Supervisor I : Assoc. Prof. Dr. Nurhan KESKİN
Supervisor II : Asst. Prof. Dr. Mahsa POURALI KAHRIZ
January 2022, 42 pages

Although, *Centaurea depressa* Bieb. is an important medicinal and ornamental plant in the flora of Turkey, there is few studies about its micropropagation. In current study, micropropagation was performed in the hypocotyl, stem, leaf, cotyledon, node of the *in vitro* plantlets grown from C. *depressa* seeds germinated *in vitro*, and antibacterial activities of plant extracts were determined. Explants were cultured in MS (Murashige and Skoog) medium with 0.20 mg/l BAP (6-Benzyl amino purine) containing 0.10, 0.15, 0.30, 0.45 and 0.60 mg/l NAA (Naphthalene acetic acid). As a result of the study, regeneration was obtained from cotyledons in MS medium contained 0.20 mg/l BAP and 0.15 mg/l NAA, and the shoots were rooted in the medium included different IBA (Indole-3-butyric acid) concentrations and acclimated to external conditions. In addition, somatic embryogenesis was obtained from explants of leaf, axillary bud and cotyledon in MS (Murashige ve Skoog) medium contained different concentrations of 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid). The best somatic embryogenesis was recorded in MS medium contained 0.6 mg/l of 2,4-D. As a result of antibacterial activity studies, it was observed that the stem and leaf extracts of C. *depressa* were considerably effective against *Staphylococcus aureus* ATTCC25923, gram (+) *Escherichia coli* ATCC8739 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC25823 gram (-) bacteria.

Keywords: *Centaurea* sp., Extract, Floristic richness, Medicinal aromatic plant, Plant tissue culture.

ÖN SÖZ

Tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Nurhan KESKİN başta olmak üzere, Dr. Öğr. Üyesi Mahsa POURALI KAHRIZ, Dr. Öğr. Üyesi Parisa POURALI KAHRIZ, Doç. Dr. Şeyda ÇAVUŞOĞLU, Prof. Dr. Nalan TÜRKOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Solmaz NAJAFI, Prof. Dr. Younes REZAEE DANESH ve Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme en içten ve sonsuz şükranlarımı sunarım.

2022

Ahmet Çağlar KAYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT iii
ÖN SÖZ v
İÇİNDEKİLER vii
ÇİZELGELER LİSTESİ ix
ŞEKİLLER LİSTESİ xi
SİMGELER VE KISALTMALAR xiii
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ 5
2.1. Centaurea Türlerinde Yapılmış Bazı Doku Kültürü Çalışmaları 5
2.2. Disk Difüzyon Yöntemi 10
2.3. Gram (+) ve Gram (-) Bakteriler 10
2.3.1. *Staphylococcus aureus* 10
2.3.2. *Escherichia coli* 10
2.3.3. *Pseudomonas aeruginosa* 11
2.4. *Centaurea* Türlerinde Yapılmış Bazı Antibakteriyel Aktivite Belirleme Çalışmaları 11
3. MATERYAL VE YÖNTEM 17
3.1. Bitki Materyali 17
3.2. Tohum Canlılık Testi 17
3.3. Besin Ortamı 18
3.4. Eksplant Seçimi ve Rejenerasyon 19
3.4.1. Sürgünlerin köklendirilmesi 20
3.4.2. Elde Edilen bitkilerin dış koşullara alıştırılması 20
3.5. Somatik Embriyo Oluşumu 20
3.6. *C. depressa* Bitkisinin Yapraklarından Uçucu Yağın Elde Edilmesi 20
3.7. Antibakteriyel Aktivenin Belirlenmesi 21
3.8. İstatistik Analiz 21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 23
4.1. Tohum Canlılık Testi 23

4.2. Yüzey Sterilizasyonu 23
4.3. Besin Ortamı 24
4.4. Rejenerasyon Çalışmaları 24
4.4.1. *In vitro* köklendirme ve akilimatizasyon 27
4.4.2. *C. depressa* bitkisinde somatik embriyo oluşumu 29
4.5. Antibakteriyel Aktivetenin Belirlenmesi 32
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 35
5.1. Sonuçlar 35
5.2. Öneriler 36
KAYNAKLAR 37
ÖZ GEÇMİŞ 43

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.1. MS ortam bileşenleri ve litredeki konsantrasyonları 18

Çizelge 3.2. Kullanılan BDM, çözücüleri ve saklama koşulları 19

Çizelge 4.1. Tohumların yüzey sterilizasyonunda kullanılan ticari çamaşır suyu konsantrasyonları ve uygulama süresinin etkileri 23

Çizelge 4.2. *C. depressa* bitkisinin kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları 25

Çizelge 4.3. *C. depressa* bitkisinin kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonu 25

Çizelge 4.4. *C. depressa* bitkisinin köklendirilmesi ile ilgili varyans analizi sonuçları 27

Çizelge 4.5. *C. depressa* bitkisinin *in vitro* koşullarda farklı oranda IBA içeren ortamda köklendirilmesi 28

Çizelge 4.6. *C. depressa* bitkisinin somatik embriyo oluşumuna ait verilerinin varayans analizi sonuçları 30

Çizelge 4.7. Yaprak, koltuk altı meristem ve kotiledon boğumu eksplantlarından gelişen kallus, somatik embriyo ve bitki oluşumu 31

Çizelge 4.8. *C. depressa*'nın antibakteriyel aktivitesi 32

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 1.1. *C. depressa* Bieb. (Bussmann ve ark., 2020). 2

Şekil 1.2. Türkiye'de *C. depressa* Bieb.'in doğal olarak yetiştiği iller (Tubives, 2020). 3

Şekil 3.1. *C. depressa* Bieb. çiçeği ve tohumu. 17

Şekil 4.1. *C. depressa* bitkisinde sürgün rejenerasyonu. 26

Şekil 4.2. *C. depressa* bitkilerinin köklendirilmesi (a) ve saksılara akatarılması (b). ... 28

Şekil 4.3. Yaprak (a), koltuk altı meristem (b) ve kotiledon boğumu (c) explantlarından gelişen somatik embriyo, kallus ve köksüz-köklü bitkiler...30

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur

Simgeler	**Açıklama**
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
HCl	Hidroklorik Asit
l	Litre
m	Metre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
M	Molar
µM	Mikro molar
N	Normal
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaOCl	Sodyum hipoklorit
Sn	Saniye

Kısaltmalar	**Açıklama**
2,4-D	2, 4-Diklorofenoksi Asetik Asit
$AgNO_3$	Gümüş Nitrat
BAP	6-Benzilaminopurin
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical
F	F değeri
GA_3	Giberellik Asit

Kısaltmalar	**Açıklama**
IBA	Indol 3 Butirik Asit
KO	Kareler Ortalaması
Kin	Kinetin
MH	Mueller Hilton ortamı
MS	Murashige ve Skoog Ortamı
NAA	α-Naftalinasetik asit
NCCLS	Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
NP	Nano Partikül
RAPD	Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA
SD	Serbestlik Derecesi
SEM	Scanning Electron Mikroskobu
TDZ	Thidazuron (Fenil-3-1,2,3-thidiazol-5-il) üre
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
Tubives	Türkiye Bitkileri Veri Servisi
UV	Ultra viyole
VK	Varyasyon Kaynakları
ve ark.	ve arkadaşları

1. GİRİŞ

Bir ülkenin floristik zenginliği ve çeşitliliği, bitki türü sayısı ile önem kazanmaktadır (Ekim ve ark., 2000; IUCN, 2001; Vural ve ark., 2006). Türkiye iklim, jeolojik, jeomorfolojik, topografik, akarsu, göl, deniz gibi çeşitliliklerin yanı sıra, 0 ile 5000 m yükselti farklılıkları, üç değişik bitki coğrafyası bölgesinin birleştiği bir yerde yer alması nedeniyle biyoçeşitlilik bakımından oldukça zengindir (Özhatay ve ark., 2005).

Centaurea, *Asteraceae* = *Compositae* = Papatyagiller familyasının tür sayısı yönüyle en büyük cinsi olup, tür sayısı ve toplam takson sayısı bakımından, 179 tür 187 (Wagenitz 1975; Aytaç ve Duman 2005; Uzunhisarcıklı ve ark., 2005) ve/veya 214 takson (Davis ve ark., 1988; Güner ve ark., 2000) ile Türkiye Florası' nda, *Verbascum* (Sığır kuyruğu) ve *Astragalus* (Geven) cinslerinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Gen merkezi Türkiye'dir (Wagenitz, 1986). Bu cinse ait bitkiler nadiren dikenli dalları ya da herdemyeşil yapraklarıyla çalı halinde tek, iki veya çok yıllık otsu bitkilerdir (Yaltırık ve Efe, 1996). Halk arasında peygamber çiçeği, Timur dikeni, zerdali dikeni, çoban kaldıran, sarıbaş, gökbaş gibi isimlerle bilinirler. Dünyada ve ülkemizde geleneksel tıpta çok değişik amaçlarla kullanım alanı bulan bu bitkilerden yıllardan beri antidiyabetik, antiromatizmal, antienflamatuvar, antidiyareik, diüretik, stomaşik, adet söktürücü, hipotansif, sitotoksik, antipiretik, astrenjan, antibakteriyal olarak yararlanılmaktadır (Barrero ve ark., 1997; Orallo ve ark., 1998 Arif ve ark., 2004; Tan ve ark., 2008; Eskin, 2011; Bussmann ve ark., 2020).

C. depressa Bieb., *Centaurea* cinsi içerisinde *Cyanus* seksiyonunda yer almaktadır (Wagenitz, 1975). Deniz seviyesinden 2300 m yüksekliğe kadar işlenmiş ve işlenmemiş tarlalarda, marjinal arazilerde ve yol kenarlarında yetişebilen yabani bir ot olup, tıbbi-aromatik ve süs bitkisi olarak değerlendirilmektedir (Baytop ve Kadıoğlu, 2002; Dızkırıcı ve Koroglu, 2018).

C. depressa Bieb., tabandan itibaren dallanarak 20 ile 80 cm arasında boy ve 20 ile 50 cm aralığında da taç genişliği oluşturmaktadır (Şekil 1.1). Gövde gri renkli keçemsi tüylere sahiptir. Yapraklar, kenarları düz ve mızrak şeklinde sapsız ve karşılıklı dizilmiştir. Alt yapraklar lopludur ve uçtaki lop daha büyüktür. Çiçekleri oval

veya kadeh şeklinde bir başçık içerisinde toplanmış, 14-18x8-12 mm boyutlarında mavi renklidir. Olgun bir başçık bir ucunda tohum boyunun yarısı uzunluğunda tüylere sahip 5-7 adet tohum bulundurur. Tüyleri sayesinde tohumlar rüzgâr yardımıyla uzak mesafelere yayılabilir (Anonim, 2017). Türkiye'de Adana, Bolu, İstanbul, Iğdır, Kars, Kastamonu, İzmir, Afyonkarahisar, Amasya, Ankara, Bilecik, Burdur, Eskişehir, Erzurum, Elazığ, Gümüşhane, Kayseri, Konya, Karaman, Kırklareli, Sivas, Niğde, Uşak ve Van illerinde doğal olarak yetişmektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.1. *C. depressa* Bieb. (Bussmann ve ark., 2020).



Şekil 1.2. Türkiye'de *C. depressa* Bieb.'in doğal olarak yetiştiği iller (Tubives, 2020).

Bitki doku ve hücre kültürü; steril şartlarda, yapay besin ortamlarında, tam bir bitki, hücre (meristematik, kallus, süspansiyon hücreleri), doku (eksplant=bitki parçaları) ya da organ (apikal meristem, kök)'dan yeni bir doku, bitki ya da bitkisel ürünün üretilmesidir (Babaoğlu ve ve ark., 2001). Günümüzde bitki doku kültürleri yöntemlerinden özellikle tehdit altındaki endemik türlerin yanında şehirleşme ve antropojenik baskı altında bulunan taksonların da çoğaltılması ve korunmasında yararlanılmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda, *C. junaniana* (Hammat ve Evans, 1985), *C. paui* (Cuenca ve ark., 1999), *C. cyanus* (Kakegawa ve ark., 1991; Tanimoto ve Ishioka, 1991), *C. amacrocephala* (Hosoki ve Kimura ,1997; Takashi ve Daisuke, 1997), *C. rupestris* (Perica, 2003), *C. zeybekii* (Kurt ve Erdag, 2009), *C. ultreiae* (Mallon ve ark., 2010), *C. fenzlii* ve *C. derderifolia* (Demirel, 2015), *C. tchihatcheffii* (Özel ve ark., 2006; Arpaguş ve ark. 2017) ve *C. fenzlii* (Türkoğlu ve ark., 2018) gibi diğer *Centaurea* türlerinde doku kültürü çalışmaları rapor edildiği halde *C. depressa* Bieb. üzerinde yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı üzerine olumlu etkileri 1920'li yıllardan günümüze araştırılmaktadır (Vonderbank 1949; Dığrak ve ark., 1999). Doğada bulunan bitkilerin çoğunluğu antimikrobiyal özelliğe sahip olup, antibiyotiklere karşı bakterilerin direnç göstererek yayılmasını önlemek için alternatif tıpta bitkilerin antimikrobiyal olarak kullanımları önemlidir (Saraçoğlu, 2011). Bitkilerin tohum, gövde, rizom, kök ve yapraklarında birçok mikroorganizmanın gelişimini inhibe edecek

bileşikler ekstrakte edilmiş, bu bileşikler mikroorganizmalar üzerine denenerek aktiviteleri bilimsel olarak ortaya konmuştur (Ertürk ve Demirbağ, 2003).

Bu çalışmada *Centaurea depressa* Bieb.'in *in vitro* bitki rejenerasyonu ve antibakteriyel aktivete özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1. Centaurea Türlerinde Yapılmış Bazı Doku Kültürü Çalışmaları

Hammatt ve Evans (1985), tehdit altındaki *C. junaniana* bitkisinin kotiledon, hipokotil, kök ve yapraklarının sürgün rejenerasyon kapasitesini araştırmışlardır. İdeal sürgün oluşumu 5 mg/l BAP (6-Benzil amino pürin) ve 0.2 mg/l NAA (α-naftelenasetik asit) içeren MS ortamında gözlenmiştir. En iyi köklenme 0.01 mg/l IBA (indol-3-butirik asit) içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamından bitki başına 25 adet olarak elde edilirken, kök uzunluğu 20 mm olarak elde edilmiştir.

Hosoki ve Kimura (1997), C. *macrocephala* Pushk EX Willd'in mikroçoğaltımı için dikey olarak bölünmüş sürgünleri ve koltuk altı meristem eksplantlarını 0.44 μM BA (6-Benzil adenin) içeren MS ortamında kültüre almışlardır. 16 günlük kültür periyodundan sonra eksplant başına 2.0 adet sürgün elde edilmiştir. *In vitro* kültür yoluyla elde edilen mikro sürgünlerin % 70'i 25 μM IBA ile modifiye edilmiş Hyponex ortamında köklendirilmiştir. Elde edilen bitkiler kolaylıkla sera koşullarına adapte edilmiştir.

Pevalek-Kozlina (1998), Hırvat endemik türü olan *C. ragusina* L. için hızlı bir klonal çoğaltma yöntemi geliştirmiştir. Aseptik koşullarda çimlendirilmiş tohumlardan elde edilen sürgünler mikroçoğaltım için kullanılmıştır. En yüksek çoğaltım oranı, eksplant başına 4.6 sürgün ile 4 haftalık bir kültür periyodunda 1.0 μM BAP ve 2.9 μM gibberellik asit (GA_3) içeren ½ × MS ortamından elde edilmiştir. Kesilen sürgünler 2.5 μM IBA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Köklü bitkiler başarıyla saksı toprağına aktarılarak dış koşullara alıştırılmıştır.

Cuenca ve ark. (1999), Doğu İspanya'nın Valencia bölgesinde yayılış gösteren ve nesli son derece tehlikede olan endemik *C. paui*'de sterilizasyon protokolü oluşturmuş ve mikroçoğaltım sağlamışlardır. İlkbaharda çiçeklenen meristematik sürgünler doğadan toplanarak gövde aksamı 50 mm'lik parçacıklar şeklinde kesildikten sonra sabunlu suda bekletilmiş ve çeşme suyundan geçirilmiştir. Etanolde 1 dk tutulduktan sonra üç damla tween-80 içeren %7'lik CaOCl (Sodyum hipoklorit)'de 20 dk süre ile manyetik karıştırıcı üzerinde yüzey sterilizasyonu sağlanmış dört kez beşer

dk steril saf su ile durulanmıştır. Mikroçoğaltımda eksplant olarak bitkinin çiçek ekseni boğumları kullanılmıştır. En iyi sürgün oluşum oranı, 0.5 mg/l BA ya da 2 mg/l Kin (Kinetin) ile takviye edilmiş MS ortamında elde edilmiştir. Maksimum sürgün uzaması, MS ortamından elde edilirken bitki büyümeyi düzenleyici madde (BDM) ilave edilince sürgün boylarda azalma izlenmiştir. Altı haftalık *in vitro* sürgünler, köklendirilmek amacıyla 2 mg/l IAA (indol-3-asetik asit) + 2 mg/l IBA içeren MS ortamına alınmış, 30 gün içerisinde % 40 oranında köklenme elde edilmiştir. Köklenen bitkilerin yaklaşık % 70'i ise başarıyla saksılara aktarılmış ve *ex vitro* koşullara alıştırılmıştır.

Cuenca ve Amo-Marco (2000), Akdeniz İspanya bölgesinde endemik ve nesli tükenmekte olan *C. spachii*'nin mikroçoğaltımı için çiçek ekseni boğumlarını eksplant olarak kullanmışlardır. 1.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamında en yüksek çoğaltım oranı elde edilmiştir. En iyi köklenme (% 60), 2 mg/l IAA + 2 mg/l IBA kombinasyonundan elde edilmiştir. Ayrıca bu kültür ortamında sürgünlerin % 50'sinin 3 hafta sonunda köklendiği gözlenmiştir. Sera koşullarına aktarılan bitkilerin hayatta kalma oranı % 80 olarak rapor edilmiştir.

Curkovic-Perica (2003), güçlü antifitoviral, antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahip bir flavonoid içeren ve Alp dağlarının bir kolu olan Balkan dağlarına endemik *C. rupestris* L. için hızlı bir klonal çoğaltma yöntemi geliştirmiştir. Aseptik koşullarda çimlendirilmiş tohumlardan meydana gelen sürgünler, başlangıç eksplantı olarak kullanılmıştır. En yüksek çoğaltım oranı, eksplant başına 11.88 sürgün ile 1.0 μM BAP ve 2.9 μM GA_3 ile desteklenen MS ortamında üçüncü alt kültürde 4 haftalık kültür döneminde elde edilmiştir. Kesilen sürgünlerin en iyi köklenmesi, 3 μM IBA ile takviye edilmiş ½ × MS ortamında elde edilmiştir. Çalışma sonucunda köklü bitkiler saksı toprağına aktarılmış ve dış ortam koşullarına alıştırılmıştır.

Ozel ve ark. (2006), Ankara'nın Gölbaşı ilçesinde yetişen ve yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olan yıllık endemik *C. tchihatcheffii* bitkisinin zigotik embriyolarını sürgün rejenerasyonu için kullanmışlardır. En yüksek sürgün rejenerasyonunu 0.25 mg/l NAA ve 1 mg/l Kin ilaveli MS ortamında gözlenmiş ve sürgünler 1 mg/l IBA ilaveli MS ortamında köklendirilerek ve seraya aktarılmıştır.

Göztaş (2008), endemik *C. kotschyi* tohumlarının çimlenmesinde IAA, 2,4-D (2,4-Diklorofenoksi asetik asit), GA_3, ve Kin (Kinetin) hormonlarının etkilerini

araştırmış ve en yüksek çimlenme oranını % 62.5 ile 2 mg/l IAA içeren besin ortamlarında elde etmiştir.

Kurt ve Erdağ (2009), *C. zeybekii* Wagenitz'in tohumlarını yüzey sterilizasyonuna tabi tuttuktan sonra çeşitli *in vitro* çimlenme ortamlarında kültüre almışlardır. Tohum çimlenme sıklıkları fotoperiyottan etkilenmese de en yüksek çimlenme frekansı 24 ± 2 °C'de elde edilmiştir. 1 mg/l BA ile takviye edilmiş MS ortamında yüksek bir aksiller sürgün proliferasyonu frekansı elde edilmiştir. Daha sonra, koltuk altı sürgünleri ayrılarak köklenme için bitki büyüme düzenleyicileri (BDM) olan ve olmayan MS ortamına aktarılmıştır. Rizogenezis, yalnızca 0.5 mg/l IBA içeren ½ × MS ortamında 6 hafta sonra elde edilmiştir. Köklenme süreci çok yavaş ve sürgün köklenme yüzdesi de çok düşük (% 15) olmuştur.

Mallón ve ark. (2010), farklı sitokininlerin *C. ultreiae* sürgünlerinin çoklu sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkisi incelenmişledir. Çalışmada dört adet sitokinin BA, zeatin, Kin ve N6- (2-izopentil) adenin (2-iP) beş farklı konsantrasyonu içeren ½ × MS ortamı kullanılmıştır. En yüksek çoğaltım oranı (eksplant başına 5.52 sürgün), 4.44 μM BA içeren ortamda elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler 30 saniye boyunca 10 M NAA içeren bir çözeltiye batırılarak % 91 oranda köklendirilmiştir. Elde edilen bitkilerin % 100'ü dış koşullara alıştırmış ve uygulanan mikroçoğaltım sisteminin *C. ultreiae*'nin çoğaltılması için güvenilir bir yöntem olduğu ifade edilmiştir.

Gorgorov ve ark. (2011), endemik *C. caliacrae*, *C. finazzeri* ve *C. davidovii'*de 0.5 g/l BAP takviye edilen MS ortamında, sap eksplantlarından sürgün gelişimi belirlemişlerdir.

Alaiwi ve ark. (2012), *C. montana* ve *C. cyanus* türlerinde *in vitro* çiçeklenme ve hücre kültürü üzerine protokol geliştirmek için MS besin ortamını uygun hormonlarla kombine ederek etkili sürgün rejenerasyonu ve *in vitro* çiçeklenme sağlamışlardır.

Çölgeçen ve ark. (2012), endemik *C. tchihatcheffii'*de kallus oluşturma ve sekonder metabolit üretimini araştırmak amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Pappusu kesilen tohumlar 3 günde çimlenirken kesilmeyen tohumlar 7 günde çimlenmiştir. En iyi kallus oluşumu BA ve Kin içeren MS ortamlarında kotiledonlardan sağlanmıştır.

Yüzbaşıoğlu ve ark. (2012), *C. arifolia*'nın yaprak eksplantlarını 0.1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP ve 0.2 mg/l NAA + 2 mg/l BAP ile desteklenen MS ortamında kültüre almışlardır. 3 hafta sonunda aktif olarak gelişen kalluslar elde edilmiş ve bu kalluslar

üzerinde 3 hafta sonra adventif sürgün rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Rejenere olan sürgünler 1 mg/l IBA ilaveli MS ortamında köklendirilmiştir.

Okay ve ark. (2014), Ankara-Gölbaşı'nda yetişen ve kritik endemik bir bitki olan *C. tchihatcheffii*'nin tohumla ve doku kültürü yöntemi ile çoğaltılmasını araştırmışlardır. En yüksek çimlenme oranını % 85.2 ile 2 mg/l giberellik asit içeren ortamlarda, eksplant başına en fazla sürgün oluşumu ise 0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l IBA ileve edilmiş besin ortamlarında elde etmişlerdir. 1 mg/l IBA içeren MS besin ortamında % 86 oranında köklenme gerçekleşmiştir.

Aydoğan ve Erdağ (2015), *C. zeybekii*'de yaprak eksplantlarından farklı sitokininleri kullanarak 0.005 mg/l ve 0.01 mg/l TDZ (Thidiazuron) içeren ortamlarda en yüksek kallus oluşturma oranını (% 100) elde etmişlerdir. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 6.2 sürgün ile 1 mg/l Kin içeren MS ortamında belirlenirken, köklenme açısından MS ve ½ MS ortamları arasında fark gözlenmemiş ve 0.5 mg/l IBA ilaveli ortamda %15 oranında köklenme elde edilmiştir.

Gorgorov ve ark. (2015), kritik derecede tehlike altındaki Bulgaristan endemik türlerinden *C. davidovii* Urum.'un tek tohumundan çalışma başlatmışlardır. MS ortamında sürgün ve kök oluşumu izlenmiş ve süreç sürgünlerin alt kültürlü ile devam ettirilmiştir. MS ortama 0.5 mg/l BAP ilavesiyle 6 haftalık bir sürede eksplant başına 3.6 sürgün elde edilmiştir. Köklendirme için MS ortamı kullanılmıştır. Elde edilen bitkilerin ortalama % 96'sı dış koşullarına adapte edilmiştir.

Traykova ve ark. (2015), *C. pseudaxillaris*'in yaprak eksplantlarında en fazla rejenere sürgün oranını MS ortamına1 mg/l BAP desteği sağlayarak elde etmişlerdir.

Valletta ve ark. (2016), İtalya-Lazio'daki Circeo Dağı'nda sınırlı bir alanda yayılış gösteren endemik *C. cineraria* subsp. *circae*'de mikroçoğaltım, adaptasyon ve dış koşullara alıştırma çalışmaları yapmışlardır. En yüksek çimlenme oranını (% 65) +20 °C gündüz/10 °C gece sıcaklığında 12/12 fotoperiyotta kaydetmişlerdir. MS ortamına 2 mg/l Kin ve 0.5 mg/l BAP ilave edilen boğum eksplantlarında rejenere sürgün oranı % 74 olarak kaydedilirken, eksplant başına 5.67 adet sürgün elde edilmiştir. 0.5 mg/l IBA ilaveli MS ortamında % 100 köklenme sağlanmış ve bitkilerin % 90'dan fazlası dış koşullara adapte edilmiştir.

Atalay ve Erişen (2017), kritik endemik *C. lycaonica*'nın mikroçoğaltım potansiyelini araştırmışlardır. Nodal segmentler 0.5, 1.0 ya da 2.0 mg/l TDZ, BAP ya da

Kin destekli MS besin ortamında kültüre alınmış en iyi sonuç (8.73 adet sürgün/eksplant) 0.5 mg/l BAP ilaveli MS ortamından elde edilmiştir. Rejenerasyon amacıyla yaprak eksplantları, farklı BDM (NAA, BAP, TDZ, Kin) ilaveli MS ortamında kültüre alınmış, en iyi sonuç (32.27 adet sürgün/eksplant) 0.2 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP destekli ortamdan sağlanmıştır. Sadece Kin içeren ortamlarda eksplantların çoğunda kararma gözlenirken, TDZ ve TDZ-NAA kombinasyonlarında sadece kallus oluşumu kaydedilmiştir. Elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde en uygun ortamın 2.0 mg/l IAA olduğu tespit edilmiştir.

Demirel (2015), endemik *C. fenzlii* ve *C. derderifolia* türlerinin *in vivo* ve *in vitro* tohum çimlenmesini araştırmıştır. 16/8 fotoperiyot ve 25 °C sıcaklıktaki iklim odasında MS, B5, SH ve WH ortamlarında kültüre alınan tohumlarda en fazla çimlenme oranı WH besin ortamında meydana gelmiştir.

Türkoglu ve ark. (2018), endemik *Centaurea fenzlii*'de yaprak eksplantlarında en yüksek kallus oluşumunu 4.44 µM BAP+10.64 µM NAA, sürgün oluşumunu ise 8.88 µM BAP+2.685 µM NAA içeren ortamlardan elde etmişlerdir.

Ekinci (2019), kritik endemik *C. amaena* Boiss & Balansa'nın *in vitro* koşullarda hızlı çoğaltım potansiyelini araştırmıştır. Tohumlar %3 sukroz, %0.7 agar ilaveli MS ortamında çimlendirilmiştir. Oluşan fidelerin kotiledon, yaprak ve kotiledon boğumları farklı konsantrasyonlarda TDZ (0.3-1.2 mg/l), BAP (1-4 mg/l) ve *meta*-Topolin (*m*T; 0.5-4 mg/l) sitokininlerini veya bunların 0.5 mg/l NAA ile kombinasyonları ile destekli MS ortamında kültüre alınmıştır. Araştırma sonucunda kotiledon ve yaprak eksplantlarında TDZ konsantrasyonları veya bunların NAA ile kombinasyonlarında sadece kallus oluşumu gözlenmiştir. Kotiledon ve yaprak eksplantlarında sırasıyla en yüksek eksplant başına sürgün sayısı sırasıyla 4.152 ve 4.132 adet ile 1 mg/l ve 4 mg/l *m*T ilaveli MS ortamlarında saptanmıştır. Aksiller sürgün rejenerasyonu amacıyla yürütülen çalışmada ise en yüksek eksplant başına sürgün sayısı 4 mg/l *m*T içeren MS besin ortamında 9.975 adet olarak tespit edilmiştir. Çalışmada gelişen sürgünler, 2.0 mg/l IBA ilaveli ½ × MS besin ortamında %50 oranında köklendirilmiştir.

2.2. Disk Difüzyon Yöntemi

Antimikrobiyal madde içeren kağıt diskler, test mikroorganizması ile hazırlanan standart karışımın yayıldığı agar plaklar üzerine yerleştirilir. Diskteki antimikrobiyal madde besiyerine yayılarak mikroorganizmaya etkili olduğu düzeylerde üremeyi inhibe eder. Böylece, disk çevresinde mikroorganizmaların üreyemediği dairesel bir zon meydana gelir. Zon çapı, bakterinin duyarlılığı ile direkt ilişkilidir. Çap ölçülür ve her antimikrobiyal madde için değişeken olan duyarlılık sınırı değerleriyle karşılaştırılır. Zonun büyüklüğüne göre sonuçlar "dirençli" "orta" ya da "duyarlı" şeklinde değerlendirilir (Şen, 2011).

2.3. Gram (+) ve Gram (-) Bakteriler

2.3.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus yuvarlak şekilde olup yaklaşık 1 µm çapında, gram (+) ve hareketsizdirler. Spor oluşturmazlar. Fakültatif anaerob bakteriler olmalarına rağmen aerob şartlarda daha bol ürerler (Özdil, 2018). Optimal pH'ları 7-7.5, optimal üreme ısıları ise 30-37°C' dir. Birçok bakteri 60 ºC'de ve 30 dk'da aktivite kaybına uğrarken, bu bakteriler ısıya dayanan nükleazlar meydan getirdikleri için dirençlidirler. Kültürleri 4 ºC'de ya da oda ısısında tutulduklarında canlılıklarını aylar boyunca korurlar. Bu nedenle; tozda, toprakta, eşya üzerinde, hayvan ve insanın ağız, ve nazofarinks floraları ile derisinde yaygındırlar. İnsanlarda *Staphylococcus* kökenli deri enfeksiyonlarına sık rastlanır (Erecevit, 2007).

2.3.2. *Escherichia coli*

E.coli, 1-1.5 µm en ve 2-6 µm boyda basil şeklinde düz bakteriler olup, 1 ile 2 mm çapında S tipi koloniler yapan ve spor oluşturmayan gram (-) bakterilerdir (Şen, 2011). Fakültatif anaerobdurlar ve optimal pH değerleri 7-7.2'dir. 55 °C'lik ısıya 1 saat, 60 °C'ye ise sadece 20 dakika dayanıklıdırlar (Erecevit, 2007). 37 °C optimal üreme ısılarıdır. Füksin vb. bazı boya maddelerine, dezenfektanlara, % 7 NaCl ile safra ve

safra tuzlarına karşı duyarlı, soğuğa ve ısıya dirençlidir. Memeli ve kuşlarda normal bağırsak bakterisi olarak bulunmaktadır. Bağırsak içinde kokuşma, mayalaşma ve beslenme ile ilgili fonksiyonlarda yardımcı olan ve diğer bağırsak bakterileri ile dengeli bulunan flora bakterisidir. Ancak canlının bağışıklık sisteminin azaldığı durumlarda doku ve kana yayılarak enfeksiyon etkeni özelliği taşır. Bunlar; safra ve safra yolları enfeksiyonları, üriner sistem, peritonit, menenjit, hemolitik üremik sendrom, apse, trombotik trombositopenik purpura,sinüzit, otit ve yara enfeksiyonlarıdır (Şen, 2011).

2.3.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Bu bakreriler, aerop, gram (-), hareketli, sularda, bitkilerde, toprakta, hayvanlarda ve hastanelerde bulunabilen yüksek mortalite ve morbiditeye sahip basil şeklinde bakterilerdir. Deri ve yumuşak dokuda gözde, kulakta, solunum yolunda, üriner ve gastrointestinal sistemlerde enfeksiyonlara yol açabilen patojenlerdir (D'Agata, 2014). Hastane kökenli pnömoniye en çok yol açan gram (-) bakterilerdendir. Sağlıklı bireylerde nadir olarak pnömoniye sebep olurlar, ancak hızlı ve mortal seyretmektedirler. Pnömoni tedavisinde kulanılan antibiyotiklere karşı hızla direnç kazandıklarından tedavileri güçleşmektedir (Can, 2016).

2.4. *Centaurea* Türlerinde Yapılmış Bazı Antibakteriyel Aktivite Belirleme Çalışmaları

Negrete ve ark. (1984), *C. chilensis*'in toprak üstü aksamlarından ekstrakte ettikleri 2 seskiterpen lakton bileşiğinin antimikrobiyal etkilerini agar difüzyon yöntemi ile incelemişlerdir. Çalışma sonucunda bu bileşiklerin *Staphylococcus epidermidis Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Micrococcus luteus*, *Candida* albicans ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram (+) bakterilere karşı etkili oldukları gözlenmiştir.

Negrete ve ark. (1987), *C. floccosa*'nın toprak üstü aksamlarından izole ettikleri eriyodiktiyol, hispidulin, kersetin, kemferol, krizoeriol ve taksifolin gibi flavonoitlerin antimikrobiyal aktivitelerini agar difuzyon yöntemi ile *A. niger*, *E. coli*, *C. albicans*, *B. subtilis*, *M. flavus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı

incelemişlerdir. Çalışma sonucunda taksifolin haricindeki diğer maddelerin gram (+) bakterilere karşı etkili olduğu gözlenmiştir.

Lonergan ve ark. (1992), *C. sonchifolia*'nın toprak üstü aksamlarından izole ettikleri onopordopikrin maddesinin antibakteriyel etkisini disk difüzyon yöntemiyle incelenmişler ve *S. aureus*'a karşı etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Barrero ve ark. (1995), Güney İspanya'da yetişen *C. aspera* subsp. *aspera*, *C. aspera* subsp. *scorpiurifolia*, *C. aspera* subsp. *stenophylla*, *C. malacitana*, *C. melitensis*, türlerinden izole ettikleri elemanolit, onopordopikrin, snisin, monoasetil snisin, salonitenolit, stenofillolit ve tulipalin B yapısındaki üç seskiterpen laktonun antimikrobiyal aktivitelerini dokuz ayrı mikroogranizmaya karşı test etmişlerdir. Çalışma sonucunda snisin haricindeki diğer bileşiklerin belirgin bir antibakteriyel özellik göstermediğini belirtmişlerdir.

Sür-Altıner ve ark. (1997), *C. hermanii*'nin toprak altı ve toprak üstü aksamlarından hazırlanan ekstrelerin antifungal ve antibakteriyel aktivitelerini disk difüzyon yöntemiyle incelemişler ve *C. glabrata* ile *C. albicans* üzerinde dikkate değer etkiler saptamışlardır.

Gürkan ve ark. (2000), *C. hermanii* bitkisinin kloroform, petrol eteri ve etanollü ekstrelerinin antibakteriyel etkisini *C. diphteriae'ye, L. monocytogenes, S. aureus 25923, S. aureus 29213, Staphylococcus epidermis, S. pyogenes,* antifungal etkilerini ise *Candida albicans, C. tropicalis, C. pseudotropicalis, C. glabrata, C. krusei,C. guillermondii* karşı incelenmişlerdir. Çalışma sonucunda *C. hermanii'nin* petrol eteri ekstresinin *S. aureus* 25923'e karşı, kloroformlu ekstresinin *S. aureus* 29213 ve 25923'e karşı aktivite gösterdiği, kloroformlu ekstresinin *C.glabrata* ve *C. albicans*'da oldukça yüksek bir aktiviteye sahip olduğu ve petrol eteri ekstresinin *C. glabrata'ya* karşı hafif bir inhibisyon gösterdiği gözlenmiştir.

Arif (2002), *C. solstitialis* ve *C. depressa* türlerine ait ekstre ve fraksiyonların antibakteriyel etkilerini gram (+) (*B. subtilis*) ve gram (-) (*E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*) bakteriler üzerinde mikrodilüsyon metodu ile tespit etmiştir. Çalışma sonucunda her iki türe ait ana ekstre ve fraksiyonların *E. coli*'ye karşı kontrole yakın bir etki gösterdiği, türlerin kloroformlu fraksiyonları ile toprak altı kısımlarının etanollü ekstrelerinin ise *P. aeruginosa*'ya karşı dikkate değer etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Rusak ve ark. (2002), *C. rupestris*'in çiçek ve yapraklarından elde ettikleri eterik ve etanol ekstrelerinin antibakteriyel özelliklerini araştırmışlardır. Yaprakların % 90'lık etanol ekstresi *S. faecalis*'e karşı etkin antibakteriyel aktivite gösterirken; çiçeklerin % 45'lik etanol ekstresi *B. anthracis*'e karşı zayıf kalmıştır.

Uysal ve ark. (2005), *C. balsamita, C. behen, C. solonitana, C. glastifolia, C. pseudoscabiosa* subsp. *glechnii* ve *C. spicata* türlerinden izole edilen ekstrelerin *B. cereus* ATCC 11778, *E. aerogenes* ATCC 13043, *E. coli* ATCC 25922, *E. feacalis* ATCC 29212, *K. penumonia* ATCC 13883, P. *aeruginosa* ATCC 27853, *P. mirabilis* ATCC 7002, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. pneumoniae* ATCC 49616'ya karşı antimikrobiyal etkilerini broth dilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerini kullanarak araştırmışlardır. Çalışma sonucunda özellikle *C. balsamita* ve *C. pseudoscabiosa* subsp. *glechnii*'nın etil asetat ekstreleri ile *C. glastifolia*'nın etanol ekstresi antibakteriyel aktivite sağlamıştır.

Yıldırım (2008), *C. coronopifolia* Lam. ve *C. balsamita* Lam. türlerinin aseton kloroform, etanol ve etil asetat ekstrelerinin *S. salivarius* RSHE 606, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus ATCC* 25923, *E. coli* ATCC 29988, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. cereus* ATCC 14579 bakterilerinin suşlarına karşı antimikrobiyal etkilerini mikrodilüsyon yöntemi kullanarak araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, en yüksek antimikrobiyal etkiyi *C. balsamita*'nın kloroform ekstresi, *B. cereus*'a karşı sağlamıştır. Bitki ekstreleri *S. aureus* suşlarına karşı yüksek antimikrobiyal etki sağlarken, her iki türün de etanol ekstreleri daha düşük aktivite göstermiştir.

Ozsoy ve ark. (2015), *C. antiochia* var. *praealta*'nın toprak üstü aksamlarından sırasıyla petrol eteri, kloroform ve metanol ekstraksiyonu yapmışlar ve izole edilen son ekstrenin antimikrobiyal aktivitesini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda ekstre, *S. epidermis, S. aureus* gibi gram (+) ve *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa, P. mirabilis* gram (-) suşlara orta derecede antibakteriyel ve *C. albicans*'a karşı etkili bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Özdil (2018), *C. fenzlii* Reichardt'ın antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesini incele miştir. Çiçeklenme döneminde toplanan bitkinin toprak üstü aksamlarından farklı polaritelerdeki çözücüler ile ekstreler hazırlamış ve antibakteriyal etkilerini belirlemek amacıyla, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis ATCC* 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *K.*

pneumonia ATCC 700603 kullanmıştır. Çalışma sonucunda metanol ve diklorometan ekstrelerin gram (+) bakterilere karşı, gram (-) suşlara göre daha etkili oldukları gözlenmiştir.

Khleifat ve ark. (2019) *C. damascena* bitkisinin uçucu yağ bileşimini ve antibakteriyel aktivitelerini araştırmıştır. Toplam uçucu yağ bileşenlerinin % 86'sından fazlasını temsil eden oksijenli terpenlerin varlığı ile toplam 35 bileşen karakterize edilmiştir. Antibakteriyel aktivite, mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak disk difüzyon yöntemleri ve minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC) kullanılarak değerlendirilmiştir. *C. damascena*'dan elde edilen uçucu yağlar, 5 µg/ml'de test edilen on mikroorganizmadan sekizine karşı antibakteriyel aktiviteye sahip bulunmuştur.

Qaralleh ve ark. (2019), *Tritirachium oryzae* W5H mantar suşu kültür süpernatantını kullanarak gümüş nanopartikülleri (AgNP'ler) sentezlemek ve AgNP'lerin antibakteriyel aktivitesini tek tek ve *C. damascena* bitkisinin bazı antibiyotikler ve uçucu yağı ile incelemiştir. Gümüş nitrat solüsyonlu süzüntünün rengi 72 saat inkübasyondan sonra yoğun kahverengiye dönüşmüştür. AgNP'lerin inhibisyon bölgesi 12 nm ila 22 mm arasında değişen geniş spektrumlu aktivite göstermiştir. AgNP'ler ile vankomisin, nitrofurantoin, kloramfenikol veya tetrasiklin arasında *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı inhibisyon kat alanında 2.4 kat ila 9 kat artışla dikkate değer bir sinerji görülmüştür. Benzer şekilde, *E. coli P. aeruginosa S. epidermidis* ve *S. aureus*'a karşı gentamisin, tetrasiklin, ampisilin, sefotaksim ve trimetoprim içeren AgNP'ler 1 kattan 10 kata kadar sinerjiye sahip olmuştur.

Shakeri ve ark. (2019), *C. rhizantha*'nın gövde kısımlarından iki yeni seskiterpen lakton, rizantolid A (1) ve rizantolid B (2), bilinen beş bileşik (3-7) ile birlikte izole edilmiştir. 1-7 bileşiklerinin antimikrobiyal aktivitesi, gram (+) ve gram (-) negatif bakteri hatlara karşı değerlendirilmiştir. *S. aureus*'a karşı orta düzeyde antibakteriyel aktivite gözlenmiştir.

Bouzghaia ve ark. (2020), *C. resupinata* subsp. *dufourii*'nin gövde kısımlarının kimyasal bileşimi ile antioksidan ve antibakteriyel aktivitelerini belirlemişlerdir. Farklı kromatografik yöntemler kullanılarak dokuz bileşik izole edilmiştir. İzole edilmiş bileşiklerin yapısal tanımlaması, çeşitli spektroskopik yöntemler, NMR teknikleri (1H NMR, 13C NMR, COZY, HSQC, HMBC) ve kütle spektroskopisi (ESI-MS) kullanılarak ve literatür verileriyle karşılaştırılarak ortaya konmuştur. Bu bileşiklerin

yapıları (i) niktiflorin (ii), apigetrin (iii), chrysoeriol (iv), apigenin (v), chrysin (vi), daucosterol (vii), β-sitosterol (viii), taraxastrerol ve (ix) lupeol olarak tespit edilmiştir. Etil asetat ve n-butanol ekstraktlarının antibakteriyel ve antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir.

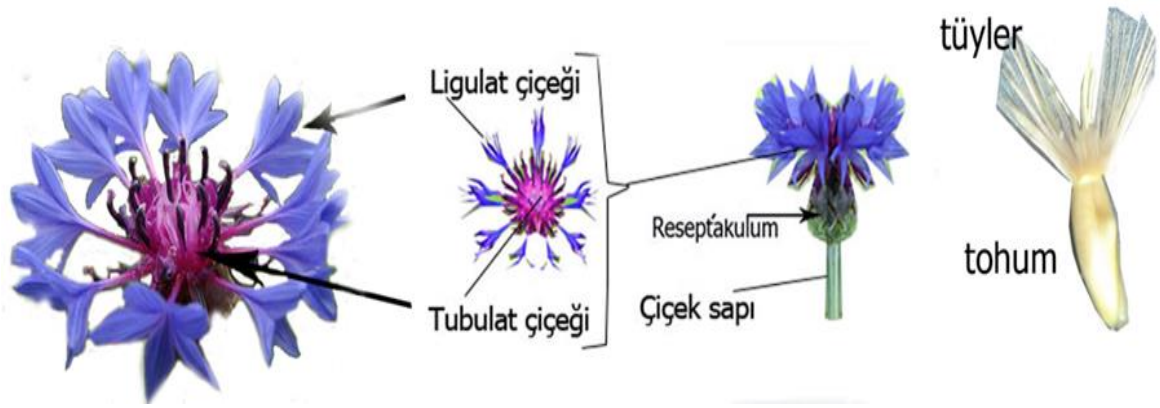
Tozyilmaz ve ark. (2020) tarafından endemik *C. aphrodisea* Boiss, *C.polyclada* DC'nin etanol ekstraktları elde edilmiş ve on sekiz bakteri ve iki mantara karşı antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. *C. afrodisea* ekstraktı, tüm konsantrasyonlarda en yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olmuştur. Ayrıca, bitki etanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri minimum inhibitör konsantrasyon ve minimum bakterisidal/bakteriyostatik konsantrasyon yöntemleri ile analiz edilmiştir. Her ikisi *Centaurea* türü de düşük konsantrasyonlarında yüksek antibakteriyal etki göstermiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışma, 2021 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Doku Kültürü Laboratuvarı ile Ardahan Üniversitesi, laboratuvar imkanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1. Bitki Materyali

C. depressa Bieb. ligulat ve tubulat çiçekleriyle tüylü tohumlar içermektedir (Şekil 3.1). Tohumlar 3.5-3.9 × 1.5-1.9 mm, oval-dikdörtgen, perikarp kahverengisi veya krem kahverengi, serisli, tabanda yuvarlak, areolar lateral-bazal ve yoğun tüylü olmaktadır. Çalışmada kullanılan bitki tohumları Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü)'dan temin edilmiştir.



Şekil 3.1. *C. depressa* Bieb. çiçeği ve tohumu.

3.2. Tohum Canlılık Testi

Çalışmaya başlamadan önce 100 adet sağlıklı *C. depressa* tohumu seçilerek üzerinden tohum tüyleri keskin bir bisturi yardımıyla kesilerek uzaklaştırılmıştır. Tohumlar yumuşatma amacıyla, 12 saat süre ile 24 °C'de bırakılmıştır. Daha sonra yumuşamış tohumlar dikkatli bir şekilde pens ile tutulup, bistüri yardımıyla ayıklanmıştır. Ayıklanmış tohumların kotiledonları bisturi ile hafifce iterek ortadan ayrılmış ve 1 mg/ml'lik 2, 3, 5 trifenil tetrazolium klorür (TTC) çözeltisine

daldırılmıştır. Tohumlar gece boyunca 24 ± 1 °C'de karanlıkta inkübe edilmiştir. Canlı ve cansız tohumları ayırt etmek için tüm tohumlar mikroskopun 40 × büyütmesi altında dikkatle gözlenmiştir. Kırmızı rengi alan tohumlar canlı, kırmızı rengi almayan tohumlar ise cansız kabul edilmiştir (Porter ve ark., 1947; ISTA, 2019).

3.3. Besin Ortamı

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, Merck ve Duchefa firmalarından temin edilmiştir. Doku kültürü çalışmalarında %3 sukroz ve %0.8'lik agar (type A, Merck) ilave edilmiş MS besin ortamı (Murashige ve Skoog 1962) kullanılmıştır. Kullanılan ortamın içeriği Çizelge 3.1'de sunulmuştur. Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmıştır. Besin ortamına gerekli konstrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (Çizelge 3.2) uygun çözücülerde çözüldükten sonra standart şekilde istenilen miktarda ve oranda stok solusyonları hazırlanarak ilave edildikten sonra ortamının pH'sı 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5.7±0.1'e ayarlanmış daha sonra 4.5 k Pa basınç altında 121 ˚C'de 20 dakika sterilizasyon uygulanmıştır.

Çizelge 3.1. MS ortam bileşenleri ve litredeki konsantrasyonları*

Makro Element	**Miktar**	**Mikro Element**	**Miktar**	**Vitaminler**	**Miktar**
	(mg/l)		**(mg/l)**		**(mg/l)**
NH_4NO_3	1650	KI	0.83	Myo-inositol	100.00
KNO_3	1900	H_3BO_3	6.20	Nikotinik asit	0.50
$CaCl_2.2HO_2$	332.02	$ZnSO_4.7HO_2$	8.60	Pridoksin-HCl	0.50
$MgSO_4.7H_2O$	180.54	$Na_2MoO_4.2HO_2$	0.25	Thiamin-HCl	0.10
KH_2PO_4	170	$CuSO_4.5H_2O$	0.025	Glisin	2.00
		$CoCl_2.6H_2O$	0.025		
		FeNaEDTA	36.70		
		$MnSO_4.H_2O$	16.90		

*: https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/M0222.

Çizelge 3.2. Kullanılan BDM, çözücüleri ve saklama koşulları*

BDM	Çözücü	Saklama Koşulları (◦C)
BAP	1 N NaOH	4
NAA	1 N NaOH	4
IBA	1 N NaOH	4
2,4-D	Su	4

*: https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/growth-regulators.html

C. depressa tohumları % 50, % 60, % 70'lik ticari çamaşır suyu (NaOCl) ile 10, 15 ve 20'şer dk muamele edilerek yüzey sterilizasyonu sağlanmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril saf su ile 3×5 dk durulanmıştır. Steril edilen tohumlar yine steril petri kapları içerisinde 30 g/l sukroz içeren ve %0.8'lik agar ile katılaştırılan MS besin ortamında 24 ^{o}C'de 16/8 saat ışık/karanlık fotoperiyodunda çimlendirilmiştir. Çimlenme yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu değer *in vitro* da çimlenen tohumların toplam tohum sayısına oranlanmasıyla bulunmuştur. Çimlenme oranları kültür başlangıcından 4 gün sonra, çimlenme hızı ve gücü ise çimlenme başlangıcından sırasıyla 4 ve 8 gün sonra kaydedilmiştir. Fide gelişimi de yüzde olarak belirtilmiştir. Bu değer fide oluşturan tohumların toplam çimlenmiş tohum sayısına oranlanmasıyla elde edilmiştir.

3.4. Eksplant Seçimi ve Rejenerasyon

Steril edilen tohumların çimlenmesi ve gelişimi sonucunda 10 günlük fidelerden hipokotil, gövde, yaprak, kotiledon boğum ve sap boğum eksplantları alınmış ve 0.20 mg/l BAP ile 0.10, 0.15, 0.30, 0,45 ve 0.60 mg/l NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır.

3.4.1. Sürgünlerin köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünler 1-2 cm uzunluğa eriştiğinde kesilerek steril kültür kaplarında 0.20, 0.40 ve 0.60 mg/l IBA içeren MS içeren köklendirme ortamına yerleştirilmiştir.

3.4.2. Elde edilen bitkilerin dış koşullara alıştırılması

Köklenen sürgünler iklim odasında (24 ± 2 °C, 3000 lüks ışık 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyodu ve %70 nem içeren ortamda) dış koşullara alıştırılma amacıyla otoklavlanmış torf içeren saksılara aktarılmıştır. Yaklaşık 10 gün sonra nem seviyesi % 40'a düşürülmüştür. Gelişen bitkiler normal tarla toprağının bulunduğu saksılara aktarılarak serada büyütülmüştür.

3.5. Somatik Embriyo Oluşumu

Steril edilen tohumların çimlenmesi ve gelişimi sonucunda 10 günlük fidelerden yaprak, kotiledon boğum ve koltuk altı meristem eksplantları 0.00, 0.6, 1.20, 1.80 ve 2.40 mg/l 2,4-D içeren MS ortamına alınmıştır.

3.6. *C. depressa* Bitkisinin Yapraklarından Uçucu Yağın Elde Edilmesi

Doku kültürü ile elde edilmiş *C. depressa* bitkileri çiçeklenme dönemde gölgede 24±2 °C'de kurutulmuş ve ardından gövde, yaprak, çiçek ve meyveleri bir Waring karıştırıcısı yardımıyla öğütülmüştür. Öğütülmüş numuneler (20 g), Soxhlet ekipmanı kullanılarak 24 saat 150 ml etil asetat, aseton, kloroform, alkol çözücü (Merck, Darmstadt, Almanya) ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraklar Whatman filtre kağıdı (No. 1) kullanılarak süzülmüş ve daha sonra vakum altında 70 °C'de konsantre edilmiştir. Kalıntılar, sonraki kullanıma kadar buzdolabında saklanmıştır. Biyolojik tahlil için, ekstreler aynı çözücü (methanol) içinde 100 mg/ml konsantrasyonda süspanse edilmiştir.

3.7. Antibakteriyel Aktivenin Belirlenmesi

Tohumdan çimlendirilmiş ~20 günlük bitkilerden kökler uzaklaştırılarak kalan kısımları toz haline getirilmiş ve metanol ile ekstrakte edilmiştir. Antibakteriyel aktivitenin belirlenebilmesi amacıyla ekstraktlar 1 adet gram (+) bakteri (*Staphylococcus aureus* ATTCC25923) ve 2 adet gram (-) bakteriye (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC25823 ve *Escheria coli* ATCC8739) karşı test edilmiştir. Bu amaçla disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Perez ve ark., 1990; Rojas ve ark., 2003; Sahin ve ark., 2003) ve minimum inhibitör konsantrasyonları NCCLS (2009)'e göre sıvı besi yeri makrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. 6.5 g/l agar içeren Mueller-Hinton (MH) ortamından 20 ml 100×10 mm'lik steril petri kaplarına dökülmüştür. Her petride steril bir mantar delici kullanılarak 6 mm'lik oyuklar açılmıştır. Test edilen her bir bakteri türünün hassasiyetini belirlemek ve kullanılan yöntemin kontrolü için Duocid antibiyotiği kontrol olarak kullanılmıştır. Testler, üç tekerrür halinde gerçekleştirilmiştir. Test gram pozitf ve negatif bakterilerine karşı inhibisyon bölgesi ölçülerek değerlendirilmiştir. Bakteriyel büyümenin inhibisyonu, inhibisyon bölgesinin ortalama çapı olarak ölçülen ve ifade edilen disklerin etrafındaki açık bir bölge ile gösterilmiştir.

3.8. İstatistik Analiz

Çalışma tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş ve her muamele, içerisinde en az 5 adet eksplantın bulunduğu 4 tekerrürlü 100 × 10 mm'lik petri kutularından oluşmuştur. Elde edilen veriler SPSS paket programı yardımıyla varyans analizine tabi tutulmuştur. Farklı muamele ortamlarını belirlemek üzere Duncan testi kullanılmıştır. İstatistik analizinden önce yüzde değerlere, arcsin transformasyonu yapılmıştır (Snedecor ve Cochran, 1967).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Tohum Canlılık Testi

C. depressa'ya ait 100 adet tohumun embriyo ve kotildonları Leica marka mikroskopun 40 × büyütmesi altında dikkatle gözlenmiş ve 99 adet tohumun kırmızı renk aldığı gözlenirken yalnız bir adet tohumun kotiledonlarda beyazlık ve embriyoda hafif kırmızılık izlenmiştir. Elde edilen sonuçlar hem Porter ve ark. (1947) hem de ISTA (2019)'nın bulgularını doğrulamaktadır.

4.2. Yüzey Sterilizasyonu

C. depressa tohumlarının yüzey sterilizasyonunu sağlamak amacıyla farklı süre ve konsantrasyonda uygulanan ticari çamaşır suyunun etkileri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelge 4.1'den de anlaşılacağı üzere tüm çamaşır suyu konsantrasyon ve uygulama süreleri tohumlarda % 100 sterilizasyon sağlamıştır.

Çizelge 4.1. Tohumların yüzey sterilizasyonunda kullanılan ticari çamaşır suyu konsantrasyonları ve uygulama süresinin etkileri

Çamaşır suyu (%)	Uygulama süresi (dk)	Bulaşık tohum oranı (%)	Çimlenmiş tohum oranı (%)
50	10	0.00	100.00
60	10	0.00	100.00
70	10	0.00	100.00
50	15	0.00	100.00
60	15	0.00	100.00
70	15	0.00	100.00
50	20	0.00	100.00
60	20	0.00	100.00
70	20	0.00	100.00

Uygulanan ticari çamaşır suyu konsantrasyonları ve uygulama süreleri birbirine benzerlik göstermiştir. Bu nedenle en düşük, ancak en etkili çamaşır suyu dozu olarak % 50 çamaşır suyu ile 10 dk uygulama süresi önerilmiştir. Yüzey sterilizasyon

çalışmalarında NaOCl, H_2O_2, HgCl, AgNO3, biyositler (PPM), antibiyotikler ve ticari çamaşır suları yaygın olarak kullanılmakta ve tercih edilmektedir (Pourali Kahriz 2016).

4.3. Besin Ortamı

Tohumlardan elde edilen *in vitro* fideciklerin hipokotil, gövde, yaprak, kotiledon boğum ve sap boğum eksplantları eksplant olarak kullanılmıştır. Tohumların *in vitro* çimlendirmesi sonucu elde edilen *in vitro* bitkicikler, hem bitkilerin genetik çeşitliliğini korumak hem de doğada yetişen bitkisel organlara göre dezenfekte edilmeleri daha kolay olduğu için tercih edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarında, faklı *Centaurea* tür ve taksonlarının *in vitro* koşullarda tohum çimlendirilmesinde zorluklar izlenmiştir (Cuenca ve ark., 1999, Cuenca ve Amo-Marco 2000, Özel ve ark., 2006, Kurt ve Erdağ, 2009, Mallón ve ark., 2010, Alaiwi ve ark., 2012). Ancak, çalışmada *C. depressa* tohumlarının ekildiği 30 g/l sükroz ve 8 mg/l agar ilaveli MS ortamında tohum çimlendirilmesinde herhangi bir zorluk yaşanmamıştır.

4.4. Rejenerasyon Çalışmaları

C. depressa'nın *in vitro* koşullarda adventif sürgün rejenerasyon çalışmalarında 10 günlük bitkikciklerden kotiledon boğum, hipokotil, gövde, yaprak eksplantları izole edilerek 0.20 mg/l BAP 0.10, 0.15, 0.30, 0,45 ve 0.60 mg/l NAA ilaveli MS ortamında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 7 gün sonra sonra tüm eksplantlarda şişme izlenmiştir. Yalnız kotiledon boğum eksplantlarda herhangi bir kallus oluşumu izlenmemiştir. Eksplantlar üzerinde % 100 sürgün oluşumu gözlenmiştir. Altı hafta sonra % sürgün oluşumu, sürgün uzunluğu ve eksplant başına sürgün sayısı ile ilgili bulgular Çizelge 4.2'de sunulmuştur. Çizelge 4.2'den de görüldüğü gibi eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından ortamlar arasında fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 4.2. *C. depressa* bitkisinin kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları

VK	SD	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
Eksplant başına sürgün sayısı	4	3.25	3.27**	1.19	1331**
Sürgün uzunluğu	10	0.99		0.009	
Toplam	14				

VK: Varyasyon Kaynağı; SD: Serbestlik Derecesi; KO: Kareler Ortalaması; F: F değeri

**$p<0.01$

Duncan testi sonuçları ise Çizelge 4.3'te sunulmuştur. Çizelge 4.3'te de görüldüğü üzere kotiledon boğum eksplantından kallus oluşumu izlenmemiş, % 100 sürgün oluşumu gözlenmiştir.

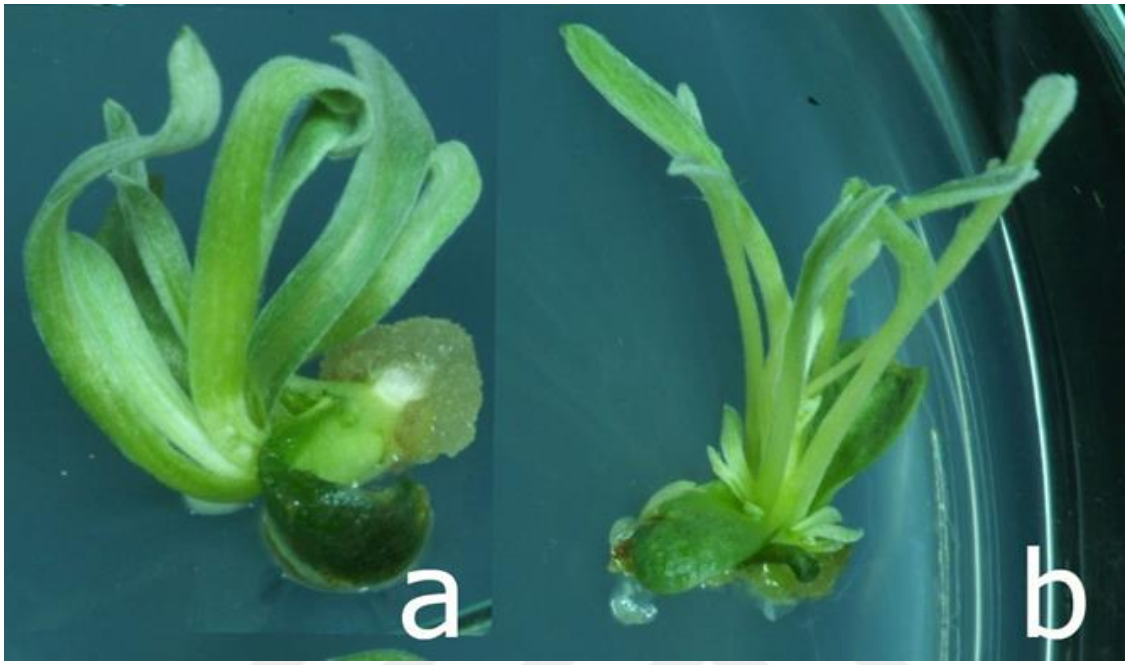
Çizelge 4.3. *C. depressa* bitkisinin kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonu

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Sürgün oluşum yüzdesi (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Sürgün uzunluğu (cm)
0.20	0.10	100.00	3.34ab**	2.27a**
0.20	0.15	100.00	4.93a	1.50b
0.20	0.30	100.00	2.76b	2.50a
0.20	0.45	100.00	2.56b	1.57b
0.20	0.60	100.00	2.35b	0.94c

**Aynı sütunda faklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasında fark istatistik olarak önemlidir $p<0.01$

Eksplant başına sürgün sayısı 2.35-4.93 adet arasında değişmiştir. En uzun sürgün 0.20 mg/l BAP+0.15 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir (Şekil 4.1a). MS ortamda 0.20 mg/l BAP ile birlikte kullanılan NAA konsantrasyonu arttıkça

sürgün sayısında bir düşüş meydana geldiği dikkati çekmiştir. En az sügün sayısı 0.20 mg/l BAP + 0.45 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir (Şekil 4.1b).



Şekil 4.1. *C. depressa* bitkisinde sürgün rejenerasyonu.

Sürgün uzunluğu 0.94-2.50 cm aralığında değişim göstermiştir. En kısa ve en uzun sürgünler sırasıyla 0.20 mg/l BAP + 0.30, 0.20 mg/l+0.60 mg/l NAA ilaveli ortamlardan sağlanmıştır. Çalışmada sürgün uzuluğu bakımından BAP'ın sabit ve NAA'nın artan konsantrasyonlarının etkilerinde bir tutarsızlık gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da araştırıcılar *Centaurea* bitkisininin mikro çoğaltımı için BAP ve ya BAP ile birlikte farklı oksin kaynakları kullanmışlardır (Emek ve Erdag, 2013, Kurt ve Erdag 2009, González-Benito ve Martín, 2010). Emek ve Erdag (2013), *Centaurea* türlerinin *in vitro* çoğaltımında, BAP ve Kin etkileri arasında bir karşılaştırma yapmışlardır. Araştırıcılar, BAP'ın *in vitro* sürgün rejenerasyonunda Kin'e göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, González-Benito ve Martín (2010), İspanya Kırmızı Kitabı'na dahil olan *Asteraceae* familyasına ait tüm türlerin *in vitro* mikroçoğaltımı için 0.5-1.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamının kullanılmasını uygun bulmuşlardır. Pevalek-Kozlina (1998), tehdit altında endemik bir bitki olan *Centaurea ragusina*'nın tohumlarından *in vitro* fideler elde etmişler ve bunları aksiller sürgün çoğaltımı için baslangıç materyali olarak kullanmışlardır. Çalışma sonucunda BAP'ın

tek başına ya da NAA ile beraber kullanımının sürgün rejenerasyonu için uygun olduğunu bildirmişlerdir.

4.4.1. *In vitro* köklendirme ve akilimatizasyon

0.15 mg/l NAA ve 0.20 mg/l BAP ilaveli ortamda gelişen sürgünler 1.75-2.25 cm uzunluğa ulaştığında steril ortamda kesilerek steril kültür kaplarında 0.20, 0.40 ve 0.60 mg/l IBA eklenmiş MS ortamında köklendirme amacıyla şaşırtılmıştır. 6 hafta sonunda ulaşılan bulgulara göre % kök oluşumu, kök uzunluğu (cm) ve eksplant başına kök sayısı (adet) bakımından farklı oranda IBA içeren MS ortamlarının köklendirme üzerinde etkileri istatistik olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. *C. depressa* bitkisinin köklendirilmesi ile ilgili varyans analizi sonuçları

VK	**SD**	**Kök oluşum yüzdesi (%)**		**Eksplant başına kök sayısı (adet)**		**Kök uzunluğu (cm)**	
		KO	**F**	**KO**	**F**	**KO**	**F**
IBA konsantrasyonları	2	486.11	1.40**	8.44	10.86**	0.84	60.76**
Hata	6	347.22		0.78		0.01	
Toplam	8						

**$p<0.01$

Kök oluşum yüzdesi % 16.67-41.67, eksplant başına kök sayısı 1-5 adet (Şekil 4.2a) ve kök uzunluğu 0.87-1.92 cm arasında değişim göstermiştir (Çizelge 4.5). En fazla kök oluşumu 0.60 mg/l BAP içeren ortamda elde eldilirken, en yüksek köklenme 0.3 mg/l IBA, en uzun kökler ise 0.20 mg/l BAP içeren ortamlarda gözlenmiştir. Gelişen adventif köklerin ince ve narin oldukları dikkati çekmiştir (Şekil 4.2b). Cuenca ve ark. (1999) farklı *Centaurea* türlerinin *in vitro* koşullarlarda köklendirilmesinin zor olduğunu bildirmişlerdir. Literatür verilerine göre *Centaurea* türlerinin çoğu, kökleri geliştirmek için kültür ortamına oksinlerin eklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Traykova ve ark., 2015). Elde edilen sonuçlar literatürle benzerlik göstermektedir.

Çizelge 4.5. *C. depressa* bitkisinin *in vitro* koşullarda farklı oranda IBA içeren ortamda köklendirilmesi

IBA (mg/l)	Kök oluşum yüzdesi (%)	Eksplant başına kök sayısı (adet)	Kök uzunluğu (cm)
0.20	16.67c	1.00c**	1.92a**
0.40	25.00b	5.00a	1.52b
0.60	41.67a	3.00b	0.87c

**Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasında farklılık önemlidir, $p<0.01$



Şekil 4.2. *C. depressa* bitkilerinin köklendirilmesi (a) ve saksılara akatarılması (b).

Çalışmada, bitkileri köklendirmek için ideal ortamın 0.40 mg/l IBA olduğu belirlenmiştir. *C. junaniana* bitkisinin hipokotil, kök, kotiledon ve yapraklarının eksplant olarak kullanıldığı ve sürgün rejenerasyonunun araştırıldığı bir çalışmada, en yüksek sürgün sayısının 0.2 mg/l NAA ve 5 mg/l BA, en iyi köklenme yüzdesinin ise 0.01 mg/l IBA ilave edilmiş MS ortamından sağlandığı bildirilmiştir (Hammatt ve Evans, 1985). Takashi ve Daisuke (1997), *Centaurea macrocephala*'yı koltuk altı meristemleri ile mikroçoğaltmışlar ve sürgünleri 25 µM IBA (5 mg/l) ilave edilmiş Hypnex ortamında köklendirmişlerdir. Pevalek-Kozlina (1998), *C. ragusina*'nın

sürgünlerini 2.5 µM IBA (0.5 mg/l) içeren ½ MS ortamında köklendirmiş ve dış ortama alıştırmışlardır. Cuenca ve ark. (1999), *C. paui*'nin mikroçoğaltım amacıyla eksplant olarak infloresens gövdelerini kullandığı çalışmasında en yüksek sürgün oluşumunu 2 mg/l Kin ya da 0.5 mg/l BA ilaveli MS ortamında sağlamışlardır. Traykova ve ark. (2015) *C. pseudaxillaris* sürgünlerinin kökledirilmesinde hem MS hem de ½ MS ortamlarını kullanmış ve % 100 köklenme elde etmişlerdir.

Elde edilen köklü sürgünler daha sonra iklim odasında steril torf içeren polietilen poşetler ile çevrilmiş saksılarda yüksek nemde tutularak yeni bitkiciklerin gerek ortam şartlarına uyum sağlaması, gerekse de kök sisteminin gelişmesi sağlanmıştır. Ancak kökü uzun olan bitkiler yaklaşık 8-9 günde, orta uzun köke sahip bitkiler 12-13 günde ve kısa köklü bitkiler ise yaklaşık 18-19 günde dış koşullara alıştırılabilmişlerdir. Bitkilerin sera koşullarda geliştirilmesi ve adaptasyonunda herhangi bir zorluk izlenmemiştir. Adaptasyon aşamasında sera ortamının nisbi nemi kademeli olarak % 80 den % 40'a indirilmiş ve poletilen poşetler uzaklaştırılmıştır. Benzer şekilde Stanilova ve ark. (2013) *in vitro* koşullarda elde edilen *Alchemilla* bitkilerinin, Traykova ve ark. (2015) ise *C. pseudaxillaris*'in adaptasyonu için hava nemini kademeli olarak düşürerek bitkilerin dış koşullara adaptasyonunu sağlamışlardır.

4.4.2. *C. depressa* bitkisinde somatik embriyo oluşumu

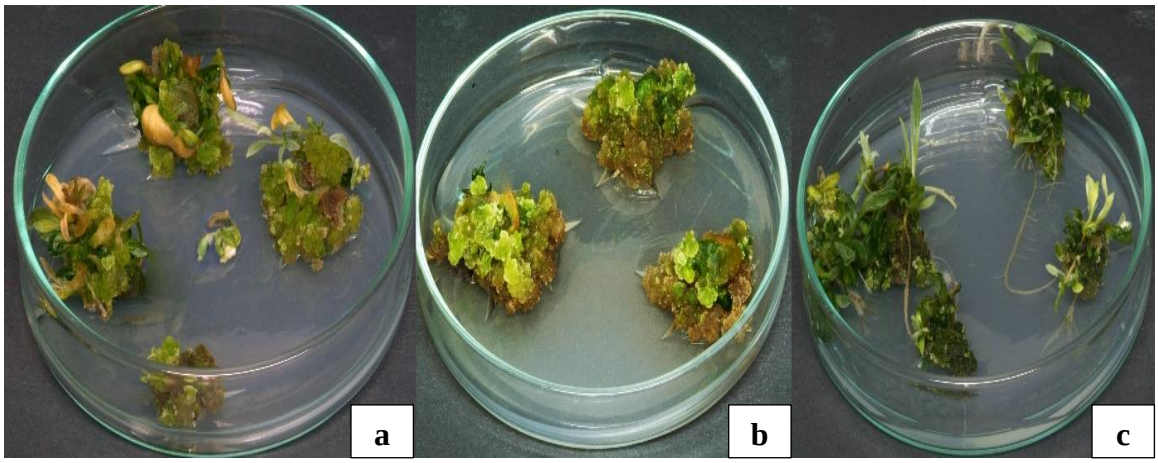
Yaprak, koltuk altı meristemi ve kotiledon boğumu eksplantları izole edilerek 0.60,1.20, 1.80 ve 2.40 mg/l 2,4-D ilave edilmiş MS ortamında kültüre alınmış eksplantlarda kültür başlangıcından bir hafta sonra şişme ve altı hafta sonra kallus ile somatik embriyo oluşumu izlenmiştir. Bulgular Çizelge 4.6'da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. *C. depressa* bitkisinin somatik embriyo oluşumuna ait verilerinin varayans analizi sonuçları

		Bitki oluşum yüzdesi (%)		Eksplant başına bitki sayısı (adet)	
VK	**SD**	**KO**	**F**	**KO**	**F**
Ortam	3	485.19	7.29**	15.70	1573.60**
Eksplant	2	30011.11	450.17**	70.64	7079.79**
Ortam Eksplant	6	485.19	7.28**	3.62	362.27**
Hata	24	66.67		0.01	
Toplam	36				

** $p<0.01$

Bitki oluşum yüzdesi ve eksplant başına elde edilen bitki sayısı bakımından ortam ve eksplantlar arasında farklılık istatistik açıdan önemli bulunmuş ve sonuçlar Çizelge 4.7'de sunulmuştur. Çizelge 4.7'den de görüldüğü üzere yaprak, koltuk altı meristem ve kotiledon boğum eksplantından % 100 kallus oluşumu izlenmemiştir. Yapraklar üzerinde bitki oluşumu % 26.67-80.00 arasında değişmiş göstermiştir (Şekil 4.3a).



Şekil 4.3. Yaprak (a), koltuk altı meristem (b) ve kotiledon boğumu (c) explantlarından gelişen somatik embriyo, kallus ve köksüz-köklü bitkiler.

Yaprak eksplantı kaynaklı somatik embriyolar üzerinde gelişen bitkiciklerde herhangi bir kök oluşumu izlenmemiştir. Genelde birden fazla embriyoda kaynaşma ve

hiperhidrisiti de görülmüştür. Hiperhidrik somatik embriyolar ilk önce sarı renk almış ve daha sonra kararak ölmüşlerdir.

Çizelge 4.7. Yaprak, koltuk altı meristem ve kotiledon boğumu eksplantlarından gelişen kallus, somatik embriyo ve bitki oluşumu

2,4-D	Kallus oluşum yüzdesi (%)		
(mg/l)	Yaprak	Koltuk altı meristemi	Kotiledon boğumu
0.6	100.00[öd]	100.00	100.00
1.20	100.00	100.00	100.00
1.80	100.00	100.00	100.00
2.40	100.00	100.00	100.00
	Bitki oluşum yüzdesi(%)		
	Yaprak	Koltuk altı meristemi	Kotiledon boğumu
0.6	80.00[**]	0.00 [öd]	100.00 [öd]
1.20	46.67	0.00	100.00
1.80	53.33	0.00	100.00
2.40	26.67	0.00	100.00
	Eksplant başına bitki sayısı (adet)		
	Yaprak	Koltuk altı meristemi	Kotiledon boğumu
0.6	4.67 [**]	0.57[**]	7.43[**]
1.20	3.33	0.00	5.66
1.80	1.41	0.00	3.27
2.40	0.52	0.00	3.24

[**]Ortalamalar arasında farklılık önemlidir $p<0.01$ [öd]: önemli değil.

Koltuk altı meristem eksplantları üzerinde herhangi bir bitki oluşumu izlenmemiştir (Şekil 4.3b). Ancak, bazen birden fazla somatik emriyoda kaynaşma gözlenmiştir. Genelde somatik embriyolarda hiperhidrisiti tespit edilmiştir. Yalnız 0.6 mg/l 2,4-D ilave edilmiş ortamda ortalama 0.57 adet bitki oluşumu izlenmiştir.

Kotiledon boğum eksplantından ise % 100 bitki oluşumu kaydedilmiştir (Şekil 4.3c). Nadiren embriyolarda kaynaşma görülmüştür. Genelde somatik embriyolarda hiperhidrisiti izlenmemiş ve somatik embriyo oluşumu farklı aşamalardan geçerek bitkiler otomatik olarak kalluslardan ayrı gelişim göstermiştir. Eksplant başına 0.52-4.67 adet arasında değişim gösteren sağlıklı bitki dönüşümü elde edilmiştir. En fazla bitki dönüşümü 0.6 mg/l 2,4-D ilave edişmiş MS ortamında gözlenirken, en düşük bitki dönüşümü 2.40 mg/l 2,4-D ilave edilmiş ortamdan elde edilmiştir. Bununla birlikte, MS

ortamındaki 2,4-D konsantrasyonundaki her artış, eksplant başına doğrusal daha az somatik embriyo oluşumuna olanak sağlamıştır.

Pikloram ya da 2,4-D gibi sentetik oksinlerden somatik embriyogenezi teşvik amaçlı yararlanılmaktadır (Merkle ve ark., 1990). Elde edilen sonuçlar daha önce farklı bitkilerde yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. *Helianthus annuus*'un eksplant olarak olgunlaşmamış ve olgun zigotik embriyolarının kullandığı bir çalışmada yalnız 1 mg/l 2,4-D içeren ortamda somatik embriyo oluşmu izlenmiştir (Finer, 1987). Bronner ve ark. (1994) ise *Helianthus annuus*'un olgunlaşmamış zigotik embriyolarından BA içeren ortamda somatik embriyogenez teşvik edilebileceğini belirtmişlerdir. *Psidium guajava* L. cv. Banarasi'ye ait 7-14 haftalık olgunlaşmamış zigotik embriyolar için 4.52 µM (1 mg/l) 2,4-D ve 50 g/l sükroz ilave edilmiş MS ortamını somatik embriyogenez için uygun olarak bildirilmiştir (Rai ve ark., 2007).

4.5. Antibakteriyel Aktivetenin Belirlenmesi

C. depressa türüne ait *in vitro* antibakteriyel aktivite, 1 adet gram (+) ve 2 adet gram (-) bakteri suşuna karşı test edilmiş ve 30 mg/ml bitki özütü ile emprenye edilmiş disklerin (6 mm) etrafındaki inhibisyon bölgesi çapı (mm) minimum inhibitör konsantrasyon değerleri µg/ml olarak verilmiştir. Bulgular Çizelge 4.8'de sunulmuştur.

Çizelge 4.8. *C. depressa*'nın antibakteriyel aktivitesi

Uygulama	**İnhibisyon bölgsi (mm)** Ort ± St. Hata	**Minimum inhibasyon konsantrayonu (µg/ml)** Ort ± St. Hata
S. aureus (Gram +)	10 ± 0.3	240 ± 0.6
Duocid (Kontrol)	12.5 ± 0.8	25
E. coli ATCC 8739 (Gram -)	13 ± 0.7	800 ± 2.9
P. aeruginosa ATCC 9027 (Gram -)	9.09 ± 0.7	500 ± 0.1
Duocid (Kontrol)	11 ± 0.7	20

Tüm örnekler, *C. depressa* uçucu yağı ile pozitif ancak değişken inhibisyon göstermiştir. *Staphylococcus aureus* için maksimum inhibisyon bölgesi, Duocid antibiyotiği (kontrol) ile oluşturulan inhibisyon bölgesinden daha küçük olurken *E. coli* ve *P. aeruginosa* için inhibisyon bölgeleri, Duocid antibiyotiği (kontrol) ile oluşturulan

inhibisyon bölgesinden daha büyük ve küçük olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar Boğa ve ark. (2016)'nın elde ettiği sonuçlara benzerlik göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. Türkiye florasında önemli bir süs ve tıbbi bitki olan *Centaurea depressa* bitki tohumlarında tetrazolium klorür testi ile % 99 oranında canlılık tespit edilmiştir.
2. Yüzey sterilizasyon çalışmalarında % 50'lik ticari çamaşır suyu ile 10 dk'lık bekletme süresi yeterli sterlizasyonu sağlanmıştır.
3. Kotiledon boğum, koltuk altı meristem, hipokotil, gövde ve yaprak eksplantları organogenesis amacıyla kültüre alınmış, kotiledon boğumu hariç diğer eksplantlardan sürgün rejenerasyonu gerçekleştirilememiştir. Elde edilen sonuçlarına göre 0.20 mg/l BAP + 0.15 mg/l NAA içeren ortamda en fazla sügün rejenerasyonu elde edilmiştir.
4. Elde edilen sürgünler 0.20, 0.40, ve 0.60 mg/l IBA içeren ortamda köklendirilmiştir.
5. Köklendirilmiş bitkiler steril torf içeren saksılara dikilerek iklim odasında dış koşullara adapte edilmiş ve başarılı bir şekilde çiçeklenme aşamlarına kadar geliştirilmiştir.
6. Somatik embriyo oluşum çalışmalarında yaprak, koltuk altı meristem ve kotiledon boğumu eksplant olarak kullanılmış, BDM içeren MS ortamında % 100 kallus oluşumu izlenmiştir. Yaprak ve kotiledon boğum eksplantından gelişen embriyolarda ise biki oluşumu gözlenmiştir. Koltuk altı meristeminden gelişen somatik embriyolarda ise bitki rejenerasyonu rapor edilmemiştir. En iyi somatik embryogenesis eldesi 0.6 mg/l 2,4-D ilave edilmiş MS ortamından sağlanmıştır.
7. Kotiledon boğum eksplantı hem organogenesis hemde somatik embriyogenesis için uygun bulunmuştur.
8. Anti bakteriyel aktivetelerde 1 adet gram (+) ve 2 adet gram (-) bakteriye karşı olumlu etkiler elde edilmiştir.

5.2. Öneriler

Yapılan bu tez çalışması sonucunda *Centaurea depressa* bitkisinin, farklı eksplant ve BDM konsantrasyonlarının denendiği *in vitro* kültürlerde yüksek oranda somatik embriyogenesis ve adventif sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda diğer eksplantlardan adventif sürgün rejenerasyon ve somatik embriyogenesis üzerinde çalışmalar üzerine yoğun araştırmaların yürütülmesi gerekmektedir. Antimikrobiyel aktivitelerden sorumlu özütlerdeki bileşikleri tanımlamak için diğer bakterilerine karşı antibakteriyel faaliyetlerin belirlenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Alaiwi, W. A., Sairam, R. V., Josekutty, P. C., Potlakayala, S. D., Karelia, D., Goldman, S. L., 2012. In vitro regeneration. flowering and cell culture of Centaurea species. ***African Journal of Biotechnology,*** **11** (9): 2296-2302.

Anonim, 2017. ***Buğday Entegre Mücadele Teknik Talimatı.*** T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı, 137 s.

Arpaguş, Ö., Okay, F.Y., Gümüş, C., Ellialtıoğlu, Ş.Ş., 2017. Micropropagation studies on critically endangered Mediterranean knapweed (*Centaurea tchihatcheffii* Fisch et. Mey). ***The Eurasian Agriculture and Natural Sciences Congress***, 20-23 September, Bişkek/Kırgızistan.

Arif, R., 2002. ***Centaurea Türlerinin Biyolojik Aktivite Yönünden Değerlendirilmesi,*** (yüksek lisans tezi, basılmamış). GÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Arif, R., Küpeli, E., Ergun, F., 2004. The biological activity of *Centaurea* L. Species. ***G. U. J. Science,*** **17**: 149-164.

Atalay, E., Erisen, S., 2017. High frequency regeneration of critically endangered endemic plant *Centaurea lycaonica*. ***Fresenius Environmental Bulletin,*** **26** (11): 6356-6363.

Aydoğan, S.K., Erdağ, B., 2015. Callus induction and adventitious shoot regeneration of *Centura zeybekii* endangered endemic plant. ***Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi,*** **4 (**2): 1-8.

Aytac, Z., Duman, H., 2005. A new species of *Centaurea* L. (*Compositae*) from Turkey. ***Pak. J. Bot.,*** **37** (3): 563-566.

Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M.A., 2001. ***Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri.*** Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya, s.1-35.

Barrero, A., Oltra, J., Rodriguez, I., Barragan, A., Gravalos, D., Ruiz, P., 1995. Lactones from species from *Centaurea*. Cytotoxic and antimicrobial activities. ***Fitoterapia,*** **66** (3): 227-230.

Barrero, A. F., Herrador, M. M., Arteaga, P., Cabrera, E., Rodriguez-Garcia, I., Garcia-Moreno, M., Gravalos, D. G., 1997. Cytotoxic activity of flavonoids from *Carthamus arborescens*, *Ononis natrix* ssp. *ramosissima* and *Centaurea malacitana*. ***Fitoterapia,*** **68** (3): 281-283.

Baytop, T., Kadıoğlu, D., 2002. İstanbul bölgesinin tıbbi bitkileri. ***14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (BİHAT)***, Eskişehir, Bildiri kitabı s:45-47.

Boğa, M., Alkan, H., Ertaş, A., Oral, E. V., Yılmaz, M. A., Yeşil, Y., Gören A.C., Kolak, U., 2016. Phytochemical profile and some biological activities of three *Centaurea* species from Turkey. ***Tropical Journal of Pharmaceutical Research***, **15** (9): 1865-1875.

Bouzghaia, B., Moussa, M. T. B., Goudjil, R., Harkat, H., Pale, P., 2020. Chemical composition, in vitro antioxidant and antibacterial activities of *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* (dostál) greuter. ***Natural Product Research***, 1-6.

Bronner, R., Jeannin, G., Hahne, G., 1994. Early cellular events during organogenesis and somatic embryogenesis induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus*). ***Canadian Journal of Botany,*** **72** (2): 239-248.

Bussmann, R.W., Batsatsashvili, K., Kikvidze, Z., 2020. *Centaurea behen* L. *Centaurea depressa* M. Bieb. *Rhaponticum repens* (L.) *Hidalgo Asteraceae*. In:

Batsatsashvili K., Kikvidze Z., Bussmann R. (eds) ***Ethnobotany of the Mountain Regions of Central Asia and Altai***. ***Ethnobotany of Mountain Regions***. Springer, Cham.

Can, K., 2016. ***Farelerde Pseudomonas Aeruginosa Pnömoni Modelinde Pseudomonas Aeruginosa Phikz Fajının Enfeksiyonun Tedavisi Üzerine Etkisinin Araştırılması,*** (doktora tezi, basılmamış). İÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Cuenca, S., Amo-Marco, J.B., 2000. In vitro propagation of *Centaurea spachii* from inflorescence stems***, Plant Growth Regul***., **30**: 99-103.

Cuenca, S., Amo-Marco, J. B., Parra, R., 1999. Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea paui* Loscos ex Willk.(Compositae). ***Plant Cell Reports***, **18** (7-8): 674-679.

Curkovic-Perica. M., 2003. *In vitro* propagation of *Centaurea rupestris* L. ***Acta Biologia Cracoviensia,*** **45** (2): 127-130.

Çölgeçen, H., Koca, U., Yagci, C., Toker, G., Toker, M. C., Vural, M., 2012. Callus induction and secondary metabolite production studies in Centaurea tchihatcheffii Fisch. CA Mey. ***FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences,*** **37** (1): 9-15.

D'Agata, E., 2014. Pseudomonas aeruginosa and Other Pseudomonas Species. In: J.E. Bennett, R. Dolin ve M.J. Blaser (Ed.), ***Principles And Practice of Infectious Diseases***. Philadelphia, USA: Elsevier Health Sciences; 2518-2531.

Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K., 1988. ***Centaurea L.*** In: Davis PH, Mill RR & Tan K eds. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 10:166-169 (Supplement). Edinburgh University Press.

Demirel, S., 2015. ***Bazı Centaurea sp. Türlerinin in vitro Koşullarda Çimlenme Olanaklarının Araştırılması,*** (yüksek lisans tezi, basılmamış). VYYÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.

Dığrak, M., İlçim, A., Alma, M.H., 1999. Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*. ***Phytotherapy Research,*** **13**: 584-587.

Dızkırıcı, A., Koroglu, Z., 2018. Van ilinde bulunan Centaurea cinsine ait beş türün moleküler analizi ve Centaurea depressa'nın taksonomik pozisyonunun belirlenmesi. ***Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi***, **22** (1): 226-231.

Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N., 2000. ***Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler)***.Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Yayını, Ankara, 246 s.

Ekinci, Ö., 2019. ***Kritik Endemik Centaurea amaena'nın Doku Kültürü Yöntemleriyle Hızlı Çoğaltımı*** (yüksek lisans tezi, basılmamış). EÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.

Emek, Y., Erdag, B., 2013. In vitro propagation of critically endangered endemic rhaponticoides mykalea (hub.-mor.) by axillary shoot proliferation, ***Current Progressin Biological Research***, Marina Silva-Opps (ed.). IntechOpen.

Erecevit, P., 2007. ***Tıbbi Amaçlar İçin Kullanılan Bazı Bitki Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması,*** (yüksek lisans tezi, basılmamış). FÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

Ertürk, Ö., Demirbağ, Z., 2003. *Scorzonare mollis* Bieb. (*Compositae*) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi. ***Çevkor,*** **47**: 27-31.

Eskin, B., 2011. ***Centaurea kılaea*** **Boiss. ve** ***C. consanguinea*** **DC (*Compositae/Asteraceae*) Endemik Türlerinin Aotekolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması,** (doktora tezi, basılmamış). MÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Finer, J., 1987. Direct Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Immature Embryos of Hybrid Sunflower (*Helianthus annuus* L.) On A High Sucrose-Containing Medium. ***Plant Cell Reports,*** **6** (5): 372-374.

González-Benito, M., Martín, C., 2010. In vitro Preservation of Spanish Biodiversity. ***In vitro Cell. Dev. Biol. Plant,*** **47**: 46- 54.

Gorgorov, R., Stanilova, M., Bancheva, S., 2011. In vitro cultures of Balkan and Bulgarian endemic Centaurea species. ***Proceedings of the 4th International Symposium "New research in biotechnology"***, Romania.

Gorgorov, R., Traykova, B., Stanilova, M., 2015. Ex situ conservation of *Centaurea davidovii* Urum.: an in vitro approach***. Comptes Rendus de l'Académie bulgare des Sciences***, **68** (10): 1265-1270.

Göztaş, T., 2008. ***Bazı Bitkisel Hormonların Centaurea kotschyi (Boiss. & Heldr.) Hayek var. Kotschyi Bitkisinin Tohum Çimlenmesi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması,*** (yüksek lisans tezi, basılmamış). SÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Gürkan, E., Sür-Altıner, D., Sarıoğlu, İ., Tuzlacı, E., 2000. *Centaurea hermannii* bitkisinin antibakteriyel ve antifungal etkileri. ***XIII.XI. Bitkisel İlaç Hammaddeler Toplantısı Bildiri Kitabı***. Ed. Coşkun, M., Marmara Üniversitesi Teknik Bilimler Eğitim Fakültesi Matbaa Birimi, İstanbul.

Hammat, N., Evans, P.K., 1985. The in vitro propagation of an endangered species: ***Centaurea junoniana Svent. (Compositae). J. of Hort. Sci.*** **60** (1): 93-97.

Hosoki, T.J., Kimura, D.J., 1997. Micropropagation of Centaurea macrocephala Pushk. Ex. Willd. by shoot axis splitting. ***Horti. Sci.,*** **32** (6): 1124-1125.

ISTA, 2019. International rules for seed testing. *https://www.seedtest.org/en/ista-rules-2019-_content---1--3410.html* Erişim :01.04.2020.

IUCN, 2001. ***Red List Categories: Version 3.1.*** Prepared by ICUN Species Survival Commission, ICUN, Gland Switzerland , Cambridge, UK.

Kakegawa, K., Hattori, E., Koike, K., Takeda, K., 1991. Induction of anthocyanin synthesis and related enzyme activities in cell cultures of *Centaurea cyanus* by UV-light irradiation. ***Phytochemistry***, **30** (7): 2271-2273.

Khleifat, K. M., Matar, S. A., Jaafreh, M., Qaralleh, H., Al-limoun, M. O., Alsharafa, K. Y., 2019. Essential oil of *Centaurea damascena* aerial parts antibacterial and synergistic effect. ***Journal of Essential Oil Bearing Plants***, **22** (2): 356-367.

Kurt S, Erdag B., 2009. In vitro germination and axillary shoot propagation of *Centaurea zeybekii****. Biologia-Section Botany***, **64** (1): 97-101.

Lonergan, G., Routsi, E., Georgiadis, T., Agelis, G., Hondrelis, J., Matsoukas, J., Caplan, F. R., (1992). Isolation, NMR studies, and biological activities of onopordopicrin from Centaurea sonchifolia. ***Journal of natural products,*** **55** (2): 225-228.

Mallon, R., Rodríguez-Oubiña, J., González, M.L., 2010. In vitro propagation of the endangered plant *Centaurea ultreiae*: assessment of genetic stability by cytological studies, flow cytometry and RAPD analysis***. Plant Cell Tiss. Organ Cult.***, **101**: 31-39.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures***. Physiol Plant.,*** **15**: 473-497.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) 2009. ***Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard*** 8th ed. Wayne Pa. MO8-A8.

Negrete, R., Backhouse, N., Avendano, S., San Martin, A. 1984. Dehydrocostus lactone and 8β - hydroxydehydrocostus lactone in *Centaurea chilensis* Hook and Arn. ***Planta Med.,*** **18** (3): 226-232.

Negrete, R. E., Backhouse, N., Cajigal, I., Delporte, C., Cassels, B. K., Breitmaier, E., Eckhardt, G. 1993. Two new antiinflammatory elemanolides from Centaurea chilensis. ***Journal of Ethnopharmacology,*** **40** (3): 149-153.

Okay, Y., Ellialtıoğlu, Ş., Demir, K., Tıpırdamaz, R., Savcı, A.E., Özler, H., Gümüş, C., Günöz, A., 2014. Sentorya (*Centaurea tchihatchefii* Fish. Mey.) Endemik Bitkisinin Çoğaltımı Üzerinde Çalışmalar. ***Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi,*** **7** (1): 42-48.

Orallo, F., Lamela, M., Camina, M., Uriate, E., Calleja, J., 1998. Preliminary study of the potential vasodilator effects on rat aorta of centaurein and centaureidin, two flavonoids from Centaurea corcubionensis. ***Planta Medica-Natural Products and Medicinal Plant Research,*** **64** (2): 116-119.

Ozsoy, N., Kultur, S., Yılmaz-Ozden, T., Ozbek-Celik, B., Can, A., Melikoğlu, G., 2015. Antioxidant, anti-inflammatory, acetylcholinesterase inhibitory and antimicrobial activities of Turkish endemic *Centaurea antiochia* var. *praealta*. Journal of Food Biochemistry, **39** (6): 771-776.

Özdil, M.K., 2018. ***Endemik Centaurea Fenzlii Reichardt Türünün Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitesi*** (yüksek lisans tezi, basılmamış). SÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Ozel, C. A., Khawar, K. M., Mirici, S., Ozcan, S., Arslan, O., 2006. Factors affecting in vitro plant regeneration of the critically endangered Mediterranean knapweed (*Centaurea tchihatcheffii* Fisch et. Mey). ***Naturwissenschaften,*** **93** (10): 511-517.

Özhatay, N., Byfield, A., Atay, S., 2005. ***Türkiye'nin 122 Önemli Bitki Alanı.*** Nas matbaacılık A.Ş. s. 476 İstanbul.

Perez, C., Paul, M., Bazerque, P., 1990. Antibiotic assay by agarwell diffusion method. ***Acta Biol Med Exp.***; **15**: 113-115.

Pevalek-Kozlina, B., (1998). In vitro propagation of *Centaurea ragusina* L., a Croatian endemic species. ***Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica***, **40** (1-2): 21-24.

Pourali-Kahriz, M., 2016. ***Türkiye'de Bazı Önemli Çeltik Çeşitlerinde Herbisitlere Karşı Dirençlilik Gen Aktarımı Çalışmaları*** (doktora tezi, basılmamış). AÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Pourali-Kahriz, P., 2016. ***Şeker Pancarı (Beta vulgaris L.) Bitkisinde Agrobacterium Aracılığıyla Herbisitlere Karşı Dirençlilik Gen Aktarım Çalışmaları,*** (doktora tezi, basılmamış). AÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Qaralleh, H., Khleifat, K. M., Al-Limoun, M. O., Alzedaneen, F. Y., Al-Tawarah, N. (2019). Antibacterial and synergistic effect of biosynthesized silver nanoparticles using the fungi Tritirachium oryzae W5H with essential oil of Centaurea damascena to enhance conventional antibiotics activity. ***Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology,*** **10** (2): 025016.

Rai, M.K., Akhtar, N., Jaiswal, V.S., 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. *Banarasi* local. ***Sci Horti,* 113**:129-133.

Rojas, R., Bustamante, B., Bauer, J., Fernandez, I., Alban, J., Lock, O., 2003. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. ***J Ethnopharmacol,* 88**: 199-204.

Rusak, G., Robinson, N., Pepeljnjak, S., 2002. Antibacterial and antifungal activity of extracts and quersetagetin derivate isolated from *Centaurea rupestris* L. ***Acta biologica cracoviensia Series Botanica,* 44**: 169-174

Sahin, F., Karaman, I˙., Gulluce, M., Ogutcu, H., Sengul, M., Adıguzel, A., Ozturk, S., Kotan, R., (2003): Evaluation of antimicrobial activities of Satureja hortensis L. ***J. Ethnopharmacol,* 87**: 61-65.

Saraçoğlu, T.H., 2011. ***İç Anadolu Bölgesi'nde Yetişen Bazı Bupleurum L. (Apiceae) Taksonlarının Uçucu Yağ Bileşimleri ve Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi***, (doktora tezi, basılmamış). SÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Shakeri, A., Masullo, M., Bottone, A., Asili, J., Emami, S. A., Piacente, S., Iranshahi, M. 2019. Sesquiterpene lactones from Centaurea rhizantha CA Meyer. ***Natural Product Research,* 33** (14): 2016-2023.

Snedecor , G.W., Cochran, W.G., 1967. ***Statisticak Methods***. The Iowa State University Press, Iowa, USA.

Sür-Altıner, D., Gürkan, E., Sarıoğlu, İ., Ang, Ö., Tuzlacı, E., 1997. Centaurea hermannii F. Hermann'nın antibakteriyel ve antifungal etkileri. ***XI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı***, Ed. Coşkun, M., Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 75, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 553.

Şen, C., 2011. ***Hibiscus sabdariffa L. Bitkisinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitesinin Araştırılması.*** (yüksek lisans tezi, basılmamış). TÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Takashi, J.H., Daisuke, A.K., 1997. Micropropagation of *Centaurea macrocephala* Pushk. Ex. Willd. by shoot axis splitting. ***Hort Sci***., **32** (6): 1124-1125.

Tan, G., Baykan Erel, Ş., Demir, S., Akgün, İ., Bedir, E., ve Karaalp,C., 2008. Centaurea Cyanus L.'nin Sekonder Metabolitleri. ***Ankara Ecz. Fak. Derg.,* 37** (4): 285-294.

Tanimoto, S., Ishioka, N., 1991. Effects of gelling agents on adventitious organ induction and callus growth in some plant species [Perilla frutescens, Centaurea cyanus, Lilium longiflorum, Callistephus chinensis and Torenia fournieri]. ***Bulletin of the Faculty of Agriculture, Saga University,* 70**: 61-66.

Tozyilmaz, V., Bulbul, A. S., Ceylan, Y., Armagan, M., 2020. Antibacterial, antifungal, antibiofilm and antioxidant activities of some endemic plants in Anatolian flora**.** ***Fresenıus Envıronmental Bulletin,* 29** (6): 4338-4346.

Traykova, B., Bancheva, S., Gorgorov R, Delcheva M, Stanilova M. 2015. Ex situ and in situ conservation of *Centaurea* pseudaxillaris (Asteraceae) by means of plant biotechnology. ***J. BioSci. Biotechnol***., 137-145.

Tubives., 2020. *http://www.tubives.com/* Erişim :31.08.2020.

Türkoglu, N., Ozdemir, F.A., Keskin, N., Khawar, K.M., 2018. Efficient protocol for multiple micro-shoot regeneration from endanger, endemic and ornamental plant Centaurea fenzlii reichardt. ***Fresenius Environmental Bulletin,* 27** (2): 1076-1080.

Uysal, I., Celik, S., Olcatay, M., 2005. Antibacterial activity of Centaurea species having ethnobotanical features. ***Pakistan Journal of Biological Sciences,*** **8** (12): 1812-1813.

Uzunhısarcıklı, M.E., Teksen, M., Dogan, E., 2005. *Centaurea marashica* (Asteraceae), a new species form Turkey. ***Ann. Bot. Fennici,*** **42**: 309-312.

Valletta, A., Santamaria, A. R., Fabrini, G., Tocci, N., Filho, V. C., Wagner, T., Pasqua, G., 2016. Strategies for ex situ conservation of *Centaurea cineraria* subsp. circa (Asteraceae), an endemic plant from Lazio (Italy). ***Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology,*** **150** (2): 323-332.

Vural, M., 2006. ***Centaurea tchihatcheffii'nin Dünü ve Bugünü***. 327-336. (Ed: A. Boşgelmez), Gölbaşı Mogan Gölü, Andezit Taşı, *Centaurea tchihatcheffii*. Bizim Büro Basımevi-Ankara 795 s.

Wagenitz, G., 1975. Centaurea L. In: Davis, P.H. (Ed.): ***Flora of Turkey and the East Aegean Islands,*** **5**: 465-585.

Wagenitz, G., 1986. Centaurea in South-West Asia: Patterns of distribution and diversity. ***Proceedings of the Royal Society of Edinburgh***; 89 B: 11-21.

Yaltırık, F., Efe, A., 1996. ***Otsu Bitkiler Sistematiği***. Üniversite Yayın No: 3940 Orman Fakültesi Yayın No: 10, İstanbul.

Yıldırım, N., 2008. ***Centaurea balsamita Lam. ve Centaurea coronopifolia Lam. Türlerinin Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi,*** (yüksek lisans tezi, basılmamış). SÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Yüzbaşıoğlu, E., Dalyan. E., Bona, M., Ö,. G., 2012. İn vitro propagation of endemic plant Centaurea arifola Boiss, Taxa. ***IUFS Journal of Biology,*** **71** (2): 121-127.

ÖZ GEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimini Van'da tamamladı. 2010-2014 yılları arasında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimini tamamladı. 2019 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORİJİNALLİK RAPORU

Tarih: 12/01/2022

Tez Başlığı / Konusu: *Centaurea depressa* BIEB.'in *in vitro* Bitki Rejenerasyonu ve Antibakteriyel Aktivite Özelliklerinin Belirlenmesi

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 30 sayfalık kısmına ilişkin, 12/01/2022 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 18 (yüzde on sekiz) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:
- Materyal ve yöntem hariç,
- Kaynaklar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

12.01.2022

Adı Soyadı: Ahmet Çağlar KAYA

Öğrenci No: 19910001326

Anabilim Dalı: Bahçe Bitkileri

Programı:

Statüsü: ■ Yüksek Lisans □ Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

Doç.Dr. Nurhan KESKİN

ENSTİTÜ ONAY
UYGUNDUR