

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***SATUREJA SPICIGERA* (C. KOCH) BOISS. (TRABZON KEKİĞİ)' NİN
MİKROÇOĞALTIMI VE *IN VITRO* KOŞULLARDA ÜRETİLEN BİTKİCİKLERİN
FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Halil İbrahim ÖZTÜRK

HAZİRAN 2012

TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***SATUREJA SPICIGERA* (C. KOCH) BOISS. (TRABZON KEKİĞİ)' NİN
MİKROÇOĞALTIMI VE *IN VITRO* KOŞULLARDA ÜRETİLEN
BİTKİCİKLERİN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ**

Biyolog Halil İbrahim ÖZTÜRK

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 25.05.2012
Tezin Savunma Tarihi : 15.06.2012

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN

Trabzon 2012

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalında
Halil İbrahim ÖZTÜRK tarafından hazırlanan

***SATUREJA SPICIGERA* (C. KOCH) BOISS. (TRABZON KEKİĞİ)' NİN
MİKROÇÖĞALTIMI VE *IN VITRO* KOŞULLARDA ÜRETİLEN
BİTKİCİKLERİN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 29/05/2012 gün ve 1458 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ali Ömer ÜÇLER

Üye : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN

Üye : Prof. Dr. Hüseyin İNCEER

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Satureja spicigera* (C. Koch) Boiss. (Trabzon kekiği)’nin Mikroçoğaltımı ve *In vitro* Koşullarda Üretilen Bitkiciklerin Fenolik Bileşiklerinin Analizi” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışma konusunun belirlenmesinde, çalışmanın laboratuvar denemelerinin kurulmasında, literatür ve materyal temini, sonuçların yorumlanmasında katkı sağlayan, bilgi ve önerileriyle yol gösteren her türlü destek ve yardımlarını gördüğüm danışmanım Prof. Dr. Atalay SÖKMEN’e, bana hem arazi hem de laboratuvar işlerini öğreten Doktora Öğrencisi Ersan BEKTAŞ’a ve Mustafa CÜCE’ye, bazı kimyasal deneylerde yardımcı olan Prof. Dr. Münevver SÖKMEN ve Arş. Gör. Gönül HATİPOĞLU’na teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Hayatımın her döneminde yanımda olan, maddi ve manevi her türlü desteklerini benden esirgemeyen aileme ve hayat arkadaşım Beyhan SAMAST’a teşekkür ederim.

Halil İbrahim ÖZTÜRK

Trabzon 2012

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Satureja spicigera* (C. Koch) Boiss. (Trabzon kekiği)’ nin Mikroçoğaltımı ve *in vitro* Koşullarda Üretilen Bitkiciklerin Fenolik Bileşiklerinin Analizi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Atalay Sökmen’ in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 18/07/2012

.....
Halil İbrahim Öztürk

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. <i>Satureja spicigera</i> (C. Koch) Boiss. (Trabzon Kekığı) Hakkında Botanik Bilgiler.....	18
1.3. <i>Satureja spicigera</i> Hakkında Yapılan Önceki Çalışmalar.....	20
1.4. Amaç	21
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	22
2.1. Materyal	22
2.1.1. Bitki Materyali	22
2.1.2. Kültür Ortamının Hazırlanmasında Kullanılan Besi Ortamları	22
2.1.3. Kültür Ortamına İlave Edilen Bitki Büyüme Düzenleyicileri	22
2.1.3.1. Giberellinler	22
2.1.3.2. Oksinler	22
2.1.3.3. Sitokininler.....	23
2.2. Yöntem.....	23
2.2.1. Tohumların Canlılık Testi.....	23
2.2.2. Kültür Ortamının Hazırlanması	24
2.2.3. Bitki Tohumlarının Sterilizasyonu.....	24
2.2.3.1. Sodyum Hipoklorit Çözeltisi Kullanılarak Yapılan Sterilizasyon.....	25
2.2.3.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Kullanılarak Yapılan Sterilizasyon.....	25
2.2.4. <i>In vitro</i> Uygulamalar ve Denemelerin Kurulması	25

2.2.4.1	<i>In vitro</i> ' da Tohumların Çimlendirilmesi.....	25
2.2.4.1.1.	GA ₃ Kullanarak Çimlendirme.....	25
2.2.4.1.2.	Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kullanmadan Yapılan Çimlendirme.....	26
2.2.4.2	Çimlenen Tohumlardan Alınan Sürgün Uçları ile Kallus Oluşturma.....	26
2.2.4.3	Kallus Kütlelerinden Dolaylı Organogenezle Sürgün Oluşumu.....	27
2.2.4.4	Kallus Kütleleri Üzerinde Somatik Embriyo Oluşumu	28
2.2.5.	Özütlerin Elde Edilmesi.....	29
2.2.5.1	Toplam Fenol İçeriği.....	29
2.2.5.2	HPLC İle Fenolik Bileşenlerin Analizi.....	30
2.2.5.3.	Kuru Bitki Örneklerinden Elde Edilen Uçucu Yağ Özütleri	31
2.2.6.	Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	31
3.	BULGULAR.....	32
3.1.	Tohumların Canlılık Testi.....	32
3.2.	Sterilizasyon Yöntemi Seçimi.....	32
3.3.	Doku Kültürleri ile İlgili Sonuçlar	33
3.3.1	<i>Satureja spicigera</i> Bitkisinin Tohumlarının Çimlendirilmesi	33
3.3.1.1	GA ₃ Kullanarak Yapılan Çimlendirme	33
3.3.1.2.	Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kullanmadan Yapılan Çimlendirme.....	35
3.3.2.	Çimlendirilen Sürgünlerden Alınan Eksplantlarda Kallus Oluşumu.....	36
3.3.3.	Kallus Kütlelerinden Dolaylı Organogenezle Sürgün Oluşumu.....	38
3.3.4	Somatik Embriyogenez Çalışmaları	40
3.4.	Fenolik Bileşen Analizi.....	43
3.4.1.	Toplam Fenol.....	43
3.4.2.	HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analizi	45
3.4.3.	Kuru Bitki Örneklerinden Elde Edilen Uçucu Yağ Verimleri.....	57
4.	TARTIŞMA VE SONUÇLAR	58
5.	ÖNERİLER.....	67
6.	KAYNAKLAR	68
7.	EKLER.....	78
ÖZGEÇMİŞ		

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

SATUREJA SPICIGERA (C. KOCH) BOISS. (TRABZON KEKİĞİ)' NİN
MİKROÇOĞALTIMI VE *IN VITRO* KOŞULLARDA ÜRETİLEN BİTKİCİKLERİN
FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ

Halil İbrahim ÖZTÜRK

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Atalay SÖKMEN
2012, 77 Sayfa, 3 Sayfa Ek

Satureja spicigera (C. Koch) Boiss. (Trabzon Kekığı) Doğu Karadeniz Bölgesinde'nde geniş yayılış gösteren Lamiaceae familyasına ait aromatik bir bitki türüdür. Baharat, koku vericiler ve antimikrobiyal/antioksidan koruyucu maddeler elde edildiğinden gıda, ilaç, kozmetik sanayinde kullanılmaktadır. Bu bitkinin mikroçoğaltım potansiyeli; Murashige ve Skoog (MS; 1962), Linsmainer ve Skoog (LS,1965), Gamborg B5 (G B5, 1968) besi ortamları ve giberellik asit (GA₃), indol bütirik asit (IBA), 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D), 6-benzil amino pürin (6-BA), 6-furfuril amino pürin (kinetin) gibi bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak araştırıldı. Sonuçta, en iyi çimlenme 1 mg/L GA₃ içeren B5 besi ortamında, en yüksek kallus verimi 2 mg/L IBA + 2 mg/L 6-BA içeren MS ortamında, dolaylı organogenezle en iyi sürgün gelişimi 1 mg/L IBA + 2 mg/L kinetin içeren MS ortamında ve en yüksek somatik embriyo verimi ise 5 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L kinetin içeren MS ortamında tespit edildi. Kallus kültür hatlarından elde edilen özütlerde yedi fenolik (gallik asit, protokatekuik asit, protokatekualdehit, klorojenik asit, benzoik asit, ferulik asit ve rosmarinik asit) HPLC ile kalitatif ve kantitatif olarak analiz edildi. En yüksek uçucu yağ verimi (42,3 µg / g kuru ağırlık) 1 mg/L 2,4-D + 2 mg/L kinetin içeren MS ortamında büyütülen fidelerden elde edildi.

Anahtar Kelimeler: *Satureja spicigera*, Mikroçoğaltım, Fenolikler, HPLC

Master of Science Thesis

SUMMARY

MICROPROPAGATION OF *SATUREJA SPICIGERA* (C. KOCH) BOISS. (CREEPING SAVORY) AND ANALYSIS OF PHENOLIC CONSTITUENTS PRODUCED BY THE SEEDLINGS GROWN UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

Halil İbrahim ÖZTÜRK

Karadeniz Technical University
The Graduate School and Applied Sciences
Department of Biology
Supervisor: Prof. Dr. Atalay SÖKMEN
2012, 77 Pages, 3 Pages Appendix

Satureja spicigera (C. Koch) Boiss. (Trabzon Thyme) is an aromatic plant species belonging to the Lamiaceae family, and is widely distributed in the Eastern Black Sea region. As being evaluated as spices, flavorings and antimicrobial/antioxidant preservatives, this plant can be employed in food, pharmaceutical, cosmetic industries. Micropropagation potential of this plant was investigated by using basal media such as Murashige ve Skoog (MS, 1962), Linsmainer ve Skoog (LS,1965), Gamborg B5 (G B5, 1968) as well as plant growth regulators, such as giberellic acid (GA₃), indole butyric acid (IBA), 2,4-dichloro phenoxy acetic acid (2,4-D), 6-benzyl amino purine (6-BA), 6-furfuryl amino purine (kinetin). The best germination was observed from B5 basal medium supplemented with 1 mg/L GA₃, whilst the highest callus biomass was obtained from MS with 2 mg/L IBA plus 2 mg/L 6-BA, the most favorable shoot development in indirect organogenesis was from MS with 1 mg/L IBA plus 2 mg/L kinetin and finally the best somatic embryo yield was obtained from MS supplemented with 5 mg/L 2,4-D plus 0,1 mg/L kinetin. Seven different phenolics (gallic acid, protocatequic acid, protocataquic aldehyde, chlorogenic acid, benzoic acid, ferulic acid and rosmarinic acid) were analysed by HPLC both qualitatively and quantitatively in the extracts obtained from callus culture lines. The highest yield (42,3 µg / g dry weight). of essential oil was from those seedlings grown on the MS basal media supplemented with 1 mg / L 2,4-D and 2 mg / L kinetin.

Key Words: *Satureja spicigera*, Micropropagation, Phenolics, HPLC

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Satureja spicigera</i> (C. Koch) Boiss.'nın taksonomik hiyerarşisi.....	19
Şekil 2. <i>Satureja spicigera</i> (C. Koch) Boiss.'nın ekim ayındaki çiçekli.....	19
Şekil 3. <i>Satureja spicigera</i> taksonunun Türkiye üzerindeki dağılışı.....	20
Şekil 4. <i>Satureja spicigera</i> taksonunun karelaj sistemine göre dağılışı.....	20
Şekil 5. Tetrazolyum bileşiğinin dehidrojenaz enzimiyle girdiği kimyasal tepkime.....	23
Şekil 6. Toplam fenol tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği.....	30
Şekil 7. G-2 ortamında yapılan çimlendirme.....	34
Şekil 8. M-2 ortamında yapılan çimlendirme.....	34
Şekil 9. G-3 ortamında yapılan çimlendirme.....	35
Şekil 10. M-3 ortamında yapılan çimlendirme.....	35
Şekil 11. Farklı besi ortamlarında ve büyüme düzenleyicilerinde hesaplanan ortalama kallus ağırlıkları.....	37
Şekil 12. G-4 ortamında oluşan kalluslar.....	37
Şekil 13. G-5 ortamında oluşan kalluslar.....	37
Şekil 14. M-4 ortamında oluşan kalluslar.....	38
Şekil 15. M-5 ortamında oluşan kalluslar.....	38
Şekil 16. L-1 ortamında oluşan kalluslar.....	38
Şekil 17. L-2 ortamında oluşan kalluslar.....	38
Şekil 18. Dolaylı organogenezle oluşan sürgün sayıları.....	39
Şekil 19. G-6 ortamında dolaylı organogenezle sürgün oluşumu.....	40
Şekil 20. G-7 ortamında dolaylı organogenezle sürgün oluşumu.....	40
Şekil 21. M-6 ortamında dolaylı organogenezle sürgün oluşumu.....	40
Şekil 22. M-7 ortamında dolaylı organogenezle sürgün oluşumu.....	40
Şekil 23. Kullanılan besi ortamlarına ve BBD'lere göre ortalama somatik embriyo içerikli kallus ağırlıkları.....	42
Şekil 24. G-8 ortamında dolaylı organogenezle sürgün oluşumu.....	43
Şekil 25. G-9 ortamında dolaylı organogenezle sürgün oluşumu.....	43

Şekil 26.	M-8 ortamında dolaylı organogenezle sürgün oluşumu.....	43
Şekil 27.	M-9 ortamında dolaylı organogenezle sürgün oluşumu.....	43
Şekil 28.	Satureja spicigera klonlarının % toplam fenol miktarları.....	45
Şekil 29.	500 mikromolarlık standart karışımının 280 nm' deki kromatogramı.....	47
Şekil 30.	1. klonun 280 nm' deki kromatogramı.....	48
Şekil 31.	2. klonun 280 nm' deki kromatogramı.....	49
Şekil 32.	3. klonun 280 nm' deki kromatogramı.....	50
Şekil 33.	4. klonun 280 nm' deki kromatogramı.....	51
Şekil 34.	5. klonun 280 nm' deki kromatogramı.....	52
Şekil 35.	6. klonun 280 nm' deki kromatogramı.....	53
Şekil 36.	7. klonun 280 nm' deki kromatogramı.....	54
Şekil 37.	8. klonun 280 nm' deki kromatogramı.....	55
Şekil 38.	HPLC ile tespit edilen fenolik bileşiklerin derişimleri.....	56
Şekil 39.	MeOH özütlerinin % verimi - Toplam fenolik bileşiklerin % derişimi.....	63
Şekil 40.	<i>Satureja spicigera</i> bitkisinin klonlarında tespit edilen fenolik bileşenlerinin kimyasal formülleri.....	64

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Türkiye’de yetişen doğal <i>Satureja</i> taksonları.....	3
Tablo 2. Ticareti yapılan <i>Satureja</i> L. türlerinin yöresel adları.....	4
Tablo 3. GA ₃ kullanılarak hazırlanan G-2 ve M-2 besi ortamı içerikleri.....	26
Tablo 4. G-3 ve M-3 besi ortamı içerikleri.....	26
Tablo 5. Sürgün eksplantlarından kallus oluşturmak için hazırlanan besi ortamı içerikleri.....	27
Tablo 6. Kallus kütlelerinden dolayı organogenezle sürgün oluşturmak için hazırlanan besi ortamları.....	28
Tablo 7. Somatik embriyogenezi teşvik etmek için kullanılan besi ortamı içeriği.....	29
Tablo 8. <i>Satureja spicigera</i> bitkisinin TTC bileşiğiyle yapılan TZ testi.....	32
Tablo 9. <i>Satureja spicigera</i> bitkisinin tohumlarının sterilizasyon yöntemi seçim sonuçları.....	33
Tablo 10. GA ₃ kullanarak yapılan çimlendirmenin sonuçları.....	34
Tablo 11. BBD kullanmadan yapılan çimlendirmenin sonuçları.....	35
Tablo 12. Farklı besi ortamlarında oluşan ortalama kallus ağırlıkları.....	36
Tablo 13. Farklı besi ortamlarında dolaylı organogenezle oluşan sürgün sayıları.....	39
Tablo 14. G B5 ve MS ortamlarında oluşan somatik embriyo içeren kallus kütlelerinin ortalama ağırlıkları.....	41
Tablo 15. MeOH ile süzülen bitki klonlarından elde edilen özütlerin verimleri.....	44
Tablo 16. Toplam fenol miktarları ve % derişimler.....	45
Tablo 17. HPLC analizleri için hazırlanan özütlerin verimleri.....	46
Tablo 18. 1. klonda tespit edilen fenolik bileşikler.....	48
Tablo 19. 2. klonda tespit edilen fenolik bileşikler.....	49
Tablo 20. 3. klonda tespit edilen fenolik bileşikler.....	50
Tablo 21. 4. klonda tespit edilen fenolik bileşikler.....	51
Tablo 22. 5. klonda tespit edilen fenolik bileşikler.....	52
Tablo 23. 6. klonda tespit edilen fenolik bileşikler.....	53
Tablo 24. 7. klonda tespit edilen fenolik bileşikler.....	54
Tablo 25. 8. klonda tespit edilen fenolik bileşikler.....	55

Tablo 26. Uçucu yağ verimleri.....	57
------------------------------------	----

SEMBOLLER DİZİNİ

2, 4-D	: 2,4 Diklorofenoksi Asetik Asit
BAP (6-BA)	: Benzil Amino Pürin
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyicisi
DAD	: Diode Array Detektör
dH ₂ O	: Deiyonize Su
G B5	: Gamborg Bazal 5 Besi Ortamı
GA	: Gallik Asit
GA ₃	: Giberellik Asit
GC	: Gas Chromatography (Gaz Kromatografisi)
GC/MS	: Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi)
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HCl	: Hidrojen Klorür
HPLC	: High Pressure Liquid Chromatography (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)
IAA	: Indol-3-Asetik Asit
IBA	: Indol-3-Butirik Asit
Kinetin	: 6-Furfuril Amino Pürin
KNO ₃	: Potasyum Nitrat
LS	: Linsmainer ve Skoog Besi Ortamı
mAU	: Milli Absorbance Unit
MeOH	: Metanol
MS	: Murashige ve Skoog Besi Ortamı
Na ₂ CO ₃	: Sodyum Karbonat
NAA	: Naftalen Asetik Asit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
ppm	: Parts Per Million (Milyonda Parça)
R ²	: Regresyon Katsayısı
TDZ	: Thidiazuron
TLC	: Thin Layer Chromatography (İnce Tabaka Kromatografisi)

TTC : 2,3,5-Trifenil Tetrazolyum Klorit
TZ Test : Tetrazolyum Testi
UV : Ultra Viole
V : Volume (Hacim)
 $X \pm S_x$: Ortalama \pm Standart Hata

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Doğadaki tüm bitkiler, hayvanlar ve insanlar bir dengenin ürünüdürler. Mitolojide bitkiler tanrıların insana verdiği en değerli armağan olarak ele alınmıştır. Tüm bitkiler insanın hizmetindedir ve insanın varoluşundan itibaren bitkilerle olan ilişkisi başlamıştır (Gezgin, 2006). İlk çağlardan kalan arkeolojik bulgulara göre insanlar, besin elde etmek ve sağlık sorunlarını gidermek için öncelikle bitkilerden faydalanmışlardır (Koçyiğit, 2005).

Türkiye Florası'na "Flora of Turkey and The East Aegean Islands" göre, Türkiye 174 familyaya ait 1251 cins ve 12.000'den fazla tür ve tür altı taksonu (alt tür ve varyete) ile oldukça zengin bir floraya sahiptir (Davis, 1985, 1988; Güner ve ark., 2000). Bu taksonların 234'ü yabancı kaynaklı ve kültür bitkisidir. Geriye kalan diğer türler ise yurdumuzda doğal yayılış gösteren bitkilerdir (Ekim ve ark., 1989, Erik ve Tarıkahya, 2004). Tüm Avrupa kıtasının yaklaşık 12.000 kadar bitki taksonuna sahip olduğu düşünüldüğünde yurdumuzun bitki örtüsü bakımından nedenli zengin olduğu görülmektedir (Ekim ve ark., 2000). Endemizm (yeryüzünün yalnızca belirli bölgelerinde yayılış gösteren) bakımından da yurdumuz oldukça zengindir. Tüm Avrupa ülkelerindeki toplam endemik takson sayısı yaklaşık 2750 iken ülkemizdeki endemik tür sayısı 2891'dir. Bu sayıya endemik olan 497 alt türü ve 390 varyeteyi dâhil ettiğimizde toplam endemik takson sayısı 3750'den fazladır (Güner ve ark., 2000).

Türkiye'de tıbbi amaçlı değerlendirilen bitkilerin sayısı kesin olarak bilinmemekle birlikte, 500 civarında olduğu tahmin edilmekte; yaklaşık 200 tıbbi ve aromatik bitkinin ihraç potansiyelinin olduğu belirtilmektedir (Baytop, 1999; Ekim ve ark., 2000; Aydın, 2004). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan araştırma sonuçlarına göre, kullanılan ve ticareti yapılan bitkisel drogların sayısının 1.900 olduğu belirtilmektedir (WHO 1979). WHO'nun tahminlerine göre dünya nüfusunun % 80'i, Afrika nüfusunun ise %95'i tıbbi bitkilere dayalı tedavi yöntemlerinden yararlanmaktadır (Başer, 1995). WHO, modern tıba destek olacak şekilde, gelişmekte olan ülkelerin geleneksel tedavi yöntemlerinin kullanımının yaygınlaşması ve standardizasyonu için "2001–2005 yılı Geleneksel Tıp Stratejileri" programı başlatmıştır (WHO, 1998). Yine WHO verilerine göre Japonya'da doktorların % 60-70'i hastalarına geleneksel ilaçları tavsiye etmektedir

(WHO, 2002). Çiçekli bitkilerden sadece % 15'i üzerinde kimyasal ve farmakolojik araştırmalar yapılmıştır (Başer, 1995). Yeryüzündeki tüm bitki türleri düşünöldüğünde son derece düşük olan bu oran, bitkilerin, farklı ilaç şekillerinde kullanılmaları için oldukça büyük bir kaynak oluşturduklarını bir kez daha vurgulamaktadır (Tarakçı, 2006). Bütün bu bilgiler göz önüne alındığı zaman, ölkemizin bu konuda büyük bir çalışma potansiyeline sahip olduğu görölmektedir (Kendir ve Güvenç, 2010).

Tıbbi ve aromatik bitkiler grubunda yer alan Lamiaceae ya da diğer adıyla Labiatae (Ballıbabagiler) familyasına ait bitkiler hemen hemen bütün habitatlarda ve yüksekliklerde yetişmekte, Kutuplar'dan Himalaya'lara, Güney Doğu Asya'dan, Hawaii ve Avusturalya'ya, hatta Afrika ve Amerika'ya kadar geniş bir alanda yayılış göstermektedir (Heywood, 1996).

Lamiaceae familyası dünyada yaklaşık 224 cins ve 5600 tür ile temsil edilmekte olup, en yoğun bulunduğu bölge Akdeniz havzasıdır (Hickey ve King, 1997). Türkiye, Lamiaceae familyası için önemli gen merkezlerinden birini oluşturmaktadır. Ölkemizde bu familya 45 cins, 565 tür ve toplam 735 takson ile temsil edilmektedir (Güner ve ark., 2000). Familyaya ait bitkilerin çoğu tıbbi ve aromatik özellikte olup, insanlarda çeşitli fizyolojik etkilere sahip olmaları nedeniyle eski çağlardan beri gerek halk ilacı olarak; gerekse ilaç, gıda, parfümeri ve kozmetik endüstrisinde kullanılan bitkilerdendir. (Baytop, 1983; 1997).

Türkiye'de "kekik" olarak tanımlanan ve bu amaçlar doğrultusunda kullanılan *Lamiaceae* familyasından pek çok aromatik bitki türü bulunmaktadır. Ancak özellikle timol/karvakrol tipi uçucu yağ içeren türler "kekik" olarak kabul edilmektedir. Karvakrol ve timol içeriği kekikte fiyatı belirleyen parametrelerdir. Bu türler arasında özellikle *Thymus* (57 takson), *Origanum* (31 takson), *Satureja* (14 takson), *Thymbra* (4 takson) ve *Coridothymus* (1 tür) cinsleri hem yayılış olarak hem de ekonomik olarak büyük önem taşımaktadır (Başer, 1994).

Bu türlerin bazıları doğadan doğal olarak toplanırken bazılarının ise tarımı yapılabilir. Kekik olarak ihraç edilen bu türlerin bir kısmını da *Satureja* türleri oluşturmaktadır. Türkiye'de ticareti yapılan kekik türleri arasında önemli bir yeri olan *Satureja*'ların 15 türü bulunmaktadır (Tümen ve ark., 2000).

Türkiye'de bulunan 15 türün 5 adedi endemiktir. Endemizm oranı % 33,4' tür. Türkiye'nin hemen hemen her bölgesinde bu cinsin üyelerine rastlanabilmektedir. Türkiye'de hibrit orijinli taksona henüz rastlanmamıştır (Sadıkoğlu, 2005).

Tablo 1. Türkiye’de yetişen doğal *Satureja* taksonları (Sadıkoğlu, 2005)

-
1. *S. thymbra* L.
 2. *S. cuneifolia* Ten.
 3. *S. cilicica* P.H.Davis (E)
 4. *S. amani* P.H.Davis (E)
 5. *S. wiedemanniana* (Avé-Lall.) Velen. (E)
 6. *S. parnassica* Heldr. & Sart. ex Boiss. ssp. *sipylea* P.H.Davis (E)
 7. *S. spinosa* L.
 8. *S. coerulea* Janka
 9. *S. spicigera* (C.Koch) Boiss.
 10. *S. boissieri* Hausskn. ex Boiss.
 11. *S. macrantha* C.A.Mey.
 12. *S. aintabensis* P.H.Davis (E)
 13. *S. hortensis* L.
 14. *S. pilosa* Velen.
 15. *Satureja icarica* P.H.Davis
-

(E: endemik)

Satureja türleri, halk arasında; yaygın olarak Kekik, Sivri kekik, Kılıç kekik gibi adlarla bilinmekle beraber, Keklik otu, Sater, Kara kekik, Çatli, Süpürge kekiği, Çibriska, Çubriza, Trabzon kekiği ve Arı kekiği gibi yöresel adlarla da bilinmektedirler (Tablo 2) (Satıl ve ark., 2002).

Satureja türlerinin ticareti, özellikle Ege ve Akdeniz Bölgesinde yoğunlaşmaktadır. Ancak, ticareti yapılan *Satureja* türleri, bunların yayılış alanları ve popülasyonlarının doğadaki durumları hakkında yeterli bilgi yoktur (Satıl ve ark., 2002).

Tablo 2. Ticareti yapılan *Satureja* L. türlerinin yöresel adları (Satıl ve ark., 2002)

Tür adı	Yöresel adı
<i>Satureja cuneifolia</i>	Kekik, Sivri kekik, Kılıç kekik, Yayla kekiği, Dağ kekiği, Arı kekiği
<i>Satureja wiedemanniana</i> (?)	Kekik, Sivri kekik, Kılıç kekik, Yayla kekiği
<i>Satureja thymbra</i>	Sahil sivrisi, Kara kekik, Girit sateri
<i>Satureja hortensis</i>	Kekik, Süpürge kekiği, Çibriska, Çubriza
<i>Satureja cilicica</i>	Kekik, Sivri kekik

Kültür kekiği yetiştiriciliği ya vejetatif (çelikleme) olarak ya da generatif (tohumla) olarak yapılmaktadır. Bitki toplama işi genellikle orak veya bıçkı kullanarak bitkinin dipten yaklaşık 5 cm yukarıdaki toprak üstü aksamaları, yaprak ve çiçekli dalları biçilerek yapılır. Sonra arazide uygun olan bir düzlükte yere serilen naylon sergiler üzerinde birkaç gün kurutulur. Kurutma işlemi bittikten sonra sapları ayrılarak geniş delikli bir elekten geçirilip yabancı maddelerden temizlenir ve sanayi tesislerine satılır. Sanayi tesislerinden ya yaprak olarak pazarlanırlar ya da işlemde geçirilerek maddi değeri yüksek kekik yağı, kekik suyu gibi ürünler haline dönüştürülmektedir. Sanayi tesislerinde elde edilen bu ürünler baharat, gıdaların saklanması amacıyla koruyucu ürün ve çay olarak kullanılmaktadırlar. Aynı şekilde kekikten çıkarılan uçucu yağlar ve fenolik bileşikler; tıp, eczacılık ve parfümeri sanayinde, zararlılarının kontrolünde ve yabancı otlarla mücadelede kullanılmaktadır. Son yıllarda kekik çiçekli halde yoğun bir şekilde toplanması ve ticaretinin yapılması, şu anda bitkiye zarar vermemekte gibi görünse de tohum vermesini etkilemektedir. Bu durum tohumların çimlenip yeni bitkiler vermesine olanak sağlamamaktadır. Bununla birlikte kekik bitkisinin biyolojik ömrü 5-6 yıldır ve aynı bitkiden alınan verim yıl geçtikçe düşmektedir. Bu verim düşüklüğü de kekik ve işlenmiş kekik ürünlerinden yeterli derecede faydalanılmasını güçleştirmektedir (Satıl ve ark., 2002).

Bu saydığımız dezavatajlar hali hazırda bitki biyoteknolojisinin ana unsuru olan doku kültürleri ve mikroçoğaltım yöntemleri kullanılarak giderilebilir. Bu yöntemlerle yetiştirilecek olan kekik bitkileri yılın 12 ayı boyunca elde edilebilir ve anında taze veya kurutulmuş baharat olarak, uçucu yağ ve beraberinde yağ altı suyu olarak elde edilecek saf ve kaliteli kekik suyu değerlendirilebilir. Ayrıca doku kültürü çalışmaları esnasında

“kendiliğinden” ya da manüplasyonlarla mutant hatlar elde edilebilir. Bu hatların uçucu yağ kalitesi ve verimi yüksek olabilir (Schenk ve Hildebrandt, 1972).

Biyoteknolojinin kullanımı çok eski zamanlara uzanmaktadır, ilk kez Sümerler tarafından bira ve ekmek yapımında mayaların kullanılmasıyla başladığı bilinmektedir (Krishna ve Reddy, 2005). Biyoteknoloji tanım olarak kısaca; canlı organizmaların belirli amaçlar doğrultusunda teknolojide kullanılması anlamına gelmektedir. Günümüzde biyoteknoloji; mikroorganizma, hücre, doku, organ vb. biyolojik yapıların insan yararına değiştirilmesi, kullanılması ve çoğaltılması üzerine çalışan bilim dalı olarak da tanımlanabilir. Tarımsal biyoteknoloji çalışmalarının temelini ise doku kültürü yöntemleri oluşturmaktadır.

Bitki doku kültürü teknikleri uygulama alanları bitki biyoteknolojisi çalışmalarının da önemli bir bölümünü oluşturmaktadırlar. *In vitro*'da, birçok otsu ve odunsu bitki türü kültüre alınabilir ve bu bitki kültürlerinin bilimsel uygulamaların yanında ticari uygulamaları da yapılabilmektedir (Babaoğlu vd., 2001).

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyasyonu oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır (Babaoglu ve ark., 2001)

Bitki doku kültürü, bitki besin elementleri, vitaminler, su, katılaştırıcı ve gerekli durumlarda bitki büyüme düzenleyicileri eklenen ağzı kapalı ışık geçirebilen steril kaplarda, sterilize edilmiş bitki materyalinin, steril kabin altında bu kaplara yerleştirilerek yetiştirilmesi işlemidir. Doku kültürü yöntemi steril koşullarda, sürekli ve aynı genetik yapıya sahip bitkilerin üretimidir (Ahloowalia vd., 2002).

Bitkinin gelişmesi için en uygun çevre şartları (pH, ışık, sıcaklık ve nem) ve istenmeyen mikrobiyal gelişimler kontrol altında olmalıdır. Bitki doku kültürü farklı yöntemler altında toplanmaktadır. Eksplant adı verilen yeni bitkiyi oluşturacak bitki parçasının ana bitkinin hangi kısmından alındığına, üretilecek formuna ve gelişim

safhalarına göre (meristem, organ, anter, ovül, kallus, hücre, protoplast, somatik embriyogenesis vb. kültürler) farklı yöntemlerle isimlendirilir.

Doku kültüründe en yaygın ve etkili olarak kullanılan yöntem meristem kültürüdür. Meristem kültürü, bitkilerin büyüme konileri bulunan koltuk altı ya da tepe sürgünlerinin eksplant olarak kullanılarak yapıldığı çoğaltım tekniğidir (Turhan, 1997). Bitkisel üretimde meristem kültürü yönteminin kullanılmasının diğer yöntemlerden üstün yanı somoklonal varyasyon riskinin daha az olması yanında daha kolay ve ucuz bir yöntem olmasıdır. Organ kültürü, bitkiden elde edilmek istenen etken maddenin yoğun olduğu kök,sürgün gibi organların, bitki büyüme düzenleyicileri yardımıyla diğer organlar olmadan, üretildiği doku kültürü yöntemidir. Organ kültürü ile metabolit üretimine en fazla üzerinde durulan örnek genetik stabilite ve yüksek üreme katsayısına sahip olması nedeniyle; kök oluşumuna neden olan *Agrobacterium rhizogenes* bakterisi yardımıyla olanıdır (Giri ve Narasu, 2000). Kök oluşumuna neden olması dolayısıyla kök oranını arttırarak kökte yer alan ikincil metabolit üretiminde artış sağlamaktadır. Ayrıca farklı uygulamalarla da kök oranının artırılması üzerine çalışmalar da yapılmaktadır (Suresh vd., 2005; Savitha vd., 2005). Tekstil ve kozmetik sanayisinde kullanılan *Alkanna tinctoria* bitkisinde alkannin ikincil metabolizma ürününü üretmek amacıyla (Gerardi vd., 1998) olgunlaşmamış tohumlarla başladıkları 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) büyüme düzenleyicili MS ortamında iki farklı kök kültürü hattına ulaşmışlardır. Alt kültüre aldıkları kök kültürlerinde en yüksek alkannin seviyesine alt kültürden 6 gün sonra, 2,4-D büyüme düzenleyicili, katılaştırıcısız ve amonyum tuzsuz ortamda ulaşılmıştır. Kallus kültürü, yara dokusu oluşturularak bu dokuların üretildiği doku kültürü yöntemidir. Organ oluşumunun gerçekleşmediği, farklılaşmanın olmadığı, yara dokularına kallus denilmektedir. Oksin ve sitokin grubu büyüme düzenleyici miktarlarının dengelendiği durumlarda oluşan kallus hücreleri sürekli bir çoğalma eğilimindedir ancak etken fitokimyasal içerikleri bütün bitkide bulunan miktardan daha düşüktür (Bourgand vd., 2001). Bu nedenle kallus kültürüyle biyoelementlerin üretilmesi düşünülmez. Kallus kültürü, süspansiyon kültürünün başlangıcı ya da organ oluşumuyla seri üretimin amaç edinildiği bir geçiş kültürüdür. Hücre süspansiyon kültürü, üretilen kallus hücrelerinin serbest forma geçirilerek sıvı besi ortamına yerleştirilip sürekli çalkalama yoluyla ortam içinde homojen dağıtılmasıyla üretilmesidir (Hartmann vd., 2002). Böylece hücreler çoğaldıkça hücrelerin ürettiği ikincil metabolitlerin üretimi gerçekleştirilebilir, diğer yandan da sıvı ortamın her

damlasında hücre bulunması sebebiyle yeni bitki geliştirilmesi için eksplantlar yerine bu sıvı kullanılabilir.

Kallus kültüründe olduğu gibi süspansiyon kültüründe de ikincil metabolizma ürünlerini arttıracak koşullar sağlanmalıdır. Hücre kültürünün bir sonraki aşamasında gen transferi ve somatik melezleme çalışmaları da uygulanabilmektedir. Hücre süspansiyon kültürünün otomasyon sistemlerle kontrol edildiği yetiştirme ortamına biyoreaktör denilmektedir. Karıştırıcılarla sirkülasyon sağlanarak, eksilen bitki besin elementleri, vitamin ve büyüme düzenleyiciler bilgisayarlı sistemlerle biyosensör adı verilen mekanizmalar ile besin elementleri, pH, sıcaklık vb. otomatik olarak kontrol edilerek ilave edilir. Bitki hücrelerinin ilk olarak biyoreaktör benzeri yapıdaki bir cihazda alt kültüre alınışı 1950 yılında Nickell ve Burkholder isimli iki araştırmacı tarafından yapılmıştır (Caplin, 1963).

Mikroçoğaltım; *in vitro* koşullarda bitki üretimi anlamına gelir. Genel anlamıyla ise mikroçoğaltım; bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen tanesi vb.) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanmaktadır (Mansuroglu ve Gürel, 2001). Eğer bitkilerin uygun besin maddeleri ihtiyaçları, hormon ve kültür istekleri yeterince biliniyorsa, mikroçoğaltım tekniği kullanılarak tüm bitki türlerinin üretilmesi mümkündür (Hartman ve Kester, 1975).

Mikroçoğaltım bitki yetiştiriciliği ve genetiği yönünden önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu avantajlar; hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal elde edilmesi, kitlesel üretimde üretilen bitkilerde fenotipik ve genotipik benzerlik (homojenite) olması, alışlagelen yöntemlerden daha kısa kültür süresine ihtiyaç duyulması, zor üretilen türlerin daha kolay üretimi, seçilen belirli/üstün genotiplerin hızlı üretimi, üretimde daha az verici (donör) kullanılması gibi yararları ve somoklonal varyasyonlardan dolayı yeni çeşitlerin elde edilmesi şeklinde sıralanabilir. Ayrıca kısa sürede fazla bitkinin elde edilebilmesi de diğer bir avantajdır (Mansuroglu ve Gürel, 2001).

Başarılı bir mikroçoğaltım 5 aşamada gerçekleşmektedir; 1) hazırlık aşaması, 2) kültür başlangıç aşaması, 3) sürgün çoğaltım aşaması, 4) sürgünlerin köklendirilmesi ve 5) bitkilerin dış ortam koşullarına alıştırılması (Debergh ve Read, 1993).

Hazırlık aşaması, esas olarak bulaşma problemlerinin en aza indirilmesi amacıyla verici (donör) bitkinin aseptik koşullarda yetiştirilmesini kapsamaktadır. Bulaşmayı önlemek için doku kültürünün ilk aşaması sayılan sterilizasyon üzerinde önemle durmak

gerekmektedir. Ortamdan ve eksplantlardan gelebilecek bulaşmayı önlemek için çok iyi bir sterilizasyon işlemi oluşturulmalıdır (Hu ve Wang, 1983). Verici (donör) bitkinin vejetatif gelişme evresinde olması mikroçoğaltımda başarıyı etkileyen etkenlerden bir diğeridir. Kültür için sürgün gelişiminin hızlı olduğu ve aktif büyümenin bulunduğu dönemler seçilmelidir. Mikroçoğaltımın başarısı eksplantların alındığı verici (donör) bitkinin genotipi, sağlık durumu ve yetiştirme koşulları (beslenme, ışık, sıcaklık, bitki büyüme düzenleyicilerinin uygulanması, yetiştirme mevsimi) ile doğrudan ilişkilidir.

Kültür başlangıç aşaması, eksplant seçimi ve sterilizasyonu, kültür ortamlarının seçimi ve kültürün yürütüleceği çevresel koşulların belirlendiği aşamadır. Mikroçoğaltımda çoğunlukla eksplant olarak tepe (apikal) ve koltuk altı (aksiller) tomurcukları seçilmekle birlikte, farklı organlar da eksplant olarak kullanılmaktadır. Örneğin, 2-3 mm büyüklüğündeki kök parçaları (Huang ve Chu, 1987), sürgün ucu (Mariska vd., 1991), yaprak, yaprak sapı ve çiçek sapı parçaları (Chu and Huang, 1983; Schwenkel ve Grunewaldt, 1988), rizomların terminal ve lateral uçları (Pierik vd., 1988), yaprak ve gövde eksplantları (Nakano vd., 1999), soğan pulları ve yaprakları (Pelkonen ve Kauppi, 1999; Tıprıdamaz vd., 1999; Çakırlar vd., 2000; Tıprıdamaz, 2003) başarıyla kullanılmıştır.

Werbrouck ve Debergh (1994) eksplant seçiminde uyulması gereken bazı özelliklere dikkat çekmektedirler; bitkilerin toprak üstü kısımları toprak altı kısımlarından, bitki iç parçaları bitki dış parçalarından daha az kontamine edilir. Eksplantın rejenerasyon yeteneği büyüklüğüne ve fizyolojik yaşına bağlıdır. Eksplantlar gelişme mevsiminin başlangıcında aktif büyüyen sürgünlerden alındığında başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Verici (donör) bitkinin yetiştirme ortamındaki ışık ve sıcaklık koşulları, beslenme durumu ve yaşı eksplantın büyüme ve gelişme başarısını etkilemektedir.

Araştırmacılar, sürgün büyüklüğünün de önemli olduğunu ve sürgün ucundan alınan eksplantın virüssüz olacak kadar büyük, rejenerasyon yeteneğini yitirmeyecek kadar küçük olması gerektiğini vurgulamaktadırlar. Terminal tomurcuk içeren çelikler ve bütün tomurcuk, 0,5-1 mm'lik sürgün uçlarına nazaran daha yüksek oranda kontamine olmaktadır. Küçük sürgün ucu eksplantlar düşük canlılık oranına ve başlangıçta yavaş gelişme özelliğine sahip olmakla birlikte, virüslerle kontrol edilen bazı karakterleri yok etmektedir (Bhojwani ve Razdan, 1983).

Mikroçoğaltımda kullanılan eksplantlar aseptik koşullara konulmadan önce tam anlamıyla sterilize edilmelidir. Sterilizasyon yöntemleri verici (donör) bitkinin yetiştiği

ortamın özelliklerine ve eksplantın alındığı organa göre farklılık göstermektedir. Kullanılacak dezenfektan maddenin cinsi, derişimi ve uygulama süresi sterilizasyonun başarısını etkilemekte ve bitki türüne göre değişmektedir. Ayrıca bitki dokularının zarar görmemesine dikkat edilmelidir (Babaoglu vd., 2001).

Her bitki türü için kullanılan besin ortamları benzer maddeleri içermektedir. Bunlar, inorganik maddeler (makro ve mikro elementler), organik maddeler (myo-inositol, tiamin-HCl, adenin sülfat, pridoksin-HCl, nikotinik asit), bitki büyüme düzenleyicileri (sitokininler, oksinler, gibberellinler) ve şeker, agar gibi diğer maddelerdir. Fakat kültür amacına ve bitki özelliğine bağlı olarak ortam bileşiminde ve derişimlerinde değişiklik olabilmektedir (Scholten ve Pierik, 1998).

Babaoğlu vd., (2001) günümüzde en çok kullanılan yapay besi ortamının, 1962 yılında Murashige ve Skoog tarafından geliştirilen Murashige Skoog (MS) ortamı olduğunu belirtmişlerdir. 1962 yılında yine Murashige ve Skoog tarafından tütün bitkisi için geliştirilen yüksek tuz içerikli MS ortamının ise özellikle düşük yoğunluklarda birçok bitki türünde köklendirme çalışmalarında kullanıldığını rapor etmişlerdir. Gamborg-Bazal Tuz 5 ortamı (G B5) ise, Gamborg tarafından 1968 yılında, soya kallus kültürleri için geliştirilmiş, nitrat azotu yüksek bir ortamdır. Linsmainer-Skoog (LS) ortamı, Linsmainer ve Skoog tarafından 1965 yılında geliştirilmiştir ve MS ortamının organik bileşikler bakımından farklı bir versiyonudur.

Kültür odasındaki ışık, sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörler bitki türlerinin isteğine göre değişmekle birlikte 18-28 °C arasında fakat çoğunlukla 23 °C sıcaklık, 16 saat ışık 8 saat karanlık fotoperiyot, genellikle 30 μ mol. m⁻². sn⁻¹ ışık ve çoğunlukla beyaz floresan lambalar optimum koşullardır (Werbrouck ve Debergh, 1994; Mansuroglu ve Gürel, 2001).

Sürgün çoğaltım aşaması, genel olarak başlangıç için kullanılan ortamlar çoğaltım aşamasında da kullanılmakla birlikte, bazı durumlarda değişiklik yapılabilmektedir. Bitki dokularından organ farklılaşmasında oksin ve sitokininler önemli rol oynamaktadır. Sitokinin/oksin oranının yüksek olması sürgün oluşumunu, oksin/sitokinin oranının yüksek olması kök oluşumunu, oksin ve sitokinin aynı miktarda kullanılması ise kallus oluşumunu desteklemektedir. 6-benzil amino pürin (BAP) çok sık kullanılan ve genellikle olumlu sonuçlar veren bir sitokininidir. Genel olarak 1-2 mg/L sitokinin çoğu sistemde yeterlidir. Yüksek düzeyler, adventif sürgün oluşumunu artırma eğilimindedir. Thidiazuron (TDZ) düşük derişimlerde (0,05-1,0 mg/l) etkili olduğu için umut veren bir sitokininidir. Indol-3-asetik asit (IAA) ortamda çok az stabil olduğundan, sentetik oksinlerden naftalen asetik

asit (NAA) ve indol-3-butirik asit (IBA) tercih edilmektedir. Bunların sürgün çoğaltım aşamasında kullanılan oranları 0,1-1,0 mg/L'dir. Kallus oluşumunu artırma eğiliminde olan 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D)'in kullanımından ise kaçınılmaktadır (Werbrouck ve Debergh, 1994).

Bitkilerin çok hızlı çoğaltılması onların totipotensi (tek hücreden yeni bir birey oluşturma) özeline bağlıdır. Kültüre alınan hücrelerden bitkilerin farklılaşması sürgün-kök oluşumu ya da somatik embriyogenesis ile meydana gelir. Kallustan sürgün çoğaltılması yöntemi ile bitkilerin klonlanmasında bazı sakıncaları vardır: Bu sakıncaları hücrelerin stabil olmaması, poliploid ve anöploid bitkiler meydana gelmesi ve bir çok tür için uygulanmaz oluşudur. Ayrıca dokunun başlangıçtaki bitki rejenerasyon kapasitesi zamanla alt kültürlerde azalmakta ve sonunda yok olmaktadır.

Yaprak koltuk altı (aksiller) ya da sürgün tepelerinin (apikal) dışında herhangi bir yerde oluşan tomurcuklar adventif tomurcuk olarak adlandırılır. Kalluslardan sürgün farklılaşması da adventif tomurcuk olarak ele alınmasına rağmen, bu tomurcuklar kallus evresine gerek kalmadan doğrudan bir organ ya da organ parçasından da oluşabilmektedir. Bitki türlerinin klonal üretiminde organlardan doğrudan adventif sürgün oluşumu kallus yönteminden daha iyi sonuçlar vermektedir. Doğrudan bir organ ya da organ parçasından oluşan adventif tomurcuklar (sürgünler) tek düze diploid bireyler oluşturmaktadır.

Aksiller tomurcuklar genellikle yaprak koltuklarında bulunur ve her tomurcuk bir sürgün geliştirme potansiyeline sahiptir. Mikroçoğaltımda, aksiler dallanmayla sürgün çoğalmasının arttırılması uygun derişimde ve tipte sitokininin içeren (oksinli ya da oksinsiz) besin ortamlarında yapılır. *In vitro* şartlarda oluşan sürgünler taze ortamlara aktarılarak aksiller dallanma ile sürgün çoğalması sürdürülebilir.

Aksiler dallanma ile sürgün çoğaltımı, kallustan sürgün oluşumu veya doğrudan adventif sürgün oluşumuna göre başlangıçta daha yavaştır. Fakat her alt kültürde sürgün sayısı logaritmik olarak artarak bir yıl içinde astronomik rakamlara ulaşmaktadır. Bu yöntemin klonal çoğaltımda ticari olarak yaygınlaşmasının bir diğer nedeni ise sürgün ucu hücrelerinin tek düze diploid olması ve kültür koşulları altında genotipik değişikliklere çok az yatkın olmasıdır.

Aksiller dalları kullanılarak yapılan mikroçoğaltımda ana bitkiden alınan tek boğumlu gövde veya dal segmentleri sterilizasyona tabi tutulduktan sonra besin ortamında kültüre alınır. Ortamdaki büyüme düzenleyicilerinin etkisiyle, aksiler tomurcuklar bir veya birden fazla sürgün meydana getirir. Daha sonra tekli sürgünler ayrılarak taze sürgün

çoğaltım ortamına aktarılır ve burada 3-4 hafta içerisinde birçok yeni sürgün elde edilir. Yeterli sayıda sürgün elde edildikten sonra bunların bir kısmı ile çoğaltım işlemi devam ettirilirken diğer bir kısmı köklendirme ortamına aktarılır. Yeterli kök sistemi geliştikten sonra, bitkiler iyi drene olmuş saksı toprağına aktarılır ve ilk 10-15 gün boyunca yüksek nem altında tutulur (Bhojwani ve Razdan, 1983).

Köklendirme aşaması, tam bir bitki oluşturmak için sürgünler, sürgün oluşturma ortamından farklı bir hormonal kompozisyona sahip olan yeni bir ortama aktarılmaktadır. Sürgünler belli bir uzunluğa eriştikten sonra köklenme ortamına alınır. Türlerin çoğunda köklenmenin desteklenmesi için NAA ya da IBA (0,1-1,0 mg/L)'e gereksinim duyulur. Makro ve mikro tuzların derişimi ve uygulama zamanı bu yöntemin başarısını belirler. Yüksek şeker derişimi (% 3-4) köklenmeyi ve bitkilerin kalitesini artırır. Adventif ve aksiller sürgün gelişimi ortamlarında sitokininin varlığı köklenmeyi engellemektedir (Mansuroglu ve Gürel, 2001).

In vitro doku kültürü tekniklerinin, bitki üretimi ve ıslahında kullanılabilir olabilmesi için, kültüre alınan hücre veya dokulardan yüksek oranda embriyo gelişiminin sağlanması gerekmektedir. Bununla birlikte doku kültürlerinde embriyo gelişimini etkileyen faktörlerin de (ortamın bileşimi, ışık ve ısı dereceleri, kullanılacak doku tipi, ortam içerisindeki hormon kombinasyonu) neler olduğu kesin olarak bilinmelidir (Murashige ve Skoog, 1962; Thorpe vd., 1991).

Bitki hücrelerinden embriyo elde etmek sadece döllenmiş yumurta hücresi ile sınırlı değildir. Bunun için *in vitro* kültür şartları ve özellikle de bitki büyüme düzenleyicileri ayarlanarak, bir bitkinin herhangi bir somatik hücresinden, dokusundan ve organından embriyo elde etmek mümkündür. Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar somatik embriyo olarak isimlendirilirler. Somatik hücreleri öncelikle yüksek oranda oksin içeren ortamlarda kültüre alır, daha sonra da oksin içermeyen yeni bir ortama aktarırsa, embriyo üretme yeteneğı kazanmış olurlar. Oksin hormonlarının, somatik bitki hücrelerine embriyo üretimi için yeniden zigotik bir kapasite kazandırdıkları bilinmektedir (Monnier, 1990).

Somatik ve zigotik embriyogenez arasında önemli farklılıklar vardır. Bu farklılıklar, iki embriyogenez oluşumunun elde edilmiş şekliinden dolayı meydana gelmiştir. Zigotik embriyo döllenmiş bir zigottan geliştiğı için, elde edilen bitkiler potansiyel olarak açılma yeteneğıne sahiptirler. Diğer taraftan, bireysel bitkilerin hücrelerinden geliştikleri için somatik embriyolardan elde edilen bitkiler, genetik olarak bir klon meydana getirirler (Bourman, 1994). Döllenmiş yumurtadan gelişen embriyoda olduğu gibi, aynı şekilde iki

çenekli bitkilerdeki somatik embriyolar da globular, kalp, torpido ve kotiledon oluşum safhalarını geçirmektedirler. Ayrıca somatik embriyolar, organogenez yoluyla gelişen sürgünlerden de farklılık göstermektedirler. Gövde- kök eksenine aynı zamanda sahip olup, asıl doku ile vasküler bağlantıları olmadığından dolayı dokudan kolaylıkla ayrılabilirler (De Jong vd., 1993).

Somatik embriyogenez çalışmaları, bitkilerin klonal hızlı çoğaltımında, sentetik tohum üretiminde ve gen aktarım çalışmaları gibi önemli alanlarda kullanılmaktadırlar. Bununla birlikte, eksplant kaynağı, genotip, bitki büyüme düzenleyicileri, azot kaynağı ve çevre şartları gibi etmenler somatik embriyogenezde önemli ölçüde etkileyen temel faktörler arasındadırlar (Babaoğlu vd., 2001). Doku ve hücre kültürü çalışmaları esnasında somaklonal varyasyonlar oluşabilmektedir. Somaklonal varyasyon somatik doku kökenli kallus, hücre ve protoplast kültürlerinden rejenere olan bitkiler arasında ortaya çıkan genetik kökenli değişkenliktir (Evans, 1988). Bu değişkenlik bitkilerde morfolojik, fizyolojik ve tarımsal özellikler şeklinde gözlenebilir (Bajaj, 1985; Karp, 1990; Yıldırım, 1991). Somaklonal varyasyon laboratuvar koşullarında oluşturulduğu için başlangıçta tarla ve sera koşullarında karşılaşılan zorluklar ve çoğaltım sorunlarından uzaktır. Ayrıca küçük kapalı alanlarda kısa sürede çok sayıda hücre ve daha sonra bitkilerin yetiştirilmesi ve biyokimyasal yöntemlerle değerlendirilme ve seçim işlemlerine imkan sağlar. Yine de laboratuvar koşullarında seçilen bitkilerin tarla denemelerinde gözlenmesi gerekmektedir.

Bitkilerin dış ortam koşullarına alıştırılması aşaması; steril koşullarda, düşük ışık yoğunluğunda, yüksek nem içeren ve tüm besin maddelerinin bulunduğu bir ortamda geliştirilen bitkilerin, daha düşük nem, daha yüksek ışık düzeyi ve steril olmayan koşullara sahip dış ortama aktarılması çok dikkat isteyen bir işlem olup, bunun aşamalı olarak yapılması gerekmektedir. *In vitro* koşullarda gelişen köklenmiş bitkicikler dikkatli bir şekilde dış koşullara aktarılmalı ve yüksek nem (% 90-100) sağlanmalıdır. Aşamalı olarak saksıların üzerine yerleştirilen cam kaplar açılarak hava sirkülasyonu sağlanmalı daha sonra seradaki özel alanlarına alınmalıdır (Preece ve Sutter, 1993).

Bitkiler doğal yaşam ortamlarında çok çeşitli düşmanlarla kuşatılmış durumdadır. Bitkilerin, düşmanlarından kaçmak için yer değiştirmeleri söz konusu olmadığına göre, birtakım özel savunma mekanizmaları geliştirmek zorundadırlar. Bunlardan birisi de ürettikleri özel kimyasallardır. İnsanoğlu ise, bu özellikten faydalanarak, tarihin ilk yıllarından günümüze kadar çok sayıda bitkiyi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanmıştır. Bu yaklaşım *etnofarmakoloji* adı verilen bir disiplinin oluşmasına yol açmıştır. Özellikle

bitkilerin iyileştirici etkilerinin bulunduğu inancı insanlığın çok eski devirlerine kadar gitmektedir. Erişilebilen ilk yazılı kaynaklardan elde edilen bilgilere göre ilk insanlar, çeşitli hastalıkların tedavisi için bitkilerden yararlanmışlardır. Kullanım biçimleri ise asıl etken madde olan doğal ürünlerden çok, bitkinin kendisine veya değişik yollarla elde edilen özütlerine dayanmaktaydı (Tepe, 2002; Ceylan, 1995). Yontmataş (paleolitik) çağından (M.Ö. 50000–7000) günümüze kadar Anadolu’da yaşamış olan “Anadolu insanı” çevresindeki bitkilerden yararlanmıştır. Bunları gıda, yakacak, silah, ilaç veya mesken yapımı için kullanmıştır. Hakkâri’ nin güneyinde yer alan Sanidar Mağarası’nda ortaya çıkartılan 50000 yıllık Neanderthal mezarı içinde bulunan ve halen bu bölgede, tıbbi amaçlı kullanılan bitki örnekleri (*Achillea*, *Alchemilla*, *Althea*, *Centaurea*, *Ephedra*, *Muscari* ve *Senecio* türlerine ait örnekler) bu varsayımın sağlam kanıtlarındandır (Baytop, 1980; Lietava, 1992; Baytop, 1997). Tüm dünyada bitkisel ilaçlarla tedavi giderek artmakta ve şimdiye kadar görülmemiş bir popülerite kazanmaktadır (Teixeira vd., 2003) Bu uygulama özellikle gelişmiş ülkelerde daha yaygındır (Çubukçu vd., 2002). Bitkisel ilaçlara yönelmenin başlıca nedenleri:

- Yeterli düzeyde kimya endüstrileri gelişmemiş, kalkınma yolundaki ülkelerin, bitkilerden yararlanarak kolay ve ucuz bir tedavi olanağı elde etmeleri,
- Tedavi alanına sokulan yeni sentetik bileşiklerin bazılarında görülen tehlikeli yan etkiler (bitkisel droglar çok uzun zamandan beri kullanıldıkları için yan etkileri çok iyi bilinmektedir),
- Bazı ilaç etken maddelerinin, bitkisel drogların sentetik olanlardan daha ucuz ve daha kolaylıkla elde edilebilmeleri,
- Bitkisel drogların birkaç etkiye birden sahip olmaları, buna karşın sentetik bileşiklerin ise genellikle tek bir etkiye sahip olmaları,
- Bazı sentetik ilaçların (antibiyotikler gibi) yan etkilerini önleyebilmek için diğer bazı ilaçlarla birlikte kullanılma ihtiyacı göstermeleri (Baytop, 1999).

Günümüzde dünya nüfusunun çoğunluğu için bitkiler, ilaç hammaddesi olarak kullanılmaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde nüfusun % 80’i sağlık gereksinimlerini ilk etapta geleneksel tıbbi bitkilerden sağlamaktadır. Dünya nüfusunun % 80’ inin gelişmekte olan ülkelerde yaşadığı düşünülürse toplam dünya nüfusunun % 64’ ü bitkileri tedavi amaçlı kullanmaktadır. Gelişmiş ülkelerde reçete ile satılan ilaçların yaklaşık % 25’ i bitkisel kökenli kimyasallardır (Farnsworth, 1990).

Önceleri sekonder metabolitler, bitkiler tarafından oluşturulan ve hiç bir işlevi olmayan atık maddeler olarak kabul edilmekteydi. Fakat daha sonra sekonder metabolitlerin; savunma, korunma, ortama uyum, hayatta kalma ve nesillerini sürdürmek için bitkiler tarafından geliştirilmiş karmaşık mekanizmaların kimyasallar olduğu anlaşılmıştır (Philipson, 1990). Bitkisel doğal ürünler birçok ilaç hammaddesi gibi saf ürünlerden besin katkı maddeleri ve kozmetikler gibi karışımlara kadar değişkenlik göstermektedir. Bitkisel ürünlerin yapılarının karmaşık veya zengin oluşu bu metabolitlerin kimya sanayinde hammadde olarak kullanılmasını sağlamıştır.

İlaç sanayinde kullanılan bazı önemli bitkisel kökenli maddeler şunlardır; digoksin (kardiyonik), digitoksin (kardiyovasküler), efedrin (bronş açıcı), kinin, kinidin (sıtma tedavisi), vinkristin, vinblastin, aymalisin (kanser tedavisi) (Fowler, 1982). Thaumatin, safran, gingeroller, geranial ve neral gibi bileşikler tatlandırıcı, koku verici ve koruyucu olarak besin ve gıda sanayinde kullanılan bitkisel kökenli maddelerdir. Gül yağı, lavanta yağı, yasemin yağı, parfümeride kullanılırken; nikotin, anakardik asit, piretrin, sinerin ve yasmolin zirai mücadelede kullanılan maddelerdir. Halk arasında “kocakarı ilaçları” olarak bilinen bitkilerden yeni ilaçlar geliştirilmesinde, etnofarmakoloji biliminin önemli katkısı olmuştur. Vinkristin, vinblastin, rezerpin, kinin ve hatta aspirin, ekonomik ve sağlık açısından bugünkü önemlerini bu araştırmalara borçludurlar (Cox, 1990).

Bitkisel kökenli moleküller tedavide kullanılırken, her maddenin yararlı fizyolojik etkilerinin yanı sıra toksik bir etkisinin de bulunabileceği unutulmamalıdır. Basit bir örnek olarak atropini göz önüne aldığımızda aslında son derece zehirli bir madde olmasına karşın, tedavilerde önemli bir ilaç etken maddesi olarak kullanılmaktadır (Yeşilada, 2002). Bu yüzden bitkisel ilaçların ve uygulamalarını iyi anlayabilmek için onların botaniklerinin, kimyasının, farmakolojisinin, toksikolojisinin ve klinik etkilerinin iyi bilinmesi gerekmektedir (Çubukçu, 2002).

Anadolu’da tarih boyunca bitkilerin yaygın kullanımının nedeni şüphesiz ki bu bölgenin sahip olduğu *fitocoğrafik* özelliklerin bir sonucudur. Çeşitli iklim tiplerinin etkisinde bulunması ve sahip olduğu coğrafik konum, Anadolu’daki flora çeşitliliğinin oluşumunda en önemli etkenlerdir (Başer, 2002).

Özütlerden hazırlanan merhemlerin mikrop öldürücü ve yara iyileştirici etkisi, bitkilerin tedavi edici özellikleri bakımından akla gelen önemli ve tarihi işlevleridir. Truva savaşında yaralanan Aşil ve askerlerinin tedavisi için kullanılan *Achillea* (civanperçemi) türleri için de geçerlidir (Könemann, 1999; Lis-Balchin, 2006).

Yara iyileştirici ve mikrop öldürücü aktivite, büyük ölçüde, kokulu (aromatik) bitkilere dayanır. Bu özellik *aromaterapi* adı verilen tedavinin önemli bir bölümünü oluşturur. Aromaterapi çok çeşitli bedensel ve ruhsal hastalıkların tedavisi için kullanılan tarihi yöntemler bütünüdür ve bu amaçla uçucu yağ içeren bitkilerden yararlanılır.

Uçucu, aromatik yada eterik yağ “oda sıcaklığında sıvı, bazen donabilen, buharlaştığında damlatıldığı kağıt üzerinde leke bırakan ve bitkilerden su buharı veya su distilasyonu ile elde edilen, kokulu karışım” olarak tanımlanabilir (Tanker vd., 1990). Açıkta bırakıldıklarında buharlaşabildiklerinden dolayı “uçucu ya da eterik yağ” adı ile anılırlar. Ayrıca genellikle güzel kokulu olduklarından bunlara “esans” da denilmektedir İlk kez İsveçli Paracelcius von Hohenheim tarafından “*Quintia essentia*” olarak adlandırılmıştır (Guenther, 1948). Ancak uçucu yağın elde edilmesinde kullanılan distilasyon yöntemi yaklaşık 2000 yıl öncesinde, Mısırlılar, Persler ve Hintliler tarafından kullanılmıştır (Başer, 2001). Avrupa da distilasyon yöntemlerinin geliştirilmesi ise Paracelcius’un uçucu yağ tanımıyla başlar (Guenther, 1948).

Bitki kimyasalları arasında yer alan uçucu yağlar uzun yıllardan beri tedavide kullanılan droglar arasında yer almaktadır. Halk tıbbında kullanıma amaçları esas alınarak bu droglar üzerinde yapılan farmakolojik araştırmalar sonucunda biyolojik etkilerinin bazıları bilimsel olarak da açıklanmıştır (Çubukçu vd., 2002). Uçucu yağ farmakoloji de, eczacılıkta, fitopatolojide, tıbbi ve klinik mikrobiyolojide, koruyucu madde olarak da yiyeceklerde kullanılmaktadırlar (Magiates, 2002). Bu özelliklerinden dolayı birçok tıbbi bitki arasına uçucu yağ taşıyan bitkilerde girmiştir. Uçucu yağların iritan (uyarıcı), rubefiyen (deriyi kızartan), nervinatik (sinir yatıştırıcı), antiromatizmal, ekspektoran (balgam söktürücü), antitussif (öksürüğü kesen), diüretik (idrar söktürücü), karminatif (gaz giderici), stomasik (midevi), koleretik (safra sökücü), antihelmentik (solucan düşürücü), antienflamatuar, antiseptik, antibiyotik ve sedatif etkileri tespit edilmiştir (Sakar ve Tanker, 1991; Zeybek, 1985;Ceylan,1987). Çiçekli bitkilerin bulunduğu bazı familyalarda çok sayıda türün uçucu yağ içerdiği iyi bilinmektedir. Önemli uçucu yağ taşıyan familyalar Apiaceae, Asteraceae, Coniferae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Rosaceae ve Rutaceae’ dir (Sakar ve Tanker, 1991; Zeybek, 1985;Ceylan, 1987).

Uçucu yağlar parfüm ve kozmetik, gıda, meşrubat ve ilaç sanayinde ham madde olarak değerlendirilmektedir (Hammer, 1999; Zeybek vd., 2002). Günümüzde uçucu yağların ana etken maddelerinin elde edilip değerlendirilmesi hem bilimsel hem de ekonomik yönden önem taşımaktadır. Uçucu yağ ve bileşenlerinin farmakolojik özellikleri

incelenerek tıp, kozmetik ve endüstriyel alanlarda kullanılabilme olanakları güncelliğini korumaktadır (Kırdağ ve Bağcı, 2000). Aromatik taksonlar içinde yer alan Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Myrtaceae ve Rosaceae gibi bazı familyalara ait türlerde bulunduğu bilinen uçucu yağlar, yaygın olarak çalışma konusu olmuştur (Kırdağ ve Bağcı, 2000).

Lamiaceae türlerinin ürettiği “terpen” sınıfına giren kimyasallar bu bitkilerden elde edilen uçucu yağların ana bileşenidir. Ancak bu bitkilerin ürettiği ekonomik açıdan değerli bileşikler uçucu terpenlerle sınırlı değildir. Uçucu olmayan diterpenler; karnosik asit, karnozol ve türevlerinin güçlü antioksidatif aktivite gösterdiği bulunmuştur. (Frankel vd., 1996).

Fenolik bileşikler adı verilen kimyasallar da bitkilerin ürettiği ve esasen patojen, böcek ve herbivor saldırılarına karşı savunma amaçlı üretilen ürünlerdir (Taiz ve Zeiger, 2002). Labiyatik asit ve diğer fenolik asitler, flavonoidler ve polifenoller; *Lamiaceae* türlerinde sıklıkla rastlanan nutrasötik (besin) ve biyoaktif kimyasallardır (Exarchou vd., 2002; Mastelic ve Jerkovic, 2003).

Fenolik bileşikler fenilalanin aminoasitinden türetilen sekonder metabolitlerin büyük bir grubunu oluşturur (Mann, 1987; Harborne, 1994). Fenolik bileşikler meyvelere ve yapraklara renk katma, böcek çekici veya itici olma, antimikrobiyal hareket, antiviral aktive, zararlı ultraviyole radyasyondan koruma ve otçul hayvanlardan korunma görev yaparlar (Harborne, 1967; Macheix vd., 1990; Harborne ve Williams, 2000). İnsan tüketimi için bir bitkinin potansiyeli değerlendirilirken bu tür bileşiklerin potansiyel antioksidan aktiviteleri ve fenolik bileşimlerine bakılır. Bir bitkinin fenolik bileşimi genellikle bitki türlerine özgüdür ve büyüme iklimiyle değişebilir (Manach vd., 2004). Bazı fenolik bileşikler sinerjik etki olarak adlandırılan karşılıklı etkileşime girerek toplam antioksidan aktiviteyi artırır. Kimyasal olarak, fenolik bileşikler aromatik halkada bir veya daha fazla hidroksil grubuna sahip bileşiklerdir (Harborne, 1967; Macheix vd., 1990; Shahidi ve Naczki, 1995).

Bitkilerde 8.000 'den fazla fenolik bileşik bulunur (Wrolstad, 2005) ve bitkilerdeki başlıca fenolik bileşikler fenolik asitler ve flavonoidlerdir (Macheix vd., 1990; Robbins, 2003). Bitkilerdeki fenolik asitler çoğunlukla hidroksinamik ve hidroksibenzoik asitlerin türevlerinin yerini almaktadır.

Fenolik bileşiklerin pek çoğu bitkilerde vakuoller de yer alır ve genellikle alkoller veya diğer organik çözücülerle özüt edilir. Genellikle bir ekstraksiyon sisteminde fenolik

bileşiklerin depolama sırasında enzimatik bozunma ve polimerazasyona uğrayacağı olasılığından dolayı kurutulmuş veya dondurulmuş halde ekstre edilir (Price vd., 1997). Ekstraksiyon çözücüsü materyale doğrudan eklenir, parçalama ve homojenizasyon yapılarak bulamaç haline getirilir. Bu işlemler sırasında ekstraksiyon oranını artırmak için ultrasonik ortam da yapılabilir. Bunun dışında perkolasyon veya soxlet ekstraksiyonunda kullanılabilir (Cimpan ve Gocan, 2002). Fenolik bileşiklerin çözümlülüğü kullanılan çözücünün polaritesine bağlıdır. Genellikle % 60-80 (v/v) oranında sulandırılmış aseton, etanol, etil asetat veya metanol çözelti karışımları kullanılır. Uygun bir ekstraksiyon sistemi ile birlikte kullanıldığında bu çözelti sistemleri hücre duvarını parçalar. Sulu metanol çözeltileri özellikle fenolik asitler ve flavonoidlerin meyve ve sebzelerden ekstraksiyonu için kullanılmaktadır. Çünkü bu bileşikler metanol çözeltileri içinde oldukça kararlardır. Örneğin, flavon ve flavonollerin metanol içinde + 4°C' de üç aydan daha fazla kararlı kalabildiği rapor edilmiştir (Hertog vd., 1992b).

Sıcak veya kaynayan suda bitkilerden flavonoid ve flavonik asitlerin ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Ekstraksiyon süresi bu bileşiklerin geri kazanım oranlarını etkilemektedir. Bu süre 1 dakikadan 24 saate kadar değişebilir. Antosyaninler genellikle asitlendirilmiş organik çözücü ile özütlenir ve bunun için asetik asit veya triflorasetik asit kullanılır. Asidik ortam daha çok tercih edilen antosyanin kırmızı flavilyum katyon yapısını sağlar ve bu yapı daha fazla çözünür ve kararlardır (Green, R., C., 2007). Düşük derişimlerinden dolayı antosyanin özütleri analiz veya saflaştırma öncesinde evapore yapılması gerekir. Ancak bu işlem sırasında uçucu olan açil ve karbohidrat konjuge antosyanin yapıları özütten kaybedilebilir. Çözücü ekstraksiyonuyla bitkiden çözünebilen fenolik bileşikler ayrılırken bitkiye karbohidrat ve protein ile lignin gibi yüksek moleküler ağırlıkla fenolik bileşikler özütlenemez. Bunu önlemek için sapofikinyasyon olarak adlandırılan ve bitkiyle çözünmeyen fenolik bileşiklerin ester bağlarını kıran bir ön işlem tüm fenoliklerin özütlenmesini olanak sağlar (Robbins, 2003).

Fenolik bileşiklerin ayrılması, saflaştırılması ve belirlenmesi için çeşitli kromatografi teknikleri kullanılmaktadır. (Merken ve Beecher, 2000; Robbins, 2003; Shahidi ve Nacz, 2004). Bunlar; Gaz Kromatografisi (Gas Chromatography, GC) (Dabrowski ve Sosulski, 1984; Liggins, vd., 1998; Tasioula-Maragari ve Okogeri, 2001), Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) (Merken ve Beecher, 2000; Proestos vd., 2005) ve İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography TLC) (Mabry vd., 1970; Azar vd., 1987).

Fenolik bileşiklerin belirlenmesi ve izolasyonu için en yaygın kullanılan teknik HPLC' dir. (Merken ve Beecher, 2000; Maatta vd., 2003; Robbins, 2003). HPLC çevresel, endüstriyel, klinik, adli ve tüketici ürün örneklerinin kalitatif ve kantitatif analizleri için geniş çapta kullanılır. Fenolik bileşikler özütlenme sırasında filtre edilerek doğrudan ters faz HPLC kolonuna uygulanabilir veya jel kromatografik tekniklerle bir ön fraksiyonlama, sıvı-sıvı ekstraksiyonu veya katı faz ekstraksiyonu uygulanabilir. Tek kullanımlılık C18 kartuşları kullanılabilir. Katı faz ekstraksiyonu fenolik asitler ve flavonoidlerin fraksiyonlanması ve temizlenmesi için tercih edilmektedir. Elüsyon sistemleri genellikle ikili sulu asitlendirilmiş polar çözücülerdir: Sulu asetik asit, formik asit, perklorik asit veya fosforik asit iken ikinci çözücü sistemi metanol veya asetonitril gibi daha az polar organik çözücülerdir. Termostatik olarak kolonlar kontrol edilmekte ve sıcaklık oda sıcaklığının biraz üzerinde tutulmalıdır. Genellikle 1 ile 100 ml'lik örnek çözeltileri enjekte edilmektedir (Robbins, 2003).

Fenolik bileşikler UV ışınlarını absorblar ve 190-380 nm aralığında tipik absorpsiyon spektrumlarına sahip oldukları için bir UV detektöründe veya fotodiyod dedektörlerle (Diode Array Detector - DAD) kolayca analiz edilebilir. Oysaki antosyaninler 510 ile 525 nm aralığındaki görünür bölge ışınlarını absorblayan pigmentlerdir. Flavonoidlerin yapısal özellikleri UV görünür bölge spektrumunda belirlenebilir ve bu bölgede ki Band I ve Band II olarak tanımlanan iki spesifik dalga boyunda absorpsiyonları okunabilir. Band II 240 ile 285 nm aralığındaki maksimuma karşılık gelir ve bu absorpsiyonun flavonoidlerde ki A-halkasından kaynaklandığına inanılmaktadır. Diğer taraftan Band I 350 ile 550 nm aralığında olup B-halkasından kaynaklanır. A ve B halkaları arasında çok az veya hiç konjugasyon olmadığından flavonların ve izoflavonların UV spektrumları genellikle şiddetli Band II piklerini gösterirken küçük Band I pikleri oluşur. Bu şekilde iki farklı dalga boyunda çalışan bir detektör sistemi ile yapılan HPLC analizi çok daha güvenli sonuçlar verecektir (Green, R., C., 2007).

1.2. *Satureja spicigera* (C. Koch) Boiss. (Trabzon Kekığı) Hakkında Botanik Bilgiler

Satureja spicigera (C. Koch) Boiss. (Trabzon kekığı, Trabzon'un ilçelerinde sımbara, zımpara, zumbura vb. olarak da adlandırılır). Çok yıllık, otsu, yaklaşık 30-45 cm dallı gövdeye sahip eğik yapılı, çoğunlukla kökleri rizomlarla dağıtılan ve beyaz çiçekli bir

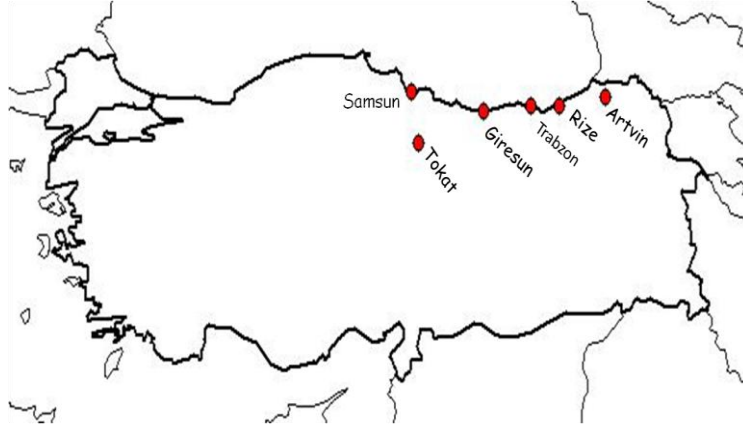
türdür. Bitkiler genellikle Ağustos ve Eylül ayları arasında çiçeklenir. Bu tür; Artvin, Giresun, Rize, Samsun, Tokat ve Trabzon'un 20-1500 m yükseltilerinde geniş yayılış gösterir. Kuraklığa, ağır iklim şartlarına ve soğuğa hassastır (Davis, 1982).

- └ Alem: Plantae
- └ Altalem: Tracheobionta
- └ Bölüm: Magnoliophyta
- └ Sınıf: Magnoliopsida
- └ Altsınıf: Asteridae
- └ Takım: Lamiales
- └ Familya: Lamiaceae
- └ Cins: *Satureja*
- └ Tür: *Satureja spicigera* (C.Koch) Boiss.

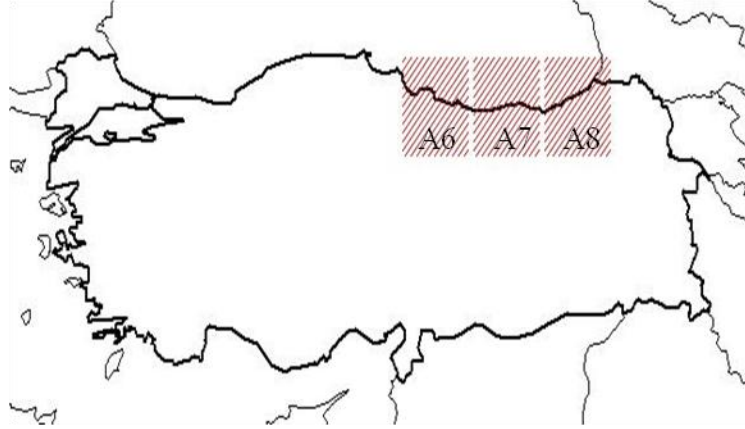
Şekil 1. *Satureja spicigera* (C. Koch) Boiss.' nın taksonomik hiyerarşisi (Türkiye Bitki Veri Servisi, TÜBİVES)



Şekil 2. *Satureja spicigera* (C. Koch) Boiss.' nın ekim ayındaki çiçekli hali (22 Ekim 2011, Maçka/Trabzon)



Şekil 3. *Satureja spicigera* taksonunun Türkiye üzerindeki dağılışı (TÜBİVES)



Şekil 4. *Satureja spicigera* taksonununun karelaj sistemine göre dağılışı (A6, A7, A8; Her bir kare yaklaşık 38.500 km² dir, TÜBİVES)

1.3. *Satureja spicigera* Hakkında Yapılan Önceki Çalışmalar

Satureja spicigera (C. Koch) Boiss.'nın doku kültürleri ile ilgili olarak literatürde yapılan araştırmalarda herhangi bir veriye rastlanmadı. Ancak yakın akraba türlerle yapılmış ve bu tez çalışmasının içeriğine uygun araştırmalar literatürde mevcuttur. Örneğin; "Rozmarinik asitin *Satureja hortensis* L. kallus kültürlerinde üretimi ve optimizasyonu" adlı çalışmada *in vitro* bitki doku kültürleri kullanılarak, ekonomik değeri yüksek rozmarinik asit adlı fenolik bileşik izole edilmiştir (Tepe ve Sökmen, 2004).

1.4. Amaç

Birçok bitkinin *in vitro* doku kültürlerinde çimlendirme, kallus gelişimi, organogenez, somatik embriyogenez denemeleri yapılmış ve bu bitkilerin *in vitro* kültürleriyle yetiştirilen fidelerinin özütlerinden bazı fenolik bileşikler elde edilmiştir. Bu çalışmada da *S. spicigera* bitkisinin doku kültürlerinin yapılabileceği ve ekonomik değeri yüksek bazı fenolik bileşiklerinin tespiti sağlanacaktır. Öte yandan, *Satureja spicigera* bitkisinin doku kültürleri ve fenolik bileşiklerinin tespiti hakkında literatür bilgisi olmadığından bu boşluğun doldurulması amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada (2010-2012) Trabzon/Vakfikebir/Mısırlı Köyü (yükselti 400 m) çevresinde yayılış gösteren *S. spicigera* (C. Koch) Boiss. (Trabzon kekiği) bitkisinin doğadan tolanan tohumları kullanılmıştır.

2.1.2. Kültür Ortamının Hazırlanmasında Kullanılan Besi Ortamları

Çalışmalar boyunca tüm denemelerde Murashige ve Skoog (MS, 1962) ortamı (Sigma), Linsmainer ve Skoog (LS, 1965) ortamı (Sigma), Gamborg B5 (G B5, 1968) ortamı (Sigma) kullanılmıştır. Bu besi ortamlarının içerdiği kimyasallar ve bu kimyasalların miktarları sırasıyla Ek 1, Ek 2 ve Ek 3' de verilmiştir.

2.1.3. Kültür Ortamına İlave Edilen Bitki Büyüme Düzenleyicileri

2.1.3.1. Giberellinler

In vitro köklendirme ve sürgün oluşumunu teşvik etmek amacı ile % 2 sukroz içeren MS ve G B5 ortamlarına ayrı ayrı 1 mg/L (1 ppm) Giberellik Asit 3 (GA₃) ilave edilmiştir.

2.1.3.2. Oksinler

Yetiştirilen bitkiciklerin çoğaltılmasını, kök gelişimini, kallus oluşumunu ve somatik embriyogenezi teşvik etmek amacı ile % 2 sukroz içeren MS, G B5 ve LS ortamlarına, Indol Bütirik Asit (IBA) ve 2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit (2,4-D), sitokininlerle birlikte (Bölüm. 2.1.3.3) farklı derişimlerde ve kombinasyonlarda kullanılmıştır.

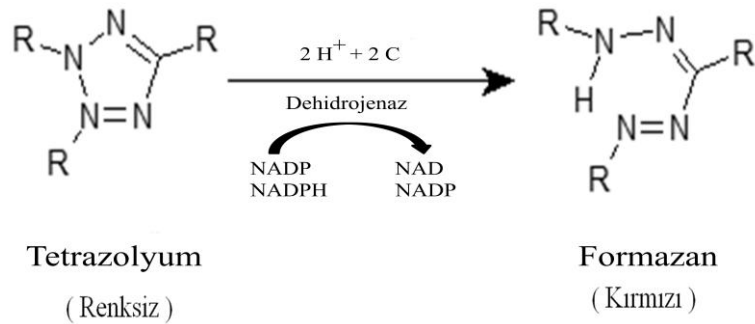
2.1.3.3. Sitokininler

Bu tez çalışmasında çimlendirilen tohumlardan oluşan bitkiciklerin sürgün/kök gelişimini, kallus gelişimini, kallus kütlelerinden dolayı organogenezle yeniden sürgün oluşumunu ve somatik embriyogenezi teşvik etmek amacı ile MS, G B5 ve LS ortamlarına, 6-benzilaminopürin (6-BA veya BAP) ve 6-furfurilaminopürin (kinetin) gibi bitki büyüme düzenleyicileri farklı derişimler ilave edilerek kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Tohumların Canlılık Testi

2,3,5-Trifenil Tetrazolyum Klorit (TTC-Sigma) bileşiği kullanılarak yapılan canlılık testi Tetrazolyum Testi (TZ testi) olarak bilinir. TZ testi kullanışlı ve güvenilir bir testtir. TZ testinin mekanizması, canlı dokuyla olan kimyasal tepkimeye bağlı olarak açıklanmaktadır. TTC bileşiği deiyonize su (dH_2O) ile çözelti oluşturduğunda renksiz bir halde bulunmaktadır, canlı dokularda bulunan dehidrojenaz enzimiyle tepkimeye girdiğinde ise formazan bileşiğine dönüşür (Şekil 5). Bu bileşikten dolayı canlı doku üzerinde kırmızı bir renk oluşmaktadır. Renk oluşuma bağlı olarak uygulama yapılan dokunun canlı ya da cansız olduğu varsayılır (Patıl ve Malavika, 1968).



Şekil 5. Tetrazolyum bileşiğinin dehidrojenaz enzimiyle girdiği kimyasal tepkime (Patıl ve Malavika, 1968)

Yukarıdaki protokole uyularak yapılan çalışmalarda doğal bitki populasyonundan toplanan *Satureja spicigera*' nin tohumları iki farklı muameleden sonra; a) Hidrojen peroksit (H_2O_2) ile sterilizasyondan sonra, b) herhangi bir uygulama yapmadan doğal halleriyle, TTC bileşiği ile canlılıkları test edilmiştir.

Toz halde bulunan TTC bileşiğinden 1 g alınarak 100 mL deiyonize su (dH_2O) ile bir çözelti hazırlandı. İki ayrı gruba ayrılan kekik bitkisinin tohumları; a) H_2O_2 bileşiğiyle steril edilen tohumlar 25'erli 4 gruba ($25*4=100$ tohum), b) tohumlar doğal halleriyle alınarak 25'erli 4 gruba ($25*4=100$ tohum) ayrıldı. Her iki şekilde ayrılan tohumlar bir petri kabına koyuldu. Daha önce hazırlanan TTC bileşiğinden bir miktar alınıp tohumlar kapanıncaya kadar eklendi. Tohumlar bu bileşikte karanlık bir ortamda 24 saat bekletildi. Petri kabı içindeki tohumlar steromikroskop altında bistürü yardımıyla tek tek açılarak renk değişimi gözlemlendi.

2.2.2. Kültür Ortamının Hazırlanması

Bu tez çalışmasında MS, LS ve G B5 besi ortamları kullanılmıştır. Makro, mikro besin elementleri ve vitaminleri içeren bu ortamlar firma (Sigma) önerisi doğrultusunda sırasıyla 4,41 g/L, 4,4 g/L ve 3,2 g/L tartılıp 1000 mL deiyonize su (dH_2O)' da çözüldü. Karışıma karbon kaynağı olarak 20 g/L olacak şekilde sukroz ilave edildi ve çözeltinin pH'sı 1 molar NaOH ve 1 normal HCl kullanılarak pH 5,7'ye ayarlandı. Ortamlar 8 g/L agar ilave edilerek katılaştırılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicileri otoklavdan önce belirli kombinasyon ve derişimlerde ilave edilmiş, ortamlar otoklavda 1 atm basınçta $121^{\circ}C$ ' ye ulaştıktan sonra 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Sterilizasyonu takiben ortamlar steril kabine alınmış, önceden hazırlanan steril kültür kaplarına (petriler, erlenler, magenta) belirli oranlarda dökülmüş ve katılaştıktan sonra bu ortamlar kullanılmıştır.

2.2.3. Bitki Tohumlarının Sterilizasyonu

Kekik bitkisinin tohumlarının sterilizasyonu; gerçek besi ortamlarında, iki farklı yöntem kullanılarak, en iyi sonuç veren yöntemden sonra seçilmiştir. Bu yöntemler aşağıdaki gibidir.

2.2.3.1. Sodyum Hipoklorit Çözeltisi Kullanılarak Yapılan Sterilizasyon

Bu sterilizasyon yönteminde Domestos adlı ticari çamaşır suyu kullanılmıştır. 20 mL çamaşır suyuna, 80 mL dH₂O eklenerek % 20'lik bir çözelti hazırlandı. Kekik tohumları delikli bir eppendorfa alındı. Sonra bu eppendorf çözeltinin bulunduğu kaba bırakılarak bir manyetik karıştırıcı üzerinde 10 dk. boyunca karıştırıldı. Sterilizasyona tabi tutulan tohumlar iki ayrı gruba ayrılarak daha önce hazırlanan MS ve G B5 besi ortamlarına sırasıyla 5'er adet tohum 8 ayrı magentaya 3 tekrar olacak şekilde (MS, 5*8*3=120 tohum; G B5, 5*8*3=120 tohum) ekildi.

2.2.3.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Kullanılarak Yapılan Sterilizasyon

10 mL dH₂O, 0,5 g sukroz ile karıştırılarak % 5' lik sukroz çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 2 mL alınarak daha önce hazırlanan, 240 adet tohumun bulunduğu eppendorf üzerine eklendi. 12 saat boyunca buzdolabında bekletilen tohumların içinde bulunan sukroz çözeltisi bir pipetör yardımıyla eppendorf içinden çekildi. Eppendorf içindeki tohumlar kapanacak kadar H₂O₂ eklenerek 30 dk. daha buzdolabında bekletildi. Buzdolabından alınan tohumlar daha önce hazırlanan MS ve G B5 besi ortamlarına sırasıyla 5'er adet tohum 8 ayrı macentaya 3 tekrar olacak şekilde (MS, 5*8*3=120 tohum; G B5, 5*8*3=120 tohum) ekildi.

2.2.4. *In vitro* Uygulamalar ve Denemelerin Kurulması

2.2.4.1. *In vitro*' da Tohumların Çimlendirilmesi

Kekik tohumlarını çimlendirmek için; a) Giberellik asit (GA₃) ve b) Bitki büyüme düzenleyicisi kullanmadan, hazırlanan B5 ve MS ortamları hazırlanmıştır.

2.2.4.1.1. GA₃ Kullanarak Çimlendirme

1 mg/L GA₃ içeren 500 ml G B5 ve 1 mg/L GA₃ içeren 500 ml MS ortamları hazırlanmıştır. Bu ortamlar G-2 ve M-2 sembolleri kullanılarak gösterilmiştir.

150 kekik tohumu H₂O₂ ile steril edildikten sonra G-2 ve M-2 ortamına ayrı ayrı 3 tekrarlı 5 magentaya 5 tohum (G-2, 3*5*5 =75 tohum; M-2, 5*5*3=75 tohum) gelecek şekilde ekildi.

Tablo 3. GA₃ kullanılarak hazırlanan G-2 ve M-2 besi ortamı içerikleri

	Besi ortamı	Karbon kaynağı	Katılaştırıcı ajan	BBD
G-2 ortamı içeriği	3,2 g/L G B5	20 g/L sukroz	8 g/L agar	1 mg/L GA ₃
M-2 ortamı içeriği	4,41 g/L MS	20 g/L sukroz	8 g/L agar	1 mg/L GA ₃

2.2.4.1.2. Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kullanmadan Yapılan Çimlendirme

Herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi kullanılmadan 500 ml G B5 ve 500 ml MS ortamları hazırlanmıştır. Bu ortamlar G-3 ve M-3 sembolleri kullanılarak adlandırılmıştır. Hazırlanan bu ortamlara ayrı ayrı 3 tekrarlı 5 macentaya 5 tohum (G-3, 3*5*5 =75 tohum; M-3, 3*5*5=75 tohum) gelecek şekilde ekim yapıldı.

Tablo 4. G-3 ve M-3 besi ortamı içerikleri

	Besi ortamı	Karbon kaynağı	Katılaştırıcı ajan
G-3 ortamı içeriği	3,2 g/L G B5	20 g/L sukroz	8 g/L agar
M-3 ortamı içeriği	4,41 g/L MS	20 g/L sukroz	8 g/L agar

2.2.4.2. Çimlenen Tohumlardan Alınan Sürgün Uçları ile Kallus Oluşturma

In vitro' da çimlenen tohumlardan oluşan fidelerden alınan yaklaşık 1 cm² 'lik eksplantlar, kallus oluşumunu teşvik etmek için, G B5, MS ve LS besi ortamlarına ekildi. 3

tekrar olacak şekilde yapılan denemelerde, 2.2.4.1 bölümünde ki ortamlardan (G-2, G-3, M-2, M-3) alınan eksplantlar G-4, G-5, M-4, M-5, L-1 ve L-2 olarak adlandırılacak olan ortamlara aktarılmıştır (G-4, 3*3= 9 adet macenta; G-5, 3*3= 9 adet macenta; M-4, 3*3= 9 adet macenta; M-5, 3*3= 9 adet macenta; L-1, 3*3= 9 adet macenta; L-2, 3*3= 9 adet macenta).

Tablo 5. Sürgün eksplantlarından kallus oluşturmak için hazırlanan besi ortamı içerikleri

	Besi ortamı	Karbon kaynağı	Katılaştırıcı ajan	BBD
G-4 ortamı içeriği	3,2 g/L G B5	20 g/L sukroz	8 g/L agar	1 mg/L IBA+ 1 mg/L 6-BA
G-5 ortamı içeriği	3,2 g/L G B5	20 g/L sukroz	8 g/L agar	2 mg/L IBA 2 mg/L 6-BA
M-4 ortamı içeriği	4,41 g/L MS	20 g/L sukroz	8 g/L agar	1 mg/L IBA 1 mg/L 6-BA
M-5 ortamı içeriği	4,41 g/L MS	20 g/L sukroz	8 g/L agar	2 mg/L IBA 2 mg/L 6-BA
L-1 ortamı içeriği	4,409 g/L LS	20 g/L sukroz	8 g/L agar	1 mg/L IBA 1 mg/L 6-BA
L-2 ortamı içeriği	4,409 g/L LS	20 g/L sukroz	8 g/L agar	2 mg/L IBA 2 mg/L 6-BA

2.2.4.3. Kallus Kütlelerinden Dolaylı Organogenezle Sürgün Oluşumu

G-4, M-4, L-1 ortamlarında (Tablo 5) oluşan somatik embriyo içerikli kalluslardan yeni sürgünler oluşturmak için bitki büyüme düzenleyicileri değiştirildi. Bu ortamlarda oluşan somatik embriyo içerikli kallus kütlelerinden eşit büyükte 5 parça alınarak 3 tekrar olacak şekilde 3 ayrı macentaya (her bir ortam için 3*3=9 macenta) sırasıyla besi ortamı aynı olan (G-4) → G-6, G-7; (M-4) → M-6, M-7 ve (L-1) → L-3, L-4 ortamlarına gelecek şekilde ekim yapıldı.

Tablo 6. Kallus kütlelerinden dolayı organogenezle sürgün oluşturmak için hazırlanan besi ortamları

	Besi ortamı	Karbon kaynağı	Katılaştırıcı ajan	BBD
G-6 ortamı içeriği	3,2 g/L G B5	20 g/L sukroz	8 g/L agar	1 mg/L IBA 2 mg/L Kinetin
G-7 ortamı içeriği	3,2 g/L G B5	20 g/L sukroz	8 g/L agar	1 mg/L 2,4-D 2 mg/L Kinetin
M-6 ortamı içeriği	4,41 g/L MS	20 g/L sukroz	8 g/L agar	1 mg /L IBA 2 mg/L Kinetin
M-7 ortamı içeriği	4,41 g/L MS	20 g/L sukroz	8 g/L agar	1 mg/L 2,4-D 2 mg/L Kinetin
L-3 ortamı içeriği	4,409 g/L LS	20 g/L sukroz	8 g/L agar	1 mg/L IBA 2 mg/L Kinetin
L-4 ortamı içeriği	4,409 g/L LS	20 g/L sukroz	8 g/L agar	1 mg/L 2,4-D 2 mg/L Kinetin

2.2.4.4. Kallus Kütleleri Üzerinde Somatik Embriyo Oluşumu

Dolaylı organogenezle sürgün oluşturmak için kullanılan kallus kütlerinin yanında embriyo gelişimi az olan kallus kütleleri yeniden alt kültüre alınarak somatik embriyo oluşturma denemeleri kuruldu. Alt kültüre alınan kallus kütleleri G-8, G-9, M-8 ve M-9 sembolleriyle gösterilen ortamlara aktarıldı.

Tablo 7. Somatik embriyogenezi teşvik etmek için kullanılan besi ortamı içerikleri

	Besi ortamı	Karbon kaynağı	Katılaştırıcı ajan	BBD
G-8 ortamı içeriği	3,2 g/L G B5	20 g/L sukroz	8 g/L agar	5 mg/L 2,4-D
G-9 ortamı içeriği	3,2 g/L G B5	20 g/L sukroz	8 g/L agar	5 mg/L 2,4-D 0.1 mg /L Kinetin
M-8 ortamı içeriği	4,41 g/L MS	20 g/L sukroz	8 g/L agar	5 mg/L 2,4-D
M-9 ortamı içeriği	4,41 g/L MS	20 g/L sukroz	8 g/L agar	5 mg/L 2,4-D 0.1 mg /L Kinetin

2.2.5. Özütlerin Elde Edilmesi

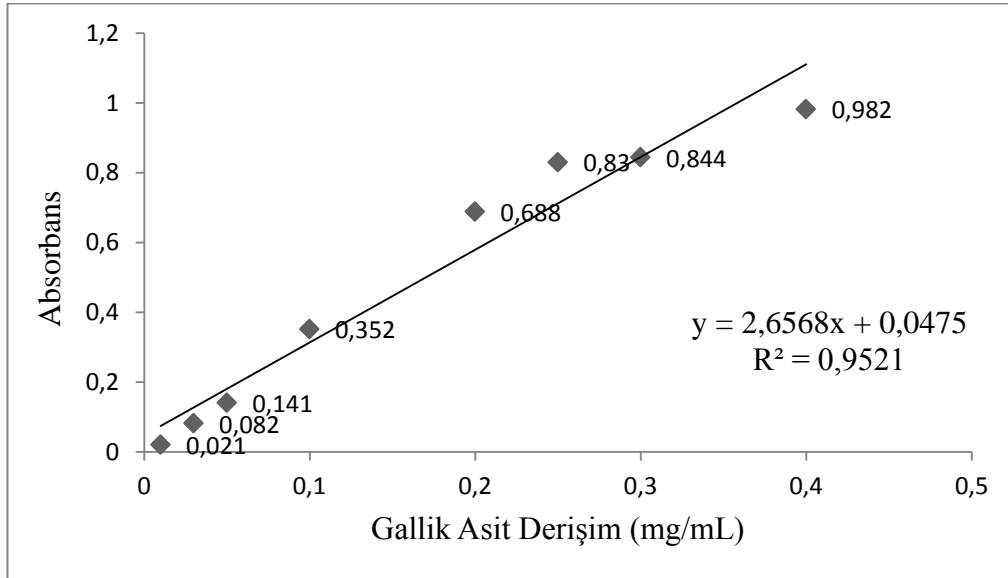
In vitro’ da yetiştirilen *Satureja spicigera* bitkisinin klonlarından 3 farklı özüt hazırlandı. Toplam fenol miktarının tayini için doğrudan metanol kullanıldı. Etil eter ve tetradekan belli miktarlarda karıştırılarak uçucu yağ doğrudan bitkiden özütlenirken, uçucu yağ eldesinden sonra geriye kalan bitki materyalinden ise HPLC ‘de bazı özel fenolik bileşiklerin analizi için özütler elde edildi. İzlenen yöntemlerin detayları aşağıda verilmiştir

2.2.5.1 Toplam Fenol İçeriği

Folin–Ciocalteu yöntemi tungsten ve molibden elementlerinin bir karışımı olan reaktifin kimyasal olarak indirgenmesini temel alan spektrofotometrik bir yöntemdir. (Singleton ve Rossi., 1965). Metal oksitin indirgenmesi sonucu 765 nm’de absorpsiyon gösteren mavi bir renk oluşur. Bu rengin şiddeti fenollerin derişimiyle doğru orantılıdır. Renk oluşumu yavaş olup örneğin hafif ısıtılmasıyla hızlandırılabilir. Fakat çok fazla ısıtma yapılırsa renk kaybına da neden olur (Monica Guisti, M. ve Wrolstad, R., E., 2001).

S. spicigera bitkisinin 8 farklı klonundan ayrı ayrı belli miktarlar da alınıp filtre kağıdı üzerinde 25 mL metanole tabi tutuldu. Elde edilen süzüntü uçurularak geriye kalan kısım Folin- Ciocalteu yöntemi kullanılarak toplam fenolik madde miktarının tayini için hazırlandı.

Artan derişimler de gallik asit standartları kullanılarak kalibrasyon grafiği elde edildi. Bu amaçla 10 mg gallik asit 1 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiden 1-40 µL'lik kısımlar alınarak metanol ile 1 mL'ye seyreltildi. Seyreltilmiş her bir çözeltiden 50 µL'lik kısımlar tüplere alınarak üzerine 750 µL Folin–Ciocalteu's reaktifi/su (1:14) karışımı ve % 20'lik sodyum karbonat (Na₂CO₃) 'dan 200 µL eklendikten sonra karanlıkta 30 dk. bekletildi ve oluşan yeşil renkli kompleksin 760 nm'deki absorpsiyonu ölçüldü. Gallik asit derişimine karşı ölçülen absorpsiyon değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği çizildi. Her bir deney üç kez tekrarlandı. Özütlerin toplam fenolik bileşik miktarları gallik asit kalibrasyon grafiğinden elde edilen veriler kullanılarak hesaplandı.



Şekil 6. Toplam fenol tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği

2.2.5.2. HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analizi

In vitro'da yetiştirilen *Satureja spicigera* bitkisinin 8 farklı klonunun kuru örneklerinden 0,5'er g alınarak 3 saat boyunca metanolla ultrasonik banyoda özütleme yapıldı ve 40°C'de rotary evaporatörde metanol uçuruldu. Kalıntı 5 mL deiyonize suda çözülerek etil asetat ve dietileter ile kısımlandırıldı ve organik fazlar birleştirilerek çözücüler uçuruldu. Kalıntı uygun miktarda metanolde çözülerek HPLC analizlerine geçildi.

Kromatografik analizler, asetik asit ile modifiye edilen asetonitril ve sulu fazlara

uygulanan gradient programı ile C18 (Agilent) kolonu (150x4.6 mm ıd, 5µ) kullanılarak 280 nm’de HPLC-UV (Agilent 1100 series) ve HPLC-DAD (Agilent 1200 series) ile 280 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Bileşenlerin nicel değerlendirmesinde enjeksiyon hacmi 20 µL olarak kullanıldı ve her bir bileşenin bilinen derişimlerinde hazırlanan standart karışımı kullanıldı. Aynı şartlarda koşturulan örnek ve standartların pik alanlarının integrasyonu ile miktar analizi yapıldı. Nicel hesaplamalarda propil paraben, HPLC’ de iç standart olarak kullanıldı.

2.2.5.3. Kuru Bitki Örneklerinden Elde Edilen Uçucu Yağ Özütleri

Satureja spicigera bitkisinin kuru örneklerinden 3 ‘er g tartıldı. Tartılan bu örnekler oluşturulan bir tüp sistemine yerleştirildi. 400 mL dietileter ve 80 µL tetradekan bileşiği karıştırılarak stok çözelti hazırlandı. Her bir klon (8 adet klon) için 50 mL ayrıldı. 3 tekrar halinde (her defasında yaklaşık 17 mL) alınarak oluşturulan tüp sistemine eklendi. Her tekrarda 15 dk beklendikten sonra bir kompresör yardımıyla tüpe hava üflenerek tüpün altında yer alan boş bir kapa özüt toplandı. Elde edilen özütlerin üzerine 1 mL hekzan eklenerek GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Gaz Kromatografi/Kütle Spektrometresi) analizleri için hazırlandı.

2.2.6. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Bu çalışmada tüm veriler, 3 tekerrür olacak şekilde kurulan denemelerden elde edilmiştir. Varyans analizleri ve uygulamalar arasındaki farkların önem kontrolü “Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi” ile ortalamalar arasındaki farklar karşılaştırılarak belirlenmiştir (Kesici ve Kocabaş, 1988).

3. BULGULAR

3.1. Tohumların Canlılık Testi

Canlılık testi için; a) Sterilizasyona tabi tutulan tohumlar ve b) herhangi bir müdahale yapılmadan test edilen normal tohumların TZ testi sonuçları Tablo 8’ de verilmiştir.

Tablo 8. *Satureja spicigera* bitkisinin TTC bileşiğiyle yapılan TZ testi

	Müdahale edilmeyen normal tohumlar (adet) (X±Sx)	H ₂ O ₂ ile sterilize edilen tohumlar (adet) (X±Sx)
1.grup	12 canlı - 13 cansız	11 canlı - 15 cansız
2.grup	15 canlı - 10 cansız	15 canlı - 10 cansız
3.grup	14 canlı - 11 cansız	14 canlı - 11 cansız
4.grup	19 canlı - 6 cansız	12 canlı - 13 cansız
	Toplam: 60 canlı - 40 cansız Canlılık oranı: % 60 ± 4	Toplam: 52 canlı - 48 cansız Canlılık oranı: % 52 ± 2

Tablo 8’ deki bulgular incelendiğinde, TZ testine tabi tutulan tohumların; müdahale edilmemiş olanlarında canlılık oranının % 60 ± 4 ve H₂O₂ ile sterilizasyona tabi tutulanlarda ise canlılık oranının % 52 ± 2 olduğu tespit edildi.

3.2. Sterilizasyon Yöntemi Seçimi

İki farklı sterilizasyon yöntemi kullanarak kurulan denemelerde; a) çamaşır suyu kullanarak yapılan sterilizasyon oranı % 17 ± 1 iken b) H₂O₂ kullanarak yapılan sterilizasyonun oranı ise % 81 ± 1’ dir. Sonuçlar Tablo 9’da verilmiştir.

Satureja spicigera bitkisinin tohumlarını sterile etmek için kurulan denemelerde sonuçlar incelendiğinde, H₂O₂ kullanarak yapılan sterilizasyonda kontaminasyon riskinin en az olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar ele alındığında bu tez kapsamında doku kültürü

çalışmalarında oluşturulan prosedürler de tohumların sterilizasyonu için en uygun yöntemin H₂O₂ kullanılarak yapılan sterilizasyon olduğu gözlenecektir.

Tablo 9. *Satureja spicigera* bitkisinin tohumlarının sterilizasyon yöntemi seçim sonuçları

	Çamaşır suyu kullanarak yapılan sterilizasyon		H ₂ O ₂ kullanarak yapılan sterilizasyon	
	G-1 (adet) (X±Sx)	M-1 (adet) (X±Sx)	G-1 (adet) (X±Sx)	M-1 (adet) (X±Sx)
1.grup	1 non k.- 7 k.	1 non k.-7 k.	6 non k. - 2 k.	6 non k. - 2 k.
2.grup	2 non k.- 6 k	1 non k.-7 k.	7 non k. - 1 k.	6 non k.- 2 k.
3.grup	1 non k.- 7 k.	2 non k.- 6 k	7 non k.- 1 k.	7 non k. - 1 k.
	Sterilizasyon oranı: % 17 ± 1		Sterilizasyon oranı : % 81 ±1	

* (non k.: kontamine olmamış besi ortamı, k.: kontamine olan besi ortamı)

3.3. Doku Kültürleri ile İlgili Sonuçlar

3.3.1. *Satureja spicigera* Bitkisinin Tohumlarının Çimlendirilmesi

3.3.1.1. GA₃ Kullanarak Yapılan Çimlendirme

GA₃ bitki büyüme düzenleyicisi iki farklı besi ortamında çimlenmeyi teşvik etmek için kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. GA₃ kullanarak yapılan çimlendirmenin sonuçları

	Tohum Durumu	G-2 (adet) (X±Sx)					M-2 (adet) (X±Sx)				
		1.grup	Çimlenen	3	4	2	1	3	3	2	4
	Çimlenmeyen	2	1	3	4	2	2	3	1	0	4
2.grup	Çimlenen	4	2	3	1	5	3	4	2	1	0
	Çimlenmeyen	1	3	2	4	0	2	1	3	4	5
3.grup	Çimlenen	2	3	3	2	4	2	4	3	3	1
	Çimlenmeyen	3	2	2	3	1	3	1	1	2	3
	Toplam:	Çimlenen: 42 ± 3					Çimlenen: 38 ± 3				
		Çimlenmeyen: 33 ± 2					Çimlenmeyen: 37 ± 2				

G-2 ve M-2 sembolleri kullanılarak hazırlanan iki farklı besi ortamında çimlenen ve çimlenmeyen ortamlar istatistiksel olarak incelendiğinde; G-2 ortamında çimlenen tohum sayısı 42 ± 3 ve M-2 ortamında çimlenen tohum sayısının 38 ± 3 olduğu ortaya çıkmıştır.

Öte yandan, her iki ortamda aynı miktar da GA₃ kullanılmasına rağmen G-2 ortamında kök oluşumunun gövde ve yaprak gelişimine göre daha iyi, M-2 ortamında ise gövde ve yaprak gelişimini kök gelişimine göre daha iyi olduğu gözlemlendi.



Şekil 7. G-2 ortamında yapılan çimlendirme



Şekil 8. M-2 ortamında yapılan çimlendirme

3.3.1.2. Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kullanmadan Yapılan Çimlendirme

Herhangi bir bitki büyüme düzenleyici kullanılmadan yapılan denemelerde G-3 ortamında çimlenen tohum sayısı 34 ± 3 iken M-3 ortamında ise çimlenen tohum sayısının 28 ± 3 olduğu hesaplandı.

Tablo 11. BBD kullanmadan yapılan çimlendirmenin sonuçları

Tohum Durumu		G-3 (adet) ($X \pm Sx$)					M-3 (adet) ($X \pm Sx$)				
1.grup	Çimlenen	4	3	4	2	1	3	1	3	4	1
	Çimlenmeyen	1	2	0	3	4	2	4	2	2	3
2.grup	Çimlenen	3	0	2	1	3	4	0	1	1	2
	Çimlenmeyen	2	5	3	4	2	1	5	2	2	1
3.grup	Çimlenen	1	2	3	4	1	3	1	2	1	1
	Çimlenmeyen	4	3	2	3	3	2	4	3	4	4
Toplam:		Çimlenen: 34 ± 3 Çimlenmeyen: 41 ± 2					Çimlenen: 28 ± 3 Çimlenmeyen: 47 ± 2				

Kök ve sürgün gelişimlerine bakıldığında ise G-3 ortamında oluşan köklenmenin M-3 ortamına göre daha iyi, M-3 ortamında oluşan gövde ve yaprak kondisyonunun ise G-3 ortamında oluşan gövde ve yaprak kondisyonuna göre daha iyi olduğu gözlemlendi.



Şekil 9. G-3 ortamında yapılan çimlendirme



Şekil 10. M-3 ortamında yapılan çimlendirme

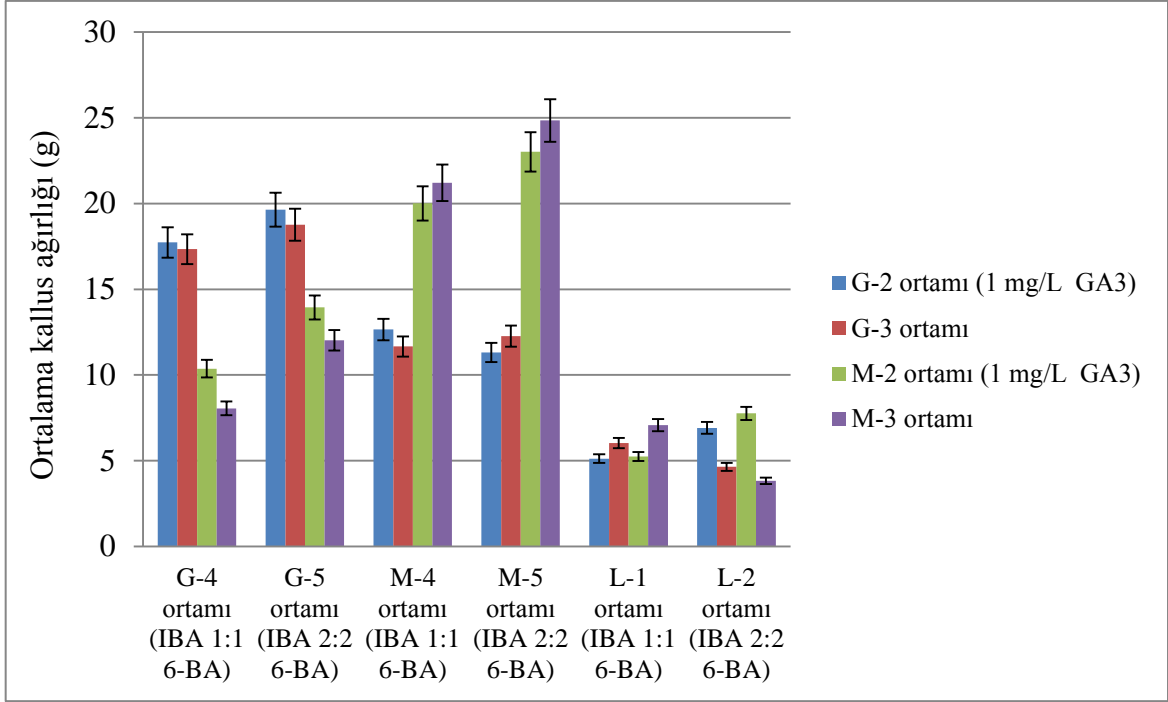
3.3.2. Çimlendirilen Sürgünlerden Alınan Eksplantlarda Kallus Oluşumu

Kallus oluşturmak için kurulan denemelerde G B5, MS ve LS ortamları kullanıldı. Her bir ortam için iki farklı BBD kombinasyonunda 3 tekrar olacak şekilde besi ortamları hazırlandı. Oluşan kallusların ortalama ağırlık \pm standart hata değerleri Tablo 12’ de gösterilmiştir.

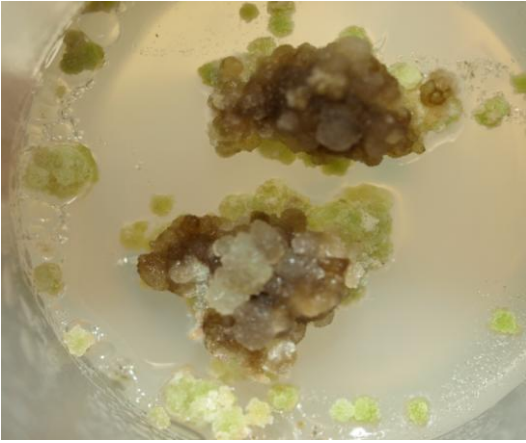
Tablo 12. Farklı besi ortamlarında oluşan ortalama kallus ağırlıkları

	Aktarma yapılan ortamlar					
	G-4 (g) (X \pm Sx)	G-5 (g) (X \pm Sx)	M-4 (g) (X \pm Sx)	M-5 (g) (X \pm Sx)	L-1 (g) (X \pm Sx)	L-2 (g) (X \pm Sx)
G-2 →	17,73 * \pm 1,11	19,64 * \pm 1,21	12,65 ** \pm 1,41	11,31 ** \pm 1,44	5,12 *** \pm 2,15	6,91 *** \pm 1,9
G-3 →	17,34 * \pm 1,11	18,76 * \pm 0,98	11,66 ** \pm 1,22	12,27 ** \pm 1,94	6,03 *** \pm 1,73	4,64 *** \pm 0,98
M-2 →	10,37 a \pm 1,2	13,94 a \pm 1,31	20,01 b \pm 1,41	23,01 b \pm 1,43	5,24 c \pm 1,41	7,76 c \pm 1,15
M-3 →	8,05 a \pm 1,25	12,02 a \pm 1,18	21,21 b \pm 1,16	24,84 b \pm 1,43	7,07 c \pm 0,95	3,83 c \pm 1,43

* Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı satırda ve sütundaki farklı semboller ile gösterilen ortamlar arasındaki farklar önemlidir (p<0.01)



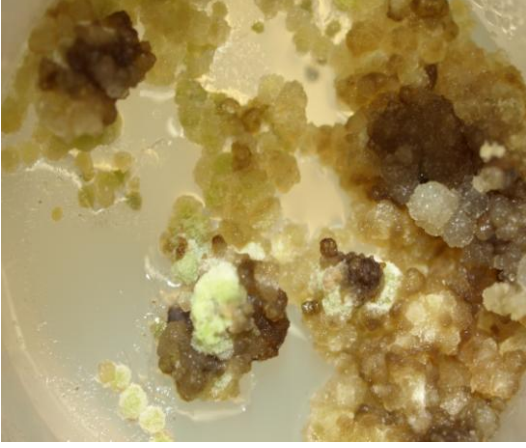
Şekil 11. Farklı besi ortamlarında ve büyüme düzenleyicilerinde hesaplanan ortalama kallus ağırlıkları



Şekil 12. G-4 ortamında oluşan kalluslar



Şekil 13. G-5 ortamında oluşan kalluslar



Şekil 14. M-4 ortamında oluşan kalluslar



Şekil 15. M-5 ortamında oluşan kalluslar



Şekil 16. L-1 ortamında oluşan kalluslar



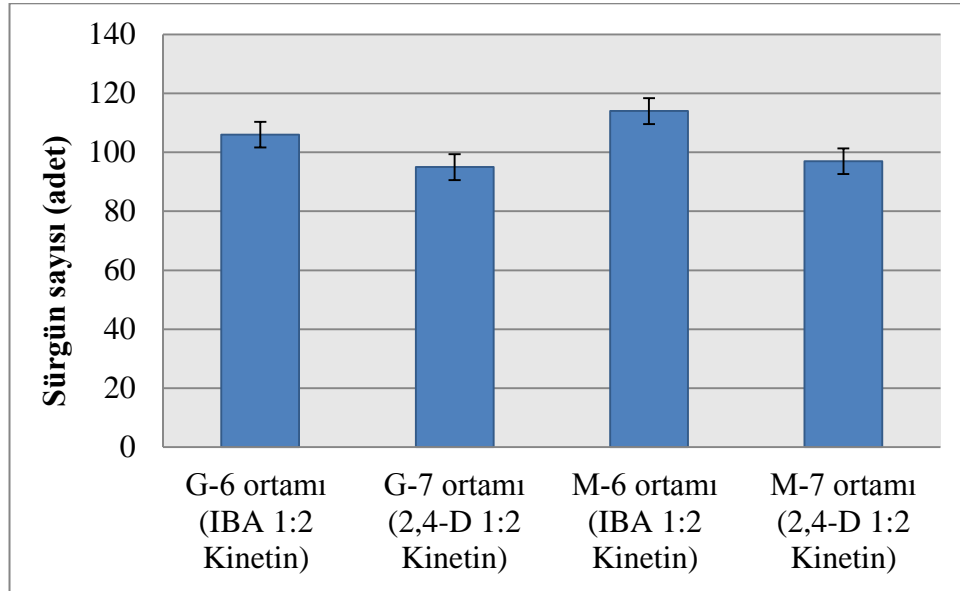
Şekil 17. L-2 ortamında oluşan kalluslar

3.3.3. Kallus Kütlelerinden Dolaylı Organogenezle Sürgün Oluşumu

Somatik embriyoların oluşmaya başladığı G-4, M-4 ve L-1 ortamlarından eşit büyüklükte alınan 5 adet kallus parçası sırasıyla G-6, G-7; M-6, M-7 ve L-3, L-4 ortamlarına ekilerek 6 farklı içerikte besi ortamı hazırlanmıştır.

Tablo 13. Farklı besi ortamlarında dolaylı organogenezle oluşan sürgün sayıları

	G-6 (adet) (X±Sx)					G-7 (adet) (X±Sx)					M-6 (adet) (X±Sx)					M-7 (adet) (X±Sx)				
	1.Grup	2	3	3	4	3	0	1	2	4	2	5	3	2	2	0	3	3	2	2
3		3	0	2	3	4	3	3	2	1	0	3	4	2	0	1	6	1	2	2
4		1	2	3	2	2	2	2	3	1	3	5	3	2	2	0	2	3	4	1
2.Grup	3	2	2	0	0	2	0	0	2	3	6	2	3	2	3	2	2	3	0	5
	3	0	2	2	2	3	4	5	2	1	5	3	3	2	1	2	2	3	3	2
	1	3	4	2	3	1	2	3	2	3	6	2	3	4	3	0	3	2	2	6
3.Grup	5	2	3	4	3	0	0	4	5	2	0	2	3	4	2	2	2	3	1	0
	2	0	3	4	1	2	2	3	1	2	2	2	1	5	4	0	1	4	3	0
	1	0	3	6	2	1	1	2	3	2	0	0	1	2	2	2	3	2	3	0
Toplam:	106 ± 4					95 ± 3					114 ± 5					97 ± 2				



Şekil 18. Dolaylı organogenezle oluşan sürgün sayıları



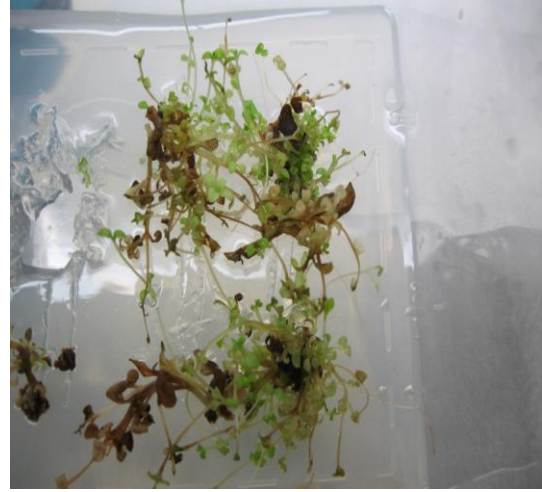
Şekil 19. G-6 ortamında dolaylı organogenezle sürgün oluşumu



Şekil 20. G-7 ortamında dolaylı organogenezle sürgün oluşumu



Şekil 21. M-6 ortamında dolaylı organogenezle sürgün oluşumu



Şekil 22. M-7 ortamında dolaylı organogenezle sürgün oluşumu

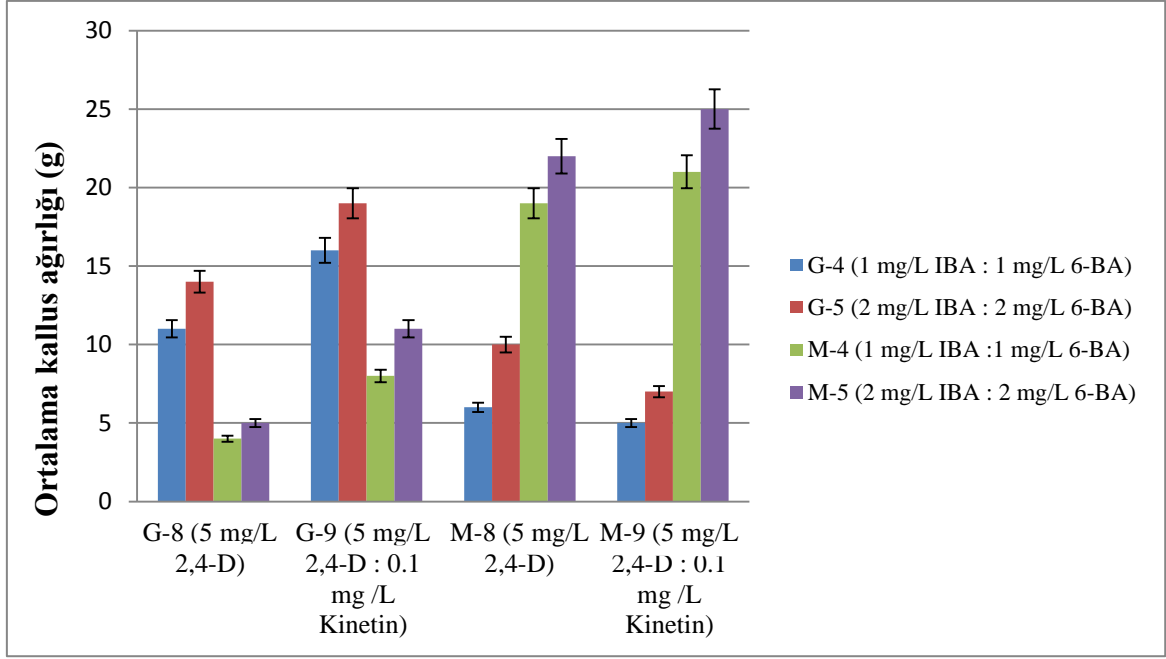
3.3.4. Somatik Embriyogenez Çalışmaları

Somatik embriyoların oluşmaya başladığı G-4, G-5 ve M-4, M-5 ortamlarından alınan kallus parçaları somatik embriyoların olgunlaşması için sırasıyla G-8, G-9 ve M-8, M-9 ortamlarına ekilmiştir. Olgunlaşan somatik embriyoların ortalama ağırlık \pm standart hata değerleri Tablo 14' de gösterilmiştir.

Tablo 14. G B5 ve MS ortamlarında oluşan somatik embriyo içeren kallus kütlerinin ortalama ağırlıkları

Aktarılan ortamlar	Aktarma yapılan ortamlar			
	G-8 (g) (X±Sx)	G-9 (g) (X±Sx)	M-8 (g) (X±Sx)	M-9 (g) (X±Sx)
G-4 →	11,64 * ± 0,96	16,93 ** ± 0,94	6,12 *** ± 1,15	5,21 *** ± 1,11
G-5 →	14,76 * ± 0,95	19,84 ** ± 1,2	10,33 *** ± 1,42	7,44 *** ± 1,62
M-4 →	4,27 a ± 1,26	8,04 a ± 1,5	19,83 b ± 1,2	21,01 b ± 0,95
M-5 →	5,95 a ± 1,01	11,42 b ± 1,35	22,34 c ± 1,04	25,76 c ± 1,56

* Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı satırda ve sütundaki farklı semboller ile gösterilen ortamlar arasındaki farklar önemlidir (p<0.01)

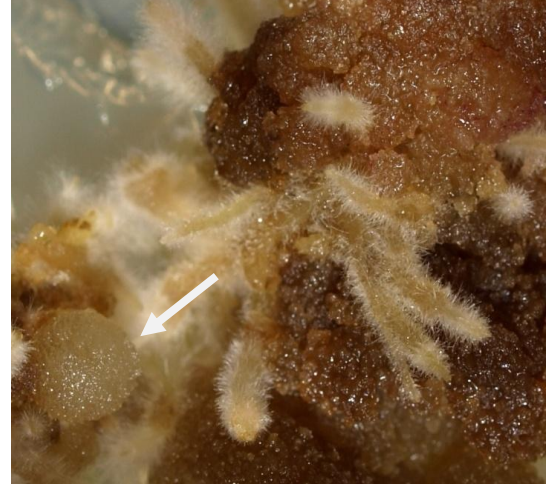


Şekil 23. Kullanılan besi ortamlarına ve BBD'lere göre ortalama somatik embriyo içerikli kallus ağırlıkları

Şekil 23 incelendiğinde, eksplant kaynağının ve bitki büyüme düzenleyicilerinin somatik embriyo oluşumuna etki ettiği görülmektedir. Kallus ağırlığı en yüksek, eksplant kaynağının alındığı ortam ile ekilen ortamların aynı olduğu denemelerde tespit edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin derişiminin yüksek olduğu G-5 ve M-5 ortamlarından alınan kalluslar 2,4-D ile kinetinin birlikte bulunduğu G-9 ve M-9 ortamlarına aktarıldığında yine en yüksek kallus ağırlığı tespit edilmiştir



Şekil 24. G-8 ortamında oluşan somatik embriyolar



Şekil 25. G-9 ortamında oluşan somatik embriyolar



Şekil 26. M-8 ortamında oluşan somatik embriyolar



Şekil 27. M-9 ortamında oluşan somatik embriyolar

3.4. Fenolik Bileşen Analizi

3.4.1. Toplam Fenol

Satureja spicigera bitkisinin farklı besi ortamlarında büyütülmesi ile oluşan 8 farklı bitki klonundan ayrı ayrı belli miktarlar da alındı. Kuru bitki örnekleri filtre kağıdı üzerinde 25 mL metanole tabi tutuldu ve elde edilen süzöntü uçurularak geriye kalan kısımlarlardan 0.002 g tartılarak 1 ml metanol de çözüldü. Oluşan karışım Folin- Ciocalteu

yöntemi kullanılarak 5 mg/mL gallik asit bileşiğinde toplam fenolik madde miktarının tayini için hazırlandı.

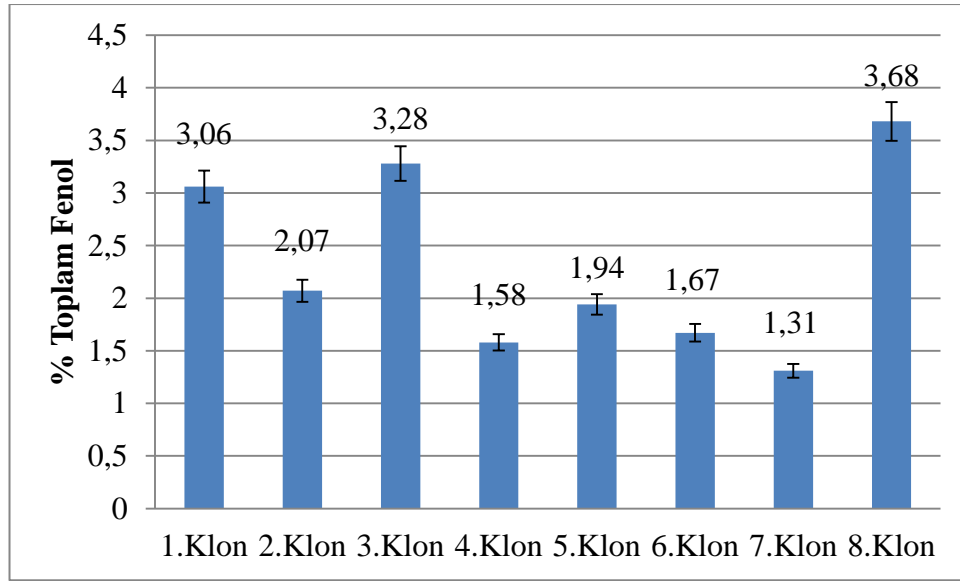
Tablo 15. MeOH ile süzülen bitki klonlarından elde edilen özütlerin verimleri

Numuneler	Besi Ortamı	Kuru ağırlık (g)	MeOH özütlerinin ağırlığı (mg)	% Verim
1.Klon	G-2	1,14	0,0476	4,175
2.Klon	M-2	1,22	0,0440	3,606
3.Klon	G-3	2,41	0,0634	2,630
4.Klon	M-3	1,27	0,0406	3,196
5.Klon	G-6	1,71	0,0721	4,216
6.Klon	M-6	1,63	0,0130	0,797
7.Klon	G-7	1,15	0,0450	3,913
8.Klon	M-7	4,7	0,2121	4,512

Bölüm 2'nin 2.2.5.1. kısmında belirtilen yöntem izlenerek tüm özütlerde toplam fenolik içeriği Folin Ciocalteu yöntemine göre belirlendi. Bu yöntemde fenolik bileşikler gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmaktadır. Bu amaçla 0- 0,6 mg/mL derişim aralığında gallik asit standartlarıyla bir kalibrasyon grafiğı (Şekil 6) oluşturuldu. Elde edilen verilerin regresyonu ile doğru denklemi ($y= 2,6568 x + 0,0475$) ve regresyon katsayısı ($R^2 = 0,9521$) hesaplanmıştır. Şekil 6' daki grafikten yararlanılarak hesaplamalar yapıldı. Elde edilen veriler Tablo 16'da gösterilmiştir

Tablo 16. Toplam fenol miktarları ve % derişimler

Numuneler	Besi Ortamı	Toplam fenol (mg gallik asit/ g numune) (X±Sx)	% Derişim
1.Klon	G-2	0,1530 ± 0,0104	3,06
2.Klon	M-2	0,1033 ± 0,0006	2,07
3.Klon	G-3	0,1639 ± 0,0006	3,28
4.Klon	M-3	0,0790 ± 0,0013	1,58
5.Klon	G-6	0,0769 ± 0,0014	1,94
6.Klon	M-6	0,0834 ± 0,0002	1,67
7.Klon	G-7	0,0657 ± 0,0006	1,31
8.Klon	M-7	0,1839 ± 0,0199	3,68

Şekil 28. *Satureja spicigera* klonlarının % toplam fenol miktarları

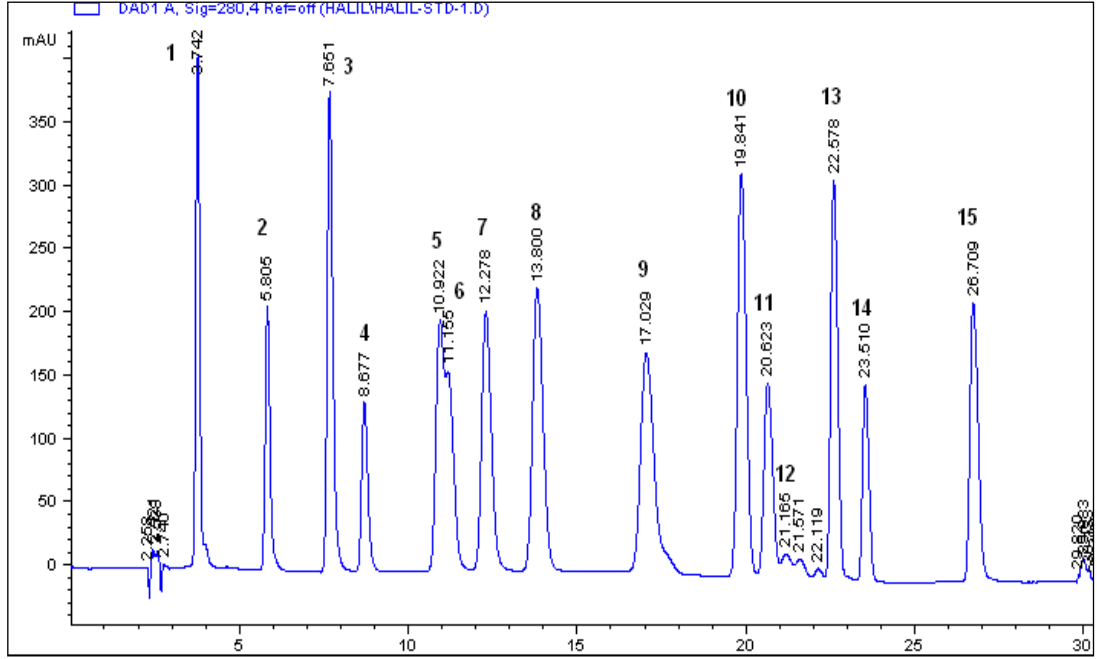
3.4.2. HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analizi

2.2.5.2 bölümünde yer alan yöntemler kullanılarak elde edilen özütlerin verimleri Tablo 17' de gösterilmiştir.

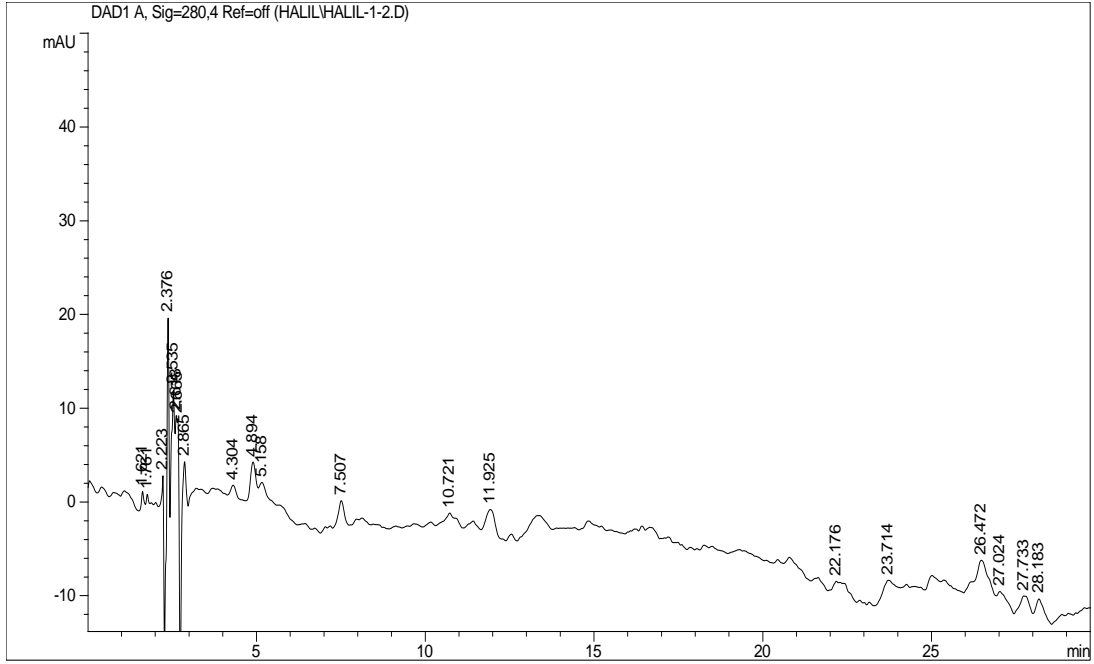
Tablo 17. HPLC analizleri için hazırlanan özütlerin verimleri

Numuneler	Besi Ortamı	Kuru ağırlık (g)	Özüt miktarı (mg)
1.Klon	G-2	2,77	0,9795
2.Klon	M-2	2,79	1,1488
3.Klon	G-3	2,71	1,3940
4.Klon	M-3	2,68	1,2878
5.Klon	G-6	2,69	1,3878
6.Klon	M-6	2,75	0,9776
7.Klon	G-7	2,76	1,8610
8.Klon	M-7	2,72	1,2396

Satureja spicigera bitkisinin klonlarının ekstraktlarında 7 adet fenolik bileşen kalitatif ve kantitatif olarak analiz edildi. Analiz edilen fenolik bileşiklerin dalga boyları, alıkonma zamanları, alanları ve derişimleri aşağıdaki şekil ve tablolarda verilmiştir. Bu çalışmada 15 adet fenolik bileşik standart olarak kullanıldı. 500 mikromolarlık standart karışımının 280 nm’deki kromatogramı Şekil 29 ‘da verilmiştir.



Şekil 29. 500 mikromolarlık standart karışımının 280 nm' deki kromatogramı Standartlar sırasıyla; 1. Gallik asit, 2. Protokatekuik asit, 3. Protokatekualdehit, 4. p-hidroksi benzoik asit, 5. Klorojenik asit, 6. Vanilik asit, 7. Kafeik asit, 8. Sirinjik asit, 9. Vanilin, 10. Şiringaldehit, 11. p-Kumarik asit, 12. Benzoik asit, 13. Sinapik asit, 14. Ferulik asit, 15. Rosmarinik asit'dir

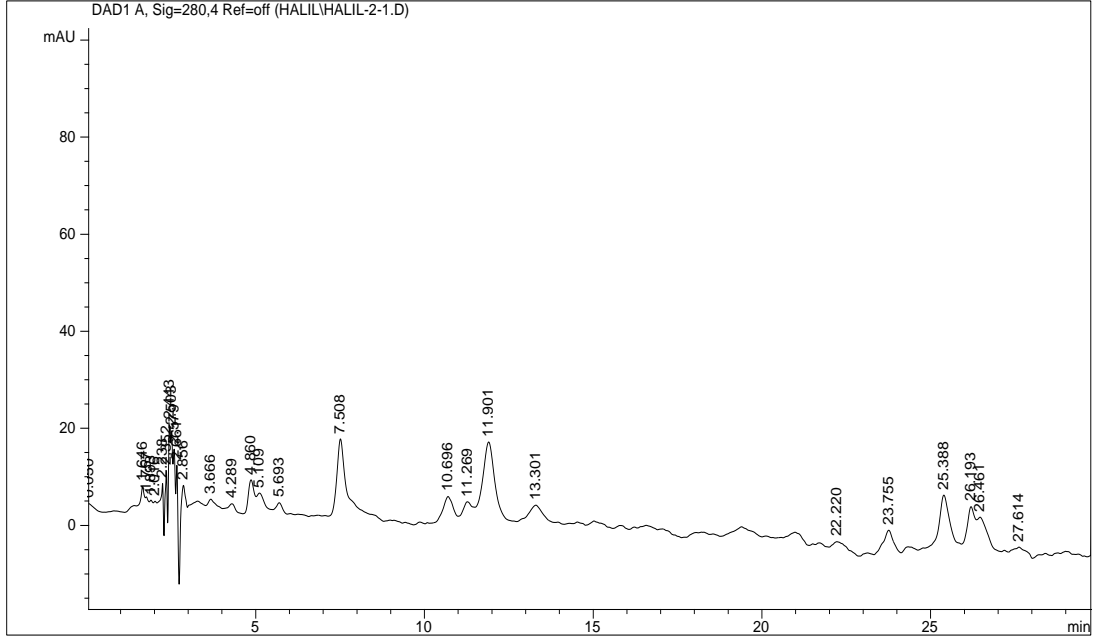


Şekil 30. 1. klonun 280 nm' deki kromatogramı

Tablo 18. 1. klonda tespit edilen fenolik bileşikler

Fenolik bileşik	RT (dk)	Alan (mAU)	Derişim ($\mu\text{g/g}$)
*	4,304	12,2	-
*	4,894	48	-
*	5,158	33,4	-
*	7,507	34,1	-
*	10,721	17,9	-
*	11,925	43,8	-
Benzoik asit	22,176	38,8	9,5
*	23,714	89,7	-
*	26,472	126,6	-
*	27,024	34,7	-
*	27,733	39,2	-

(*Boş bırakılan yerler "Bilinmeyen" dir. DAD spektrumları standart fenolik bileşiklere uymamaktadır).

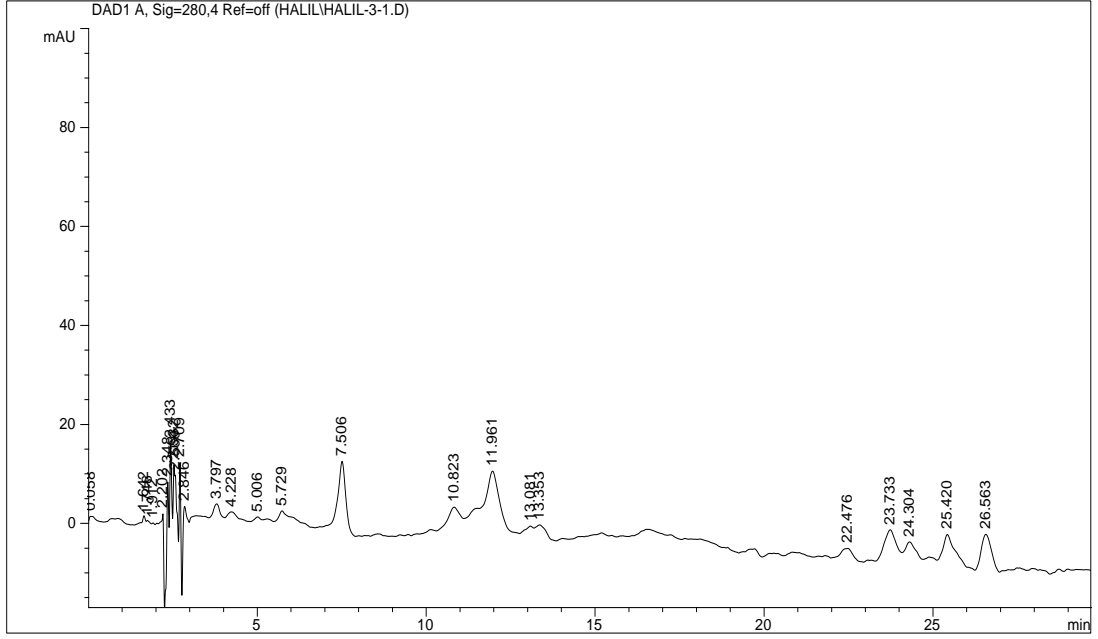


Şekil 31. 2. klonun 280 nm’ deki kromatogramı

Tablo 19. 2. klonda tespit edilen fenolik bileşikler

Fenolik bileşik	RT (dk)	Alan (mAU)	Derişim ($\mu\text{g/g}$)
*	3,666	21,7	-
*	4,289	19,2	-
*	4,860	84,7	-
Protokatekuik asit	5,693	33,7	5,36
Protokatekualdehit	7,508	276,6	162
*	10,696	124,3	-
*	11,269	98,3	-
Klorojenik asit	11,901	450,1	162,7
*	13,301	108,8	-
Benzoik asit	22,220	45,1	11,23
*	25,388	240,6	-
Rosmarinik asit	26,193	143,1	63,4

(*Boş bırakılan yerler “Bilinmeyen” dir. DAD spektrumları standart fenolik bileşiklere uymamaktadır).

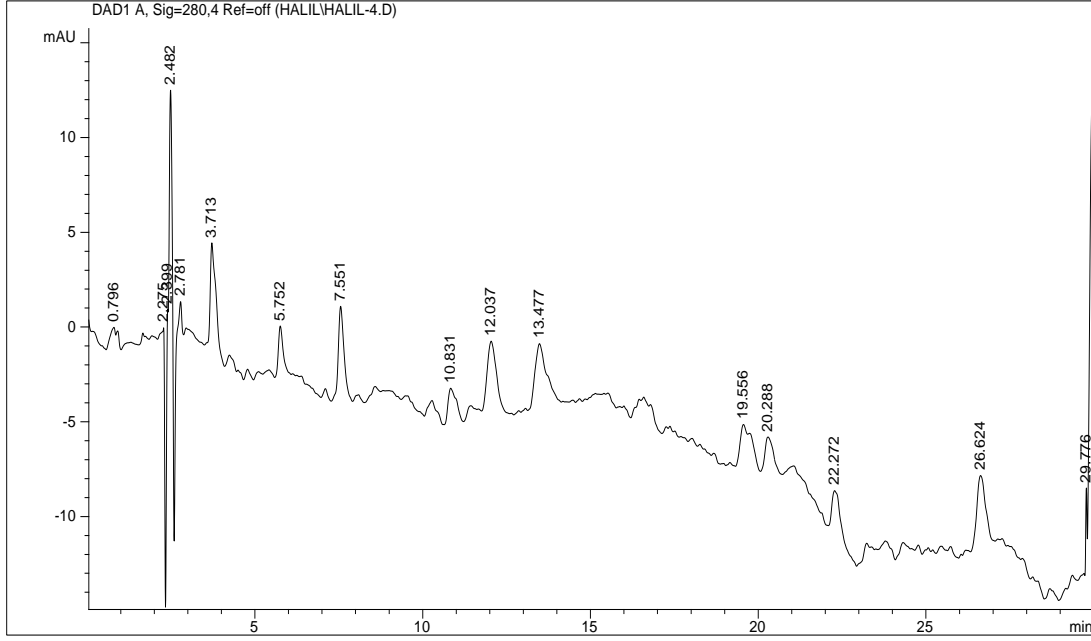


Şekil 32. 3. klonun 280 nm' deki kromatogramı

Tablo 20. 3. klonda tespit edilen fenolik bileşikler

Fenolik bileşik	RT (dk)	Alan (mAU)	Derişim ($\mu\text{g/g}$)
*	3,797	37.6	-
*	4,228	35.7	-
*	5,006	37.1	-
Protokatekuik asit	5,729	135.4	21,77
Protokatekulaldehit	7,506	244.2	140,6
*	10,823	154.9	-
Klorojenik asit	11,961	536.2	193,85
*	22,476	36.4	-
*	23,733	166.6	-
*	24,304	134	-
*	25,420	182.6	-
*	26,563	152.2	-

(*Boş bırakılan yerler "Bilinmeyen" dir. DAD spektrumları standart fenolik bileşiklere uymamaktadır)

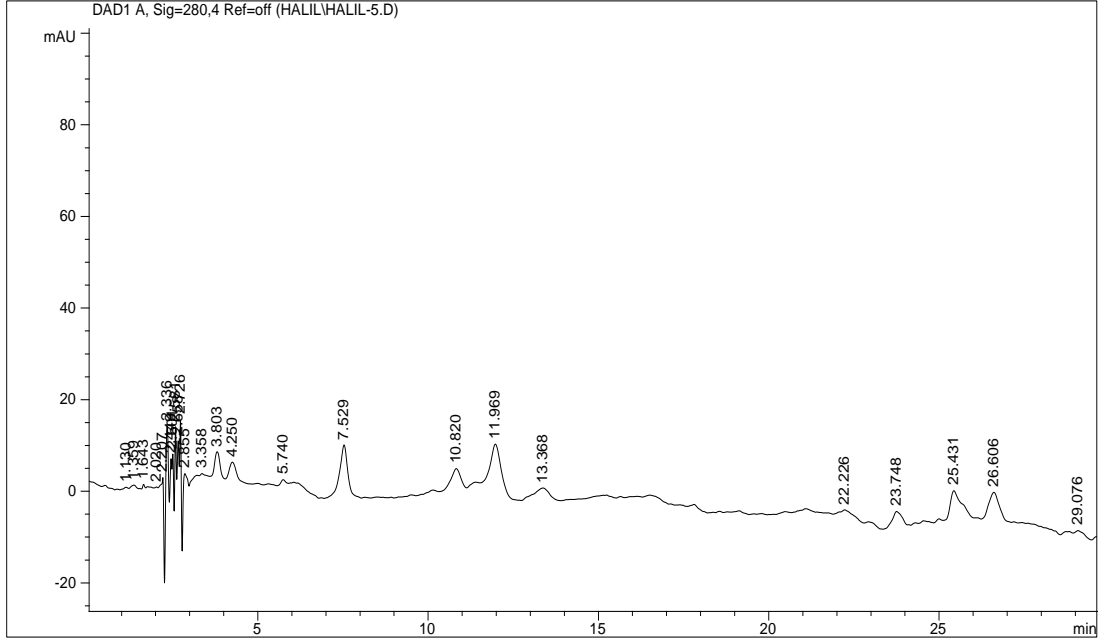


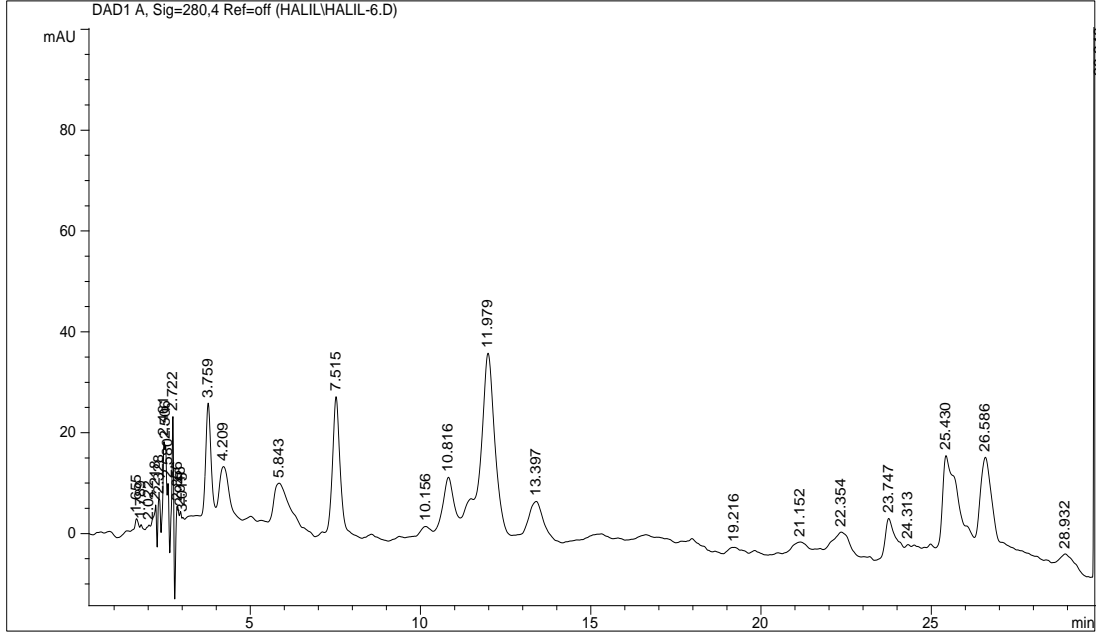
Şekil 33. 4. klonun 280 nm’ deki kromatogramı

Tablo 21. 4. klonda tespit edilen fenolik bileşikler

Fenolik bileşik	RT (dk)	Alan (mAU)	Derişim ($\mu\text{g/g}$)
Gallik asit	3,713	67,8	14,66
Protokatekuik asit	5,752	27,4	4,41
Protokatekulaldehit	7,551	54,7	31,37
*	10,831	31,7	-
Klorojenik asit	12,037	82,3	29,75
*	13,447	81,5	-
*	19,556	54,8	-
*	20,288	31,5	-
Ferulik asit	22,272	42,1	11,21
Rosmarinik asit	26,624	69,5	30,56

(*Boş bırakılan yerler “Bilinmeyen” dir. DAD spektrumları standart fenolik bileşiklere uymamaktadır).



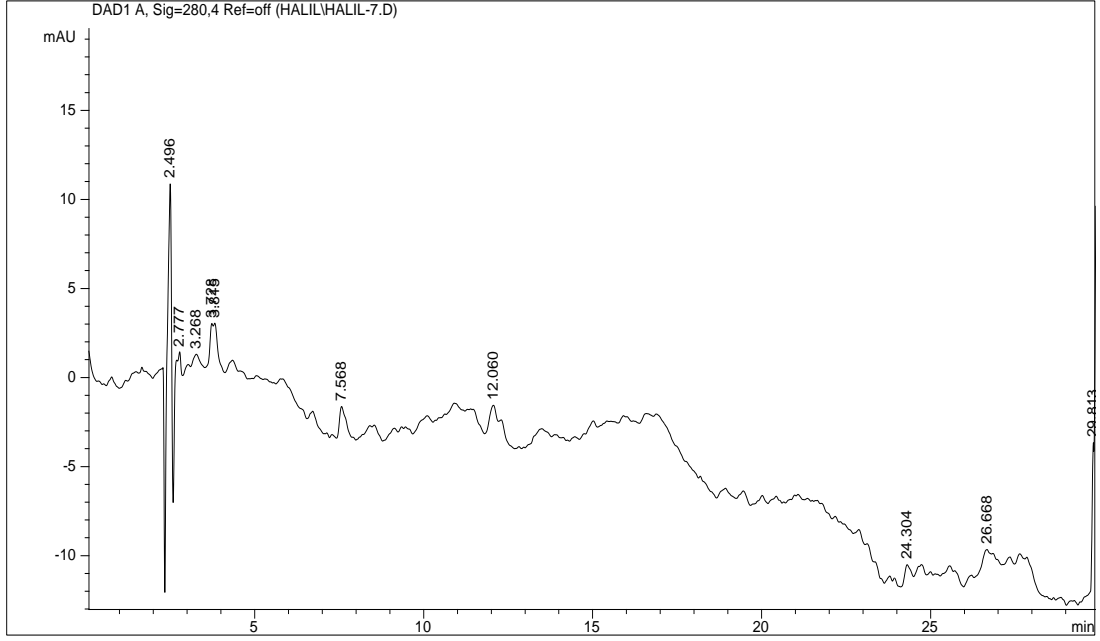


Şekil 35. 6. klonun 280 nm' deki kromatogramı

Tablo 23. 6. klonda tespit edilen fenolik bileşikler

Fenolik bileşik	RT (dk)	Alan (mAU)	Derişim ($\mu\text{g/g}$)
Gallik asit	3,759	243	52,54
*	4,209	201,1	-
*	5,843	268,4	-
Protokatekualdehit	7,515	434,3	249,12
*	10,156	38,9	-
*	10,816	282,3	-
Klorojenik asit	11,979	1111,9	401,98
*	13,397	210,6	-
Benzoik asit	21,152	97,6	24,3
Ferulik asit	22,354	184,3	49,07
*	25,430	570,4	-
*	26,586	437,1	-

(*Boş bırakılan yerler "Bilinmeyen" dir. DAD spektrumları standart fenolik bileşiklere uymamaktadır).

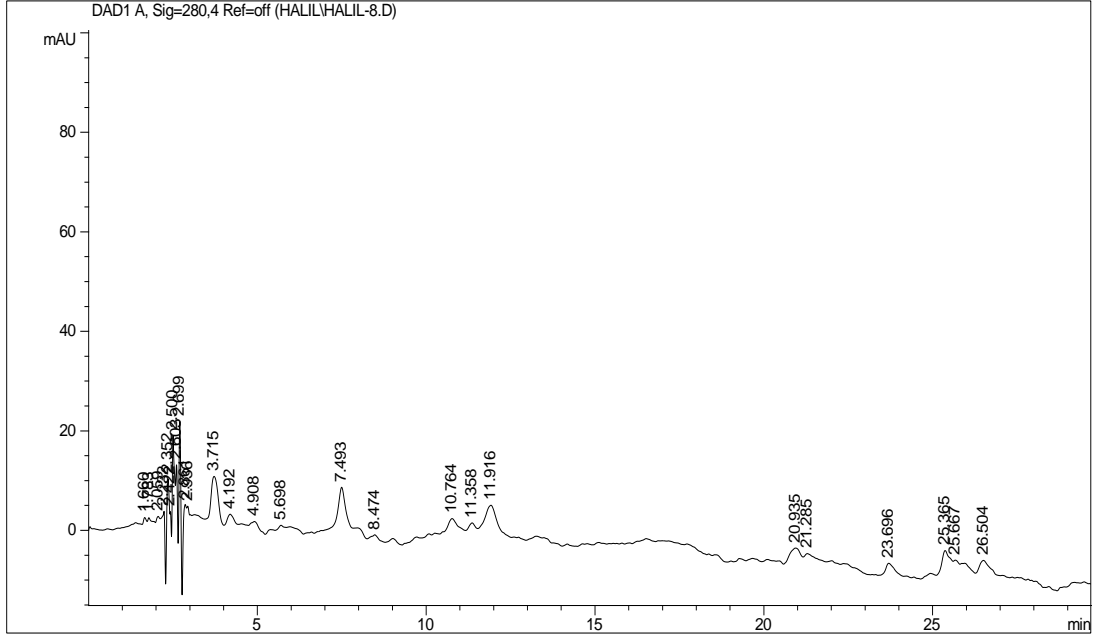


Şekil 36. 7. klonun 280 nm' deki kromatogramı

Tablo 24. 7. klonda tespit edilen fenolik bileşikler

Fenolik bileşik	RT (dk)	Alan (mAU)	Derişim ($\mu\text{g/g}$)
*	3.728	77,4	-
Gallik asit	3.815	91,6	19,8
*	7,568	22,9	-
Klorojenik asit	12,060	35,5	12,83
*	24,304	13,5	-
*	26,668	26,2	-

(*Boş bırakılan yerler "Bilinmeyen" dir. DAD spektrumları standart fenolik bileşiklere uymamaktadır).

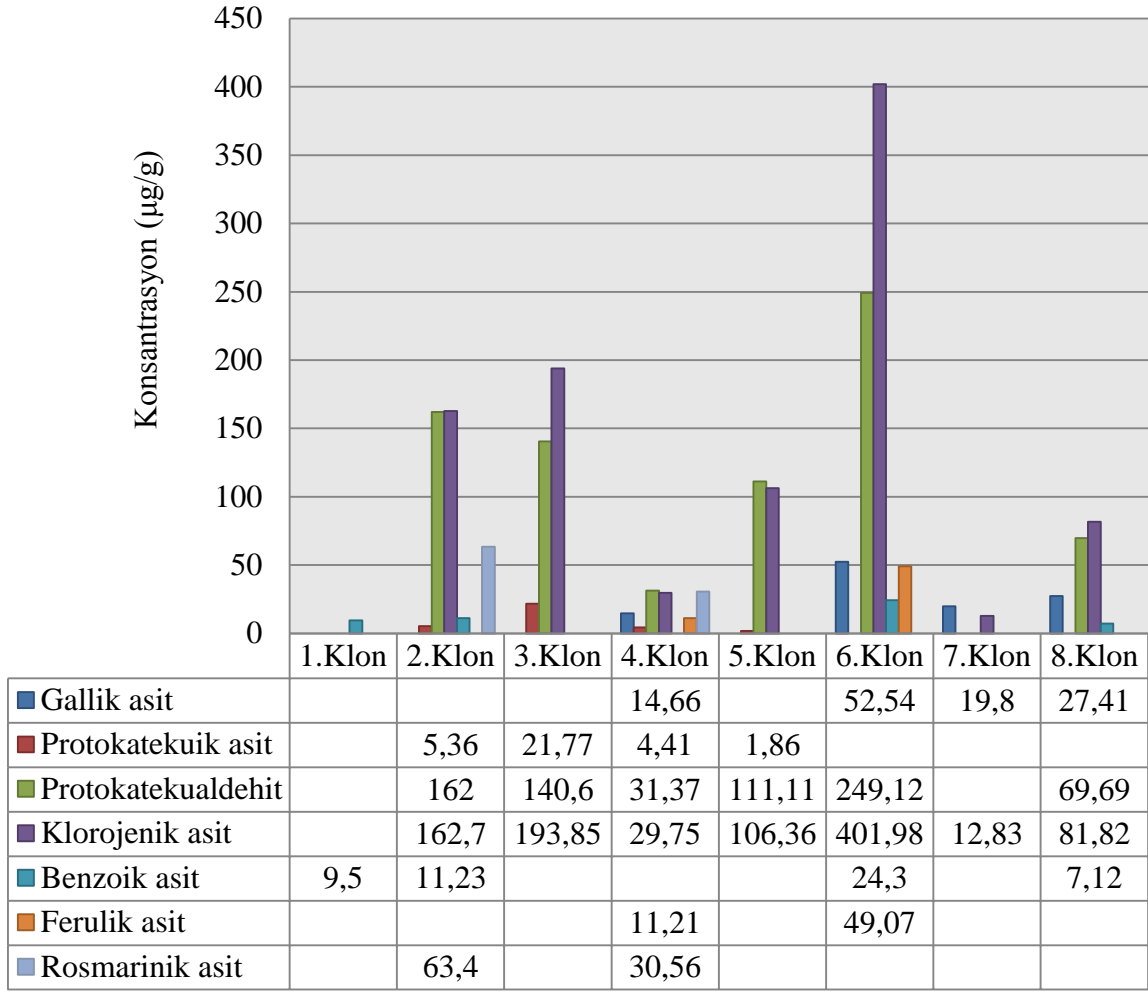


Şekil 37. 8. klonun 280 nm' deki kromatogramı

Tablo 25. 8. klonda tespit edilen fenolik bileşikler

Fenolik bileşik	RT (dk)	Alan (mAU)	Derişim ($\mu\text{g/g}$)
Gallik asit	3,715	126,8	27,41
*	4,192	47,1	-
*	4,908	39,3	-
*	5,698	18,4	-
Protokatekualdehit	7,493	121,5	69,69
*	10,764	155,4	-
*	11,358	68	-
Klorojenik asit	11,916	226,3	81,82
*	20,935	52,3	-
Benzoik asit	21,285	28,6	7,12
*	25,365	75,7	-
*	26,504	52	-

(*Boş bırakılan yerler "Bilinmeyen" dir. DAD spektrumları standart fenolik bileşiklere uymamaktadır).



Şekil 38. HPLC ile tespit edilen fenolik bileşiklerin derişimleri

3.4.3. Kuru Bitki Örneklerinden Elde Edilen Uçucu Yağ Verimleri

Satureja spicigera türünün 8 farklı klonundan kurutulmuş sürgün örnekleri alınarak, dieteleter ve tetradekan karışımı ile uçucu yağ elde edildi. Uçucu yağ verimleri Tablo 26’ da gösterilmiştir.

Tablo 26. Uçucu yağ verimleri

Numuneler	Besi Ortamı	Kuru Ağırlık (g)	Verim (μg)
1.Klon	G-2	3	30,6
2.Klon	M-2	3	36,7
3.Klon	G-3	3	30,1
4.Klon	M-3	3	31,1
5.Klon	G-6	3	37,4
6.Klon	M-6	3	37,3
7.Klon	G-7	3	33,3
8.Klon	M-7	3	42,3

Aynı miktarda (3 g) alınan kuru örneklerden elde edilen en yüksek verim (1,271 g) 1 mg/L 2,4-D + 2 mg/L kinetin içeren M-7 besi ortamında gerçekleşmiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bitki doku kültürü teknikleri ve uygulama alanları, bitki biyoteknolojisi kapsamında pek çok çalışmaya olanak sağlamaktadır. *In vitro* doku kültürü teknikleri kullanılarak birçok otsu ve odunsu bitki kültüre alınmakta, ticari amaçlı çalışmalar yanında bitki ıslahına yönelik araştırmalar yürütülebilmektedir. Bitki doku ve hücre kültürleri ile doğal ürünlerin (sekonder metabolitlerin) üretimi bitki biyoteknolojisinin ilgi çekici konularından birisidir. Özellikle kallus ve hücre süspansiyon kültürleri ile çok çeşitli sekonder metabolitlerin üretilebileceği belirtilmektedir (Sökmen ve Gürel, 2001).

Bitki biyoteknolojisinde sıkça karşılaşılan “kallus” terimi esasen doğada sıkça görülen bir olgudur ve bitkilerin yaralanmaya karşı verdiği bir tepkidir. Herhangi bir etki sonucu gelişen dokuda yaralanma bölgesinde hızlı ve düzensiz hücre bölünmeleri görülür ve bunu bu bölgede hızlı bir fenolik bileşik üretimi izler. Bu olgu kallus kültürlerinde fenolik bileşiklerin üretilmesi hususunda potansiyel bir kaynak olabileceğini gösterir.

S. spicigera tohumlarından başlatılan doku kültürleri ile ilgili bu çalışma özgün bir çalışmadır. Çünkü doku kültürleri ile ilgili bu bitkiden başlatılmış ve literatüre kazandırılmış hiçbir bilgi yoktur.

Bu tez kapsamında, *Satureja spicigera* bitkisinin *in vitro*’ da gelişim olanakları araştırılmıştır. Çimlenme, kallus, sürgün ve somatik embriyo oluşumunu teşvik etmek amacıyla doğadan alınan bitkilerin tohumları üzerinde yapılan çalışmalarda organogenez ve embriyo gelişimleri görülmüştür. Aynı zamanda ekonomik değeri yüksek fenolik bileşikler araştırılmış analizler sonucu toplam fenol miktarı ve HPLC ile bazı spesifik fenolik bileşikler tespit edilmiştir.

- Canlılık Testi Uygulamaları

Canlılık testi denemelerinde TZ testi (Patil ve Malavika, 1968) uygulanmış canlılık oranı; a) müdahale edilmeyen normal tohumlarda % 60, b) H₂O₂ ile steril edilen tohumlarda ise % 52 olduğu tespit edildi. Sterilizasyonun tohumlardaki canlılığı % 8 oranında etkilediği görülmektedir. TZ testi hali hazırda hızlı, kesin sonuç veren ve canlı dokuya zarar vermeyen (çimlenmeyi etkilemeyen) avantajlarının olmasının yanı sıra; dormant (uykuda) - non dormant ayrımının yapılamaması, çimlenen tohumlardan oluşan fidelerin normal veya anormal olma durumlarının önceden bilinmemesi,

mikroorganizmalarca enfekte edilen tohumların çimlenip sağlıklı fideleri oluşturma ihtimalinin olması gibi dezavantajları da vardır.

- Sterilizasyon Yöntemi Seçimi

Bitki tohumlarını steril etmek için ve bu tez kapsamında bir prosedür oluşturmak için; önce dH₂O 1:4 çamaşır suyu çözeltisi (Bölüm 2.2.3.1) kullanıldı. Hızlı ve basit bir yöntem olmasına rağmen kontaminasyon oranının (% 83 ± 1) yüksek olması başka bir yöntemin denenmesine sebep oldu. Diğer bir yöntem olan H₂O₂ kullanarak yapılan sterilizasyonda (Bölüm 2.2.3.2) kontaminasyon riskinin (% 19) yaklaşık 5 kat azatlığı tespit edilmiştir. H₂O₂ kullanarak yapılan bu sterilizasyon yönteminin iyi sonuç vermesi avantaj olarak göze çarparken, yaklaşık 12,5 saat (12 saat dH₂O 1:20 sukroz çözeltisinde, 30 dk. H₂O₂'da) kadar süre alması dezavantaj olarak görülmektedir.

- *In vitro* 'da Tohumların Çimlendirilmesi

Satureja spicigera bitkisinin tohumları iki farklı deneme uygulanarak çimlendirilmiştir. GA₃ kullanarak yapılan denemede çimlenme oranı G B5 besi ortamında % 56, MS besi ortamında ise % 51 olarak tespit edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicisi kullanmadan yapılan denemede ise G B5 besi ortamında çimlenme oranı % 50, MS besi ortamında çimlenme oranı % 37 olarak tespit edildi.

Tohum çimlenmesi bitki yaşamının en önemli evrelerinden biri olup (Ghoulam ve Fares, 2001), yalnızca genotipik karakterler (dormansi, integüment kalınlığı, testanın sert olması gibi) tarafından değil aynı zamanda çevresel koşullar tarafından da kontrol edilebilmektedir (Sy, vd., 2001). Tohum dormansisini kırmak amacıyla değişik uygulamalar yapılmaktadır. Değişik kimyasallar (kinetin, GA₃ gibi büyüme düzenleyicileri, KNO₃, polietilen glikol) kullanılmakta, yüksek sıcaklık veya düşük sıcaklık uygulaması ve mekaniksel uygulama gibi yollar izlenmektedir (Bewley ve Black, 1982).

Tohum kabuğundan kaynaklanan dormanside, tohum kabuğunun tamamen çıkarılması gerekmeden tohum kabuğuna yapılan fiziksel ve kimyasal uygulamalar (tohum yüzeyinin inceltmesi, kısmen uzaklaştırılması, perforasyon, mekaniksel skarifikasyon, soğuklama, ısıtma, radyasyon, basınç, tohuma konsantre sülfirik asit veya etanol uygulanması, sterilizasyon) embriyonun çimlenmesini sağlayabilir. Tohum kabuğundan kaynaklanan dormanside tohum kabuğu embriyo için gerekli su alınımını, gaz alışverişini engelleyebilir, inhibitör maddeler içerebilir, embriyodaki inhibitörlerin çıkışında bariyer olarak yer alabilir, embriyoya ışık ulaşımını engelleyebilir, mekaniksel direnç gösterebilir

GA₃'ün tohum dormansisinin ortadan kaldırılmasında önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Bewley and Black, 1982). GA₃ embriyo dormansisinin ortadan kaldırılmasında rol oynadığı gibi embriyoda yer alan yedek maddelerin hareketinde ve aynı zamanda perikarpın kırılmasından sorumlu olan kotiledon genişlemesinde de etkilidir (Bradbeer, 1988).

Literatürde GA₃'ün çimlenmeyi stimüle edici etkisinin tohumda enzim sentezini ve ribonükleaz aktivitesinin aktivasyonunu uyararak sağladığı bildirilmektedir (Shepley ve Chang, 1972). Çalışmamızda da GA₃ kullanarak yapılan denemede (Bölüm 3.3.1.1) çimlenme oranının G B5 ve MS besi ortamlarının her ikisinde de, bitki büyüme düzenleyicisi kullanmadan yapılan denemedeki (Bölüm 3.3.1.2) çimlenme oranlarından yüksek olduğu tespit edilmiştir.

- Çimlenen Tohumlardan Alınan Sürgün Uçları İle Kallus Oluşturma

Bu çalışmada, *Satureja spicigera* bitkisinin sürgün ucu eksplantlarının kültüre alındığı denemelerde G B5, MS, LS ortamları ile 1 mg/L IBA ve 1 mg/L 6-BA, 2 mg/L IBA ve 2 mg/L 6-BA bitki büyüme düzenleyicileri 6 farklı besi ortamı oluşturacak şekilde kullanılmıştır (Tablo 5). Besi ortamlarının kallus gelişimine etkilerini araştırmak için kurulan bu denemelerde aynı besi ortamından alınan eksplant kaynağının yine aynı besi ortamına ekilmesinin kallus gelişimini olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir. Örneğin; 1) G B5 ortamının kullanıldığı G-2 ortamından alınan sürgün ucu eksplantı G-5 ortamına ekilmiş ve en yüksek kallus gelişimi (**19,64 ± 1,21**) bu ortamda tespit edilmiştir. 2) MS ortamının kullanıldığı M-2 ortamından alınan sürgün ucu eksplantı M-5 ortamına ekilmiş ve en yüksek kallus gelişimi (**23,01 ± 1,43**) bu ortamda tespit edilmiştir (Tablo 12).

Kallus gelişimini etkileyen diğer bir faktör olan bitki büyüme düzenleyicilerinin derişimlerinin de araştırıldığı bu denemelerde, eksplant kaynağının alındığı ortamda bulunan bitki büyüme düzenleyicisi ve ekildiği ortamdaki bitki büyüme düzenleyicisi de kallus gelişimini etkilemiştir. Örneğin; 1) 2 mg/L IBA: 2 mg/L 6-BA bitki büyüme düzenleyicinin bulunduğu G-5 ortamına, 1 mg/L GA₃ kullanılan G-2 ortamından alınan sürgün ucu eksplantı ekilmiş ve diğer bir uygulamada aynı G-5 ortamına bitki büyüme düzenleyici olmayan G-3 ortamından alınan sürgün ucu eksplantı ekilmiştir. G-2 ortamından (1 mg/L GA₃) alınan eksplantın ekildiği G-5 ortamı kallus gelişiminin (**19,64 ± 1,21**) en iyi olduğu ortamdır. 2) MS ortamında yapılan denemelerde de benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır. 2 mg/L IBA: 2 mg/L 6-BA bitki büyüme düzenleyicinin kullanıldığı M-5 ortamına, 1 mg/L GA₃ bulunan M-2 ortamından alınan sürgün ucu eksplantı ekilmiş ve

diğer bir uygulamada aynı M-5 ortamına bitki büyüme düzenleyici olmayan M-3 ortamından alınan sürgün ucu eksplantı ekilmiştir. M-2 ortamından (1 mg/L GA₃) alınan eksplantın ekildiği M-5 ortamı kallus gelişimin en iyi (**24,84 ±1,43**) olduğu ortamdır.

LS ortamın kullanıldığı denemelerde kallus gelişimi G B5 ve MS ortamlarına göre çok düşük kalmıştır. Ancak bitki büyüme düzenleyicilerinin derişimlerinin yüksek olduğu L-2 ortamında (2 mg/L IBA: 2 mg/L 6-BA) kallus gelişimin L-1 ortamına göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

- Kallus Kütlelerinden Dolaylı Organogenezle Sürgün Oluşumu

Skoog ve Miller (1957) *in vitro* ortamlarda hormonal kontrolün organ gelişimi üzerine etkili olduklarını ileri sürdüler. Geliştirdikleri prosedürler de tütün bitkisinin kök ve sürgünlerindeki farklılaşmanın oksin/sitokin oranına ve besi ortamına göre şekillendiğini rapor ettiler. Kullandıkları besi ortamlarında oksin oranının yüksek olması köklenmeyi teşvik ederken, sitokin oranının yüksek olması sürgün gelişimini teşvik etmiştir. Aynı oranda kullanılan oksin ve sitokin hormonlarının ise organize olmamış dokuların (kallus) gelişimini teşvik ettiği görülmüştür.

Tütün bitkisinde organ farklılaşmasını teşvik etmek için besi ortamlarına kinetin eklenmiş ve kallus kültürlerinden sürgün gelişimi sağlanmıştır. Sürgün gelişiminde kinetin ve IAA (Indol-3-Asetik Asit) hormonlarının etkilerinin araştırıldığı çalışmada oksin hormonunun sürgün gelişimini inhibe ettiği rapor edilmiştir. Tütün bitkisinde düşük miktarlarda (5 µM) kullanılan IAA sürgün farklılaşmasını baskılamıştır (Skoog, 1971).

Hububatlarla ilgili yapılan doku kültürü çalışmalarında 2,4-D içeren besi ortamından alınan kallus kültürleri kinetin ortamına aktarılmış organ farklılaşmasının başladığı görülmüştür (Saunders ve Bingham, 1972; Walker vd., 1978, 1979). Kinetin ve 2,4-D hormonlarının birlikte kullanıldığı besi ortamlarında kallus gelişimleri teşvik edilmiş; 1) kinetin oranının yüksek olduğu ortamlarda sürgün gelişimi başlarken, 2) 2,4-D oranının yüksek olduğu ortamlarda ise kök gelişimin başladığı tespit edilmiştir (Walker vd., 1979).

Bu çalışmada, oluşturulan kallus kültürlerinden sürgün gelişimini teşvik etmek için G B5, MS ve LS ortamları ile birlikte IBA, 2,4-D gibi oksin büyüme düzenleyicileri ve sitokin büyüme düzenleyici olarak ise kinetin kullanılmıştır. Oksin büyüme düzenleyicileri 1 mg/L kullanılırken, kinetin büyüme düzenleyicisi 2 mg/L olarak kullanılmıştır.

Dolaylı organogenez için kurulan denemelerde; G-6 ortamında oluşan sürgün sayısı **106 ± 6** ve G-6 ortamında bitki büyüme düzenleyici olarak 1 mg/L IBA ile 2 mg/L kinetin,

G-7 ortamında oluşan sürgün sayısı 95 ± 2 ve G-7 ortamında 1 mg/L 2,4-D ile 2 mg/L kinetin, M-6 ortamında oluşan sürgün sayısı 114 ± 9 ve M-6 ortamında 1 mg /L IBA ile 2 mg/L kinetin, M-7 ortamında oluşan sürgün sayısı ise 97 ± 6 ve M-7 ortamında ise 1 mg/L 2,4-D ile 2 mg/L kinetin birlikte kullanıldı.

LS besi ortamı içerikli L-3 ve L-4 ortamlarında ise sürgün gelişimi gözlenmemiştir.

- Somatik Embriyogenez Çalışmaları

In vitro somatik embriyogenez çalışmaları ilk önce *Daucus carota* bitkisi üzerinde yapıldı (Reinert, 1958, 1959; Steward vd., 1958).

Kohlenbach (1965) ve Lang ile Kohlenbach (1975, 1978) birlikte *Macleaya cordata*'nın mezofil hücrelerini izole ederek bunlardan embriyojenik kalluslar elde etmişlerdir. Bir besi ortamı içerisine eşit molar da (5 μ M) 2,4-D ve kinetin ilave edilmiş mezofil dokularından embriyogenik hücreler elde etmişlerdir. Aynı çalışmada kinetin (1 μ M) derişimi azaltılmış (1 μ M), 2,4-D' nin yerine 2 μ M IAA veya 0,01 μ M NAA (naftalin asetik asit) eklenmiş ve yine embriyojenik kallusların geliştiği görülmüştür.

Bu tez kapsamında somatik embriyogenez çalışmaları için G B5 ve MS ortamları ile birlikte oksin büyüme düzenleyicisi olarak 2,4-D ve sitokinin büyüme düzenleyici olarak ise kinetin kullanılmıştır. G-4, G-5 ve M-4, M-5 ortamlarında oluşmaya başlayan kalluslar sırasıyla; G-8 (5 mg/L 2,4-D), G-9 (5 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L kinetin) ve M-8 (5 mg/L 2,4-D), M-9 (5 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L kinetin) ortamlarına aktarılmıştır (Tablo 7).

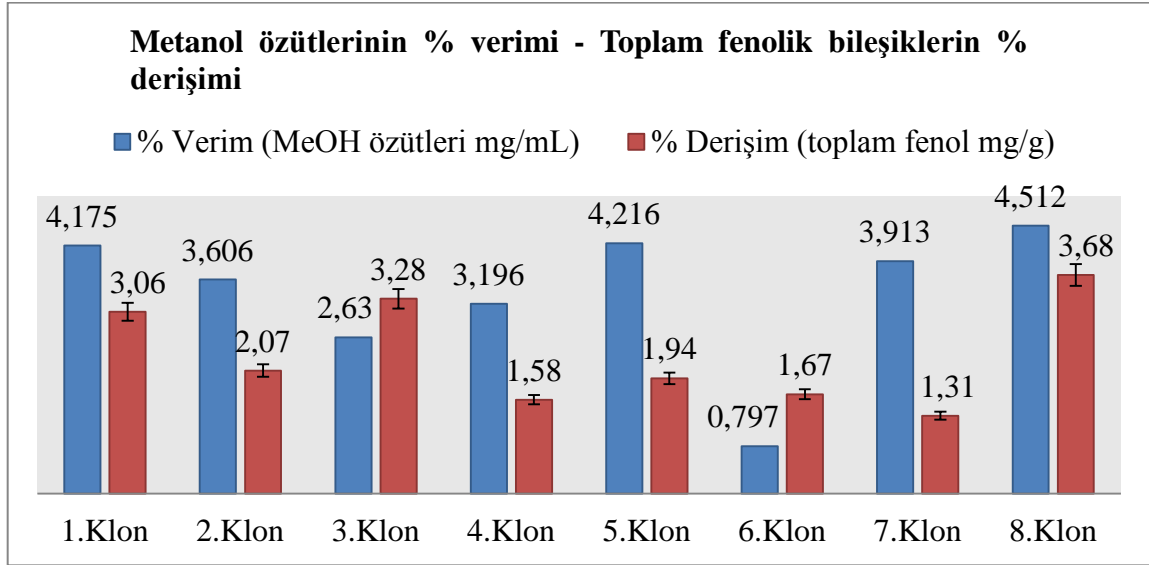
Somatik embriyoların olgunlaşması için oluşturulan G B5 ve MS içerikli besi ortamlarında oluşan somatik embriyo içerikli kallusların ağırlığı en yüksek G-5 ortamından G-9 ortamına aktarılan kaluslarda ($19,84 \pm 1,2$) ve M-5 ortamından M-9 ortamına aktarılan kalluslarda ($25,76 \pm 1,56$) tespit edilmiştir.

Ayrıca somatik embriyoların üzerinde oluşan köklenme oksin büyüme düzenleyicinin (2,4-D) etkisini göstermektedir (Şekil 24, 25, 26, 27).

- Toplam Fenol Miktarı

Metanol ekstraksiyonu ile hazırlanan *Satureja spicigera* ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları Folin- Ciocalteu yöntemine göre gallik asit standardı kullanılarak tayin edildi. 8 ayrı klonda $0,1839 \pm 0,0199$ (8. klon) - $0,0657 \pm 0,0006$ (7. klon) GA/g arasında değişen derişimler de toplam fenolik madde miktarı bulundu. Fenolik asitler ve polifenoller bol miktarda hidroksil grubu içeren bileşikler olup polar yapıdadırlar ve bu nedenle de polar çözücülerde çözünürler. Metanol polaritesi sudan daha düşük olmasına rağmen organik moleküller için çok ideal bir çözücüdür. Polar molekülleri çözebildiği gibi

nispeten düşük polariteli molekülleri de sudan daha iyi çözmektedir. Ancak zehirli olduğundan dolayı gıdaların hazırlanmasında ve gıda endüstrisinde kullanılmamaktadır. Fakat yapılan bilimsel araştırmalarda antioksidan kapasitenin belirlenmesinde en çok kullanılan ekstraksiyon çözücülerinden biridir. Şekil 39 'da metanol özütlerinin % verimi ve elde edilen % toplam fenol yer almaktadır.

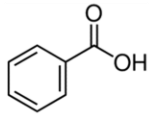


Şekil 39. MeOH özütlerinin % verimi - Toplam fenolik bileşiklerin % derişimi

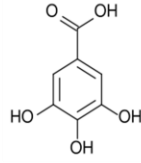
Folin-Ciocalteu yöntemi sadece ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarını gösteren bir testtir. Ayrı ayrı fenolik maddeleri tayin etmek için saf fenolik madde standartları kullanılarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin yapmak gerekir,

- HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analizi

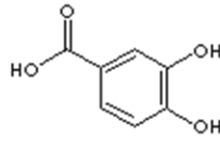
Bölüm 3.4.2' de *Satureja spicigera*'nın HPLC yöntemiyle belirlenen fenolik bileşen türleri ve nicel miktarları verilmiştir. Şekil 38' deki veriler göz önüne alındığında *Satureja spicigera*'nın 8 farklı klonunda 7 değişik fenolik bileşik tespit edildi.



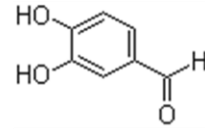
Benzoik asit



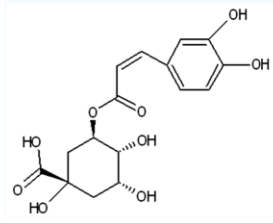
Gallik asit



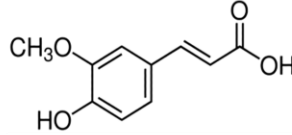
Protokatekuik Asit



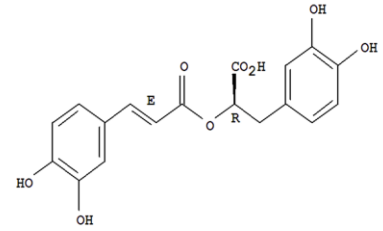
Protokatekualdehit



Klorojenik asit



Ferulik asit



Rozmarinik asit

Şekil 40. *Satureja spicigera* bitkisinin klonlarında tespit edilen fenolik bileşenlerinin kimyasal formülleri

Satureja spicigera özütlerinde özellikle protokatekualdehit ve klorojenik asit fenolik asit içeriği en fazla ve en yüksek olan bileşikler olarak tespit edilmiştir (Şekil 38).

Öte yandan, rozmarinik asit adlı fenolik bileşiğin değişik bitkilerin kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde üretildiğine dair çok sayıda çalışma mevcuttur (Zenk ve ark., 1977; De- Eknankul ve Ellis, 1984; Hippolyte ve ark., 1992; Petersen ve ark., 1994).

Literatür verilerine dayalı olarak her bitki için farklı bitki büyüme düzenleyicisi birleşimleri ve derişimlerinin optimum olduğunu söylemek doğaldır. Nitekim, Kintzios ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada *Salvia officinalis* ve *S. fruticosa* yaprak kallus kültürlerinin, eşit ve yüksek oranda oksin ve sitokinin kullanılması durumunda maksimum rozmarinik asit biriktirdiği rapor edilmiştir. Kim ve ark. (2001) tarafından yapılan bir başka çalışmaya göre ise, *Agastache rugosa* hücre süspansiyon kültürlerinde 5:1 oranında 2,4-D ve kinetin kullanılması durumunda maksimum rozmarinik asit miktarı elde edilebilmiştir. Özellikle ekonomik değeri çok yüksek (yaklaşık 16.000/kg USD) olan bu bileşiğin standardının sisteme eklenmesi ve 2. ve 4. klonlarda tespit edilmesi bu bilgileri doğrulamaktadır (Şekil 38).

Çalışmanın sonuçları şöyle özetlenebilir;

1. *S. spicigera*'nın tohumları iki farklı sterilizasyon yöntemine tabi tutulmuş ve en başarılı yöntemin H₂O₂ ile yapılan sterilizasyon yöntemi olduğu tespit edilmiştir. Tüm çalışma boyunca tohumların sterilizasyonu % **81 ± 1**' lik başarı sağlanan bu yöntemle geliştirilen prosedürle yapılmıştır.

2. *S. spicigera* bitkisinin tohumlarının canlılık testleri iki farklı uygulamadan sonra belirlenmiştir. Bu uygulamalar sonucunda; a) hiçbir müdahaleye tabi tutulmadan TZ testi uygulanan tohumlarda % **60 ± 4**, b) Sterilizasyondan sonra TZ testine tabi tutulmuş tohumlarda ise % **52±2**' lik canlılık tespit edilmiştir.

3. *S. spicigera* bitkisinin tohumlarının çimlendirilmesi için kurulan denemelerde 2 farklı yol denenmiştir. a) GA₃ kullanarak yapılan çimlendirmede sonuçlar G B5 ortamında **42 ± 3** ve MS ortamında **38 ± 3** olarak tespit edildi. b) Bitki büyüme düzenleyicisi kullanmadan yapılan çimlendirmedeki sonuçlar ise G B5 ortamında **34 ± 3** ve MS ortamında **28 ± 3** olarak tespit edilmiştir.

4. Kallus oluşumu teşvik etmek için G B5, MS ve LS besi ortamları ile birlikte büyüme düzenleyicisi olarak IBA ve 6-BA kullanılmıştır. Ortalama kallus ağırlıklarının hesaplandığı bu ortamlardan; G B5 serisinde ortalama en yüksek kallus ağırlığı (**19,64 ± 1,21 g/L**) G-5 ortamında, MS serisinde ortalama en yüksek kallus ağırlığı (**24,84 ± 1,43 g/L**) M-5 ortamında ve LS ortamında ise ortalama en yüksek kallus ağırlığı (**7,76 ± 1,15 g/L**) L-2 ortamında tespit edilmiştir.

5. Somatik embriyoların oluşmaya başladığı kallus kütlelerinde dolaylı organogenezle sürgün oluşumunu teşvik etmek için IBA, 2,4-D ve kinetinle desteklenmiş G B5, MS ve LS besi ortamları kullanılmıştır. Kallus parçaları üzerinde oluşan sürgünlerin sayılması sonucu; G B5 serisinde en fazla sürgün (**106 ± 4 adet**) G-6 ortamında ve MS serisinde en fazla sürgün (**114 ± 5 adet**) M-6 ortamında oluştu.

LS serisinden hazırlanan besi ortamlarında sürgün gelişimi tespit edilmedi.

6. Somatik embriyoların olgunlaşması için kurulan denemelerde G B5 ve MS besi ortamları ile birlikte 2,4-D ve kinetin büyüme düzenleyicileri kullanıldı. Somatik embriyo içerikli kallus ağırlıklarının tartılması sonucu; G B5 serisinde ortalama en yüksek ağırlık (**19,84 b1 ± 1,2 g /L**) G-9 ortamında ve MS serisinde ortalama en yüksek ağırlık (**25,76 ± 1,56**) M-9 ortamında ölçüldü.

7. *S. spicigara* bitkisinin 8 ayrı klonundan elde edilen metanol özütlerinde toplam fenol içeriği hesaplanmış ve % derişimlerin **% 3,68** (8. klon) ile **% 1,31** (7. klon) arasında değiştigi tespit edilmiştir.

8. HPLC cihazı ile 15 adet standardın kullanıldığı çalışmada 7 adet fenolik bileşik kalitatif ve kantitatif olarak tespit edildi. En fazla fenolik bileşen 4. klonda (**6 adet**) ve en yüksek ağırlık ise 6. klonda (**777,01 µg/g**) tespit edildi.

9. 400 mL dietileter ve 80 µL tetradekan bileşiği kullanılarak bir çözelti hazırlandı. Bu çözeltiden 3 tekrar olacak şekilde yaklaşık 17 mL alınarak, kuru bitki örnekleri üzerine eklendi. Bu işlem sonucunda elde edilen uçucu yağ verimi, en yüksek (**42,3 µg**) 1 mg/L 2,4-D + 2 mg/L kinetin içeren M-7 besi ortamında gerçekleşmiştir.

5. ÖNERİLER

S. spicigera bitkisinden başlatılan doku kültürleri ve bu bitkinin fidelerinden bazı fenolik bileşiklerin tespiti bu bitki özelinde yapılan ilk çalışmadır. Doku kültürlerinden organogenez, somatik embriyogenez ve fenolik bileşik analizi başarılmıştır. Bu aşamalardan sonra;

1) Tıbbi ve aromatik bitkiler doğadan toplanarak soyları tüketilmektedir. *In vitro*' da büyütülen somatik embriyolardan sertifikalı sentetik tohumlar üretilebilir. *In vitro* kültürlerle üretilen tohumlar *ex situ* gen bankalarında saklanabilir.

2) Bitkiler doğrudan (çimlendirme gibi) veya dolaylı organogenezle (kalluslardan) optimize edilerek dış ortama (aklimatizasyon) aktarılabilir. *In vitro* kültürlerde somaklonal varyasyonlar oluşabileceğinden dış ortama aktarılan klonlardan uçucu yağ veya fenolik bileşik verimi yüksek hatlar seçilebilir.

3) *S. spicigera* bitkisinden elde edilen özütlerde (uçucu yağ veya ekstraktlar) antimikrobiyal, antioksidant vb. aktivite testleri yapılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Ahloowalia, B. S., Prakash J., Savangikar V., A. ve Savangikar C., 2002. Plant Tissue Culture. Low Cost Options For Tissue Culture Technology in Developing Countries, FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food And Agriculture Proceedings of a Technical Meeting, Vienna, 3-10.
- Akhondzadeh, S., Noroozian., Mohammadi M., Ohadinia S., Jamshidi A. H. ve Khani M., 2003a. Melissa Officinalis Extract in The Treatment of Patients With Mild Moderate Alzheimer's Disease: A Double Blind, Randomised, Placebo Controlled Trial, Journal of Neurol Neurosurg Psychiatry, 74, 863–866.
- Akhondzadeh, S., Noroozian, M., Mohammadi, M., Ohadinia S., Jamshidi A. H. ve Khani M., 2003b. Salvia Officinalis Extract in The Treatment of Patients With Mild to Moderate Alzheimer's Disease: A Double Blind, Randomized and Placebo-Controlled Trial, Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 28, 53–59.
- Aydın, S., 2004. Anadolu Diyagonalı: Ekolojik Kesinti Tarihsel-Kültürel bir Farklılığa İşaret edebilir mi?, Kebikeç İnsan Bilimleri için Kaynak Araştırmaları Dergisi, 17, 117-137.
- Azar, M., Verette, E. ve Brun, S., 1987. Identification of some phenolic compounds in bilberry juice *Vaccinium myrtillus*, Journal of Food Science, 52, 1255 , 1257.
- Babaoglu, M., 2001. Bitki Biyoteknolojisi Cilt I-Doku Kültürü ve Uygulamaları- Bölüm 1. Temel Laboratuvar Teknikleri.
- Babaoglu, M., Yorgancılar, M. ve Akbudak, M., A., 2001. Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri, Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları, Babaoglu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (eds.) S. Ü. Vakfı Yayınları, ISBN 975-6652-04-7, Konya, s. 262-281.
- Bajaj, Y., P., S., 1985. Cryopreservation of Potato Somaclones, Somaclonal Variation and Crop Improvement. Proceedings of a seminar in the CEC programme of Coordination of Research on Plant Protein Improvement, held in Gembloux, Belgium, 3-5 September.
- Baser, K., H., C., 1993. Essential Oils of Anatolian *Labiatae*: A Profile. *Acta Horticulturae*, 333, 217-237.
- Baser, K., H., C., 1995. Tıbbi Bitkiler, Bilim ve Teknik, 331, Haziran, 76-79.
- Baser, K., H., C., Demirci, B. ve Duman, H., 2001. Composition of the essential oils of two endemic species from Turkey *Achillea lyconica* and *Achillea ketenoglui*, Chemistry of Natural Compounds, 37, 3, 245.

- Baser, K., H., C., 2002. Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey, Pure Appl. Chem., 74, 4, 527.
- Baytop, T., 1980. Genel Farmakognozi, İstanbul Üniversitesi Yayınları.
- Baytop, A., 1983. Farmasötik Botanik. İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları, 36, 282-285.
- Baytop, T., 1984. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi, İst. Üniv. Yay., İstanbul, 216 s.
- Baytop, T., 1984. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). İstanbul Üniversitesi Yayınları No.3255-Eczacılık Fakültesi No:40, Sanal Matbaacılık, 194-195.
- Baytop, T., 1990. Anadolu’da Bitkisel Drog Ticaretinin Tarihi, Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Dergisi, 53, 6.
- Baytop, T., 1997. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu Türk Dili Kurumu Yayınları, 578, ISBN: 975-16-0542-3, Ankara, 512 s.
- Baytop, T., 1997. Bitki Adları Sözlüğü, İstanbul Üniversitesi Yayınları.
- Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları (İlaveli İkinci Baskı). İstanbul, No.3255, Nobel Tıp Kitapevleri, 3-4,226.
- Baytop, T., 2001. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Geçmiste ve Bugün. Nobel Tıp Kitabevleri, II. Baskı ISBN: 975-420-021- 1.İstanbul, 480s,
- Bhojwani, S., S. ve Razdan, M.K., 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Pratic. Amsterdam, Elsevier.
- Bourgaud, F., Gravot A., Milesi S. ve Gontier E.. 2001. Production of Plant Secondary Metabolites: A Historical Perspective, Plant Science, 161, 839–851.
- Caplin, S. M., 1963. Effect of Initial Size on Growth of Plant Tissue Cultures, America Journal of Botany, 50,1, 91- 94.
- Ceylan, A., 1987. Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ içerenler), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Basımevi, Bornova-İzmir, 1.
- Ceylan, A., 1995. Tıbbi Bitkiler I, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Atölyesi, Bornova, İzmir, 312.
- Chu, C., Y. ve Huang, M.C., 1983. *In vitro* formation of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort.) plantlets through excised scape culture, Hort. Abst., 53 ,11, 779.
- Cimpan, G. ve Gocan, S., 2002. Analysis of medicinal plants by HPLC: recent approaches, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 25, 2225 - 2292.

- Cordell, G., A., Quinn-Beattie M. L. ve Farnsworth N. R., 2001. The Potential of Alkaloids in Drug Discovery, *Phytotherapy Research*, 15, 183- 205.
- Cox., P.A., 1990. *Ciba Found Symp.*, 154,40-7, 47-55.
- Çakırlar, H., Tıprıdamaz, R., Özkum, D. ve Çiçek, N., *In Vitro Üretilen (Kardelen) Galanthus elwesii* Hooker Fil. ve *G. ikariae* Baker. Soğancıklarının Köklendirilmesi ve Dış Koşullarda Geliştirilmesi, DPT/ 97/ K/ 121270 No' lu Proje, Temmuz, 46 s. 2000.
- Çubukçu, B., Meriçli, A., H., Mat, A., Sarıyar, G., Sütlüpinar, N. ve Meriçli, F., 2002. Fitoterapi, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, İstanbul, 1.
- Dabrowski, K., J. ve Sosulski, F., W., 1984. Quantification of free and hydrolyzable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 32, 123 - 127.
- Davis, P., H., 1982. Flora of Turkey and East Aegean Islands, Edinburg University Pres. Edinburg, 1, 297-313.
- Davis, P., H., 1985. Flora of Turkey and East Aegean Islands, Edinburgh University Pres. Edinburgh, 1-9.
- Davis, P., H., Mill, R.R. ve Tan, K., 1988. Flora of Turkey and The East Aegean Islands, Vol. 10, Edinburgh University Press. Edinburgh.
- Debergh, P., C. ve Read, P., E., 1993. Micropropagation. Micropropagation - Technology and Application, Debergh, P., C. ve Zimmerman, R., H (eds.), Kulwer Academic Publishers, Dordrec, Hollanda, 1-15.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Erik, S. ve Elarslan, R., 1989. Türkiye'nin Tehlike Altındaki Nadir ve Endemik Bitkileri, Türkiye Tabiatını Koruma Derneği Yayınları.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. ve Adıgüzel, N. 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı, Ankara (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler), Red Data Book Of Turkish Plants (*Pteridophyta* And *Spermatophyta*), 246, Ankara.
- Erik, S. ve Tarıkahya, B. 2004. Türkiye Florası Üzerine, Kebikeç İnsan Bilimleri İçin Kaynak Araştırmaları Dergisi, Alp Matbaası, Ankara, 17, 139-163.
- Evans, 1988. Applications of Somaclonal Variation, Biotechnology in Agriculture, 203-223.
- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A. ve Boskou, D., 2002. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory, J. Agric. Food. Chem., 50, 5294-5299.

- Farnsworth, N.R., 1990. The role of ethnopharmacology in drug development, *Ciba Found Symp.*, 154,2–21.
- Fowler, M., W., 1982. Substrate Utilisation by Plant Cell Cultures, *J. Chem. Tech. and Biotec.*, 32, 338-346.
- Fowler, M., W., 2006. Plants, Medicines and Man. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 86, 1797–1804.
- Frankel, N., E., Huang, S., Aeschbach, R. ve Prior, E., 1996. Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1, 131-135.
- Fulcrand, H., Remy, S., Souquet, J., M., Cheynier, V. ve Moutounet, M., 1999. Study of wine tannin oligomers by on-line liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Agricultural ve Food Chemistry*, 47, 1023 - 1028.
- Gamborg, O., L., Miller, R., A. ve Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp. Cell Res.*, 50, 151-158.
- Gerardi, C., Mita G., Grillo E., Giovinazzo G. ve Miceli A., 1998. *Alkanna tinctoria* T (Alkanets): *In vitro* Culture and the Production of Alkannin and other Secondary Metabolites. In: Bajaj Y. P. S., Eds., *Biotechnology in Agriculture and Forestry 41 Medicine and Aromatic Plants*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 14-27.
- Giri, A. ve Narasu M. L., 2000. Transgenic Hairy Roots: Recent Trends and Applications, *Biotechnology Advances*, 18, 1– 22.
- Giusti, M., ve Wrolstad, R., E., 2001. In *Current Protocols in Food Analytica Chemistry*, R.E. Wrolstad (Ed.), John Wiley and Sons, New York, NY, 1-13.
- Green, R., C., 2007. Physicochemical Properties and Phenolic Composition Of Selected Saskatchewan Fruits: Buffaloberry, Chokecherry And Sea Buckthorn, Doktora Tezi, Saskatchewan Üniversitesi, Kanada.
- Guenther, E., 1948. *The Essential Oils*. D. Van Nostrand, New York.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. ve Baser, K.H.C., 2000. Flora of Turkey and East Aegean Islands, Supplement II, Edinburgh Univ. Press., Vol 11, Edinburg, 618-619.
- Hammer, K., A., Carson, C., F. ve Riley, T., V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.
- Harborne, J., B., 1967. *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, Academic Press, New York, NY.
- Harborne, J., B. ve Williams, C. A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55, 481 - 504.

- Harborne, J., B., 1994. The Flavonoids Advances in Research Since 1986, Chapman & Hall/CRC, USA, 638.
- Hartman, H., T. ve Kester, D., E., 1975. Plant Propagation, Principles and Practices, Prentice-Hall. Inc., New Jersey.
- Harthman T., H., Kester D., E., Davies F., T. ve Geneve R., L., 2002. Callus, Cell and Protoplast Culture Systems: Plant Propagation, Principles and Practices. (7th Ed.) Prentice Hall Press, New Jersey 661- 665.
- Hertog, M., G., L., Hollman, P., C., H. ve Katan, M., B., 1992b. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits 286 commonly consumed in the Netherlands, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 2379 - 2383.
- Heywood, V., H., 1996. Flowering Plants of the World, BT Batsford Ltd., 239, London.
- Hickey, M. ve King, C., 1997. Common Families of Flowering Plants, Cambridge Univ. Pres., England, 119-127.
- Hu, C., Y. ve Wang, P., J., 1983. In: Handbook of Plant Cell Culture, Crop Species, 1, 177-227, Macmillan, New York,
- Huang M., C. ve Chu C.Y., 1987. A scheme for commercial multiplication of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort.) through shoot tip culture, Hort. Abst., 57 ,5, 374.
- Jackman, R., L., Yada, R. Y. ve Tung, M. A., 1987. A review: Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis, Journal of Food Biochemistry, 11, 279 - 308.
- Karp, A., 1990. On the Current Understanding of Somaclonal Variation, Oxford survey of Plant Molecular and Cell Biology, 7, 1-58.
- Kendir, G. ve Güvenç, A., 2010. Etnobotanik ve Türkiye’de Yapılmış Etnobotanik Çalışmalara Genel Bir Bakış, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 30, 1, 49-80.
- Kesici, T. ve Kocabaş, Z., 1998. Biyoistatistik, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Yayın 79, 287- 293, Ankara.
- Kırdag, S. ve Bağcı, E., 2000. *Picea abies*(L.) Karst. ve *Picea orientalis* (L.) Link uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi üzerine bir araştırma, Journal of Qafqaz University, 3,1, 183.
- Koçyiğit, M., 2005. Yalova İlinde Etnobotanik Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
- Könemann, B. 1999. The Illustrated A-Z of over 10,000 Garden Plants and How to Cultivate them. Botanica, Cheers Publication: Hong Kong, Gordon, 885.

- Krishna, P., S., J. ve Reddy G., P., 2005. Agricultural Biotechnology in Developing Countries: Nature and 'Code' in Meeting The Needs of Resource Poor, *Asian Biotechnology and Development Review*, 7, 3, 37- 53.
- Lietava, J., 1992. Medicinal plants in a Middle Paleolithic Grave Shanidar IV, *Journal of Ethnopharmacology*, 35, 3, 263.
- Liggins, J., Bluck, L., J., C., Coward, A. ve Bingham, S., A., 1998. Extraction and quantification of diadzein and genistein in food, *Analytical Biochemistry*, 264, 1- 7.
- Linsmaier, E., M. ve Skoog, F., 1965. Organic growth requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 18, 100-127.
- Lis-Balchin, M., 2006. Aromatherapy Science. A Guide for Healthcare professionals, Pharmaceutical pres., London, ISBN 0 85369 578 4, 462 p.
- Mabry, T., J., Markham, K. R. ve Thomas, M. B., 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, New York, NY. Merken, H. M. ve Beecher, G. R., 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 577 - 599.
- Magiatis, P., Skaltsounis, A., L., Chinou, I. ve Haroutounian, S. A., 2002. Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek Achillea species, 57, 287.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. ve Jimenez, L. 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Mann, J., 1987. Secondary Metabolism, Oxford University Press, Toronto, ON.
- Mansuroglu, S. ve Gürel, E., 2001. Mikroçogaltım, Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları, Babaoglu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (eds.) S. Ü. Vakfi Yayınları, ISBN 975-6652-04-7, Konya, 262-281.
- Mariska, I., Gati, E. ve Sukmadjaja, D., 1991. *In vitro* clonal propagation of gerbera, *Plant Breeding Abst.*, 61, 4, 499.
- Mastelic, J. ve Jerkovic, I., 2003. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L. *Food Chemistry*, 80, 135-140.
- Merken, H., M., ve Beecher, G., 2000. Measurement of food flavonoids by highperformance liquid chromatography: A review, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3, 577-599.
- Mulabagal, V. ve Tsay H. S., 2004. Plant Cell Cultures - An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2, 1, 29-48.

- Murashige, T. ve Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plantarum, 15, 473-497.
- Nakano, M., Niimi, Y., Kobayashi, D. ve Watanabe, A., 1999. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of hybrid tuberous begonia (*Begonia x tuberhybrida* Voss.), Sci. Hort., 79,3, 4, 245-251.
- Özhatay, N., Koyuncu, M., Atay, M. ve Byfield A., 1997. Türkiye'nin Doğal Tıbbi Bitkilerinin Ticareti Hakkında Bir Çalışma, Doğal Hayatı Koruma Derneği, İstanbul.
- Patil ve Malavika, 1968. Tetrazolium test for seed viability and vigour, Handbook of seed testing, 209.
- Pelkonen, V.P. ve Kauppi, A., 1999. The effect of light and auxins on the regeneration of lily (*Lilium regale* Wil.) cells by somatic embryogenesis and organogenesis, Int. J. Plant Sci., 160, 3, 483-490.
- Perry, E., K. ve Pickering A. T., 1999. Medicinal Plants and Alzheimer's Disease: From Ethnobotany to Phytotherapy, Journal of Pharm Pharmacology, 51, 527-534.
- Philipson, J., D., 1990. Plants as Sources of Valuable Products. In Secondary Products from Plant Tissue Culture, Edt. Charlwood, B .V. and Rhodes, M. J., Oxford, Clarendon Press, 1-22.
- Pierik, R. L. M., Voorst, A., Booy, G., Acker C.A.M., Lelivet, C.L.C ve Wit J.C., 1988. Vegetative propagation of *Alstroemeria* hybrids *in vitro*, Acta Hort., 226 , 1, 81-91.
- Preece, J., E. ve Sutter, E., G., 1993. Acclimatization of micropropogated plants to the green house and field. Micropropagation Thecnology and Application, Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 71-95.
- Price, K., R., Bacon, J., R. ve Rhodes, M., J., C., 1997. Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*Allium cepa*), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 938-942.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J. E. ve Komaitis, M., 2005. RPHPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts, Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 1190 - 1195.
- Robbins, R., J., 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical Methodology, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 2866 - 2887.
- Sadıkoğlu, N., 2002. *Origanum minutiflorum*' da Anatomik Araştırmalar, XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eylül, Malatya, Bildiriler Kitabı: 417.
- Sakar, M., K. ve Tanker, M., 1991. Fitokimyasal Analizler Tanım, Miktar Tayini ve izolasyon, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 67, 189.

- Satıl, F., Dirmenci, T. ve Tümen, G., 2002 a. Türkiye'de Ticareti Yapılan *Satureja* L. Türlerinin Doğadaki Durumu-II, XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eylül, Malatya, Türkiye, Bildiriler Kitabı: 132.
- Satıl, F., Dirmenci, T. ve Tümen, G., 2002. Türkiye'deki *Satureja* L. Türlerinin Ticareti Ve Doğadaki Durumu-I, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Mayıs, Eskişehir, Bildiriler Kitabı: 11-17.
- Savitha, B., C., Thimmaraju R., Bhagyalakshmi N. ve Ravishankar G.A., 2005. Different Biotic and Abiotic Elicitors Influence Betalain Production in Hairy Root Cultures of *Beta vulgaris* in Shake-flask and Bioreactor, Process Biochemistry, 41, 50–60.
- Schenk, R., U. ve Hildebrandt, A., C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, Can. J. Bot. 50, 199-204.
- Scholten, H., J. ve Pierik, R., L., M., 1998. Agar as gelling agent. Differential biological effects *in vitro*. Scientia Horticulturae, 77, 1, 2, 109-116.
- Schwenkel, H., G. ve Grunewaldt, J., 1988. *In vitro* propagation of *Cyclamen persicum* Mill., Acta Hort., 226, 2, 659-663.
- Shahidi, F. ve Naczki, M., 2004. Phenolics in Food and Nutraceuticals. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Singleton, V., L. ve Rossi, J., A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144 - 158.
- Sökmen, A. ve Gürel, E., 2001. Bitki Biyoteknolojisi, Edt. Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S. Bölüm 7, Sekonder Metabolit Üretimi, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 211-261.
- Suresh, B., Bais H. P., Raghavarao, S., Ravishankar, G.A. ve Ghildyal, N.P., 2005. Comparative Evaluation of Bioreactor Design Using *Tagetes patula* L., Hairy Roots as a Model System. Process Biochemistry, 40, 1509–1515.
- Taiz, L. ve Zeiger, E., 2002. Plant Physiology., Third Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, 690.
- Tanker, M., Tanker, N., Şarer, E., Atası, E., Şener, B., Kurucu, S. ve Meriçli, F., 1990. Result of Certain Investigation on the Volatile Oil Containing Plants of Turkey, Essential Oils for Perfumery and Flavours, Preceedings of an International Conference, May, Antalya, Bildiriler Kitabı: 16, 29.
- Tarakçı, S., 2006. Beykoz Civarındaki Tıbbi Özellik Taşıyan Bitkiler Üzerine Araştırmalar, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bil. Enstitüsü, İstanbul.

- Tasioula-Maragari, M. ve Okogeri, O., 2001. Isolation and characterization of virgin olive oil phenolic compounds by HPLC/UV and GC-MS, Journal of Food Science, 66, 530-533.
- Tepe, B. ve Sokmen, A., 2007. Production and optimization of rosmarinic acid by *Satureja hortensis* L. callus cultures, Natural Product Research, 21, 1133-1144.
- Teixeira, R. O., Camparoto, M. L., Mantovani, M. S. ve Vicentini, V. E. P., 2003. Assessment of medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in vitro and in vivo assays, Genetics and Molecular Biology, 26, 4, 551.
- Tıprıdamaz, R., Ellialtıoğlu, S. ve akırlar, H., 1999. Kardelenin (*Galanthus ikariae* Baker.) doku kültürü yoluyla çoğaltımı; eksplant tipi, ortam pH'sı ve karbonhidrat kaynağının soğancık oluşumuna etkisi, Tr. J. Agr. For., 23, 823-830.
- Tıprıdamaz, R., 2003. Rooting and acclimatization of *in vitro* micropropagated snowdrop (*Galanthus ikariae* Baker.) bulblets, Akdeniz Üniv. Ziraat Fak. Dergisi, 16, 2, 121-126.
- Turhan H., 1997. Salinity Studies in Potato (*Solanum tuberosum* L.). PhD Dissertation, The University of Reading. UK.
- Tümen, G., Satıl, F., Duman, H., Başer ve Kemal H.,C., 2000. Türkiye için iki yeni kayıt: *Satureja icarica* P.H. Davis, *Satureja pilosa* Velen., Turkish Journal of Botany, 24, 3, 211-214.
- URL-1, <http://www.ibreliler.com/tubives/bitki-07897-trabzonkekigi-zimparaakcaabat-trabzon-lamiaceae-satureja-spigig-c-koch-boiss.html>. 01 Kasım 2011.
- URL-2, http://www.turkherb.ibu.edu.tr/index.php?sayfa=1&tax_id=7897. 01 Kasım 2011.
- Werbrouck, S., P., O. ve Debergh, P.C., 1994. Applied aspects of plant regeneration (micropropagation), Plant Cell Culture – A Pratical Approach, Dixon, R.A and Gonzales, R.A. (eds.) Oxford Uni. Press., New York, 127-135.
- World Health Organization, 1979. Traditional Medicine, World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization, 1998. Guidelines for the Appropriate Use of Herbal Medicines. WHO Regional Publications, Western Pacific Series no. 23, Manila.
- World Health Organization, 2002. Traditional Medicine Strategy (2002-2005), Document HO/EDM/TRM/2002, 1, Geneva..
- Wrolstad, R., E., 2005. Bioactive Food Components. In: Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components. Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D. and Sporns, P. (eds). John Wiley and Sons, Incorporated. Hoboken, NJ, 459.

- Yeşilada, E., 2002. Hekim, Alternatif Tedavi ve Modern Tıp, Sted, 11, 6, 223.
- Yıldırım, Z., 1991. Androjenetik Patates Haploidleri Üzerinde Morfolojik ve Sitolojik Araştırmalar. Doktora Tezi, E.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Zeybek, N., 1985. Farmasötik Botanik, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:1, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 340.
- Zeybek, U. ve Zeybek, N., 2002. Farmasötik Botanik, Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematigi ve Önemli Maddeleri, 3 (Değiştirilmiş 3. baskı) Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornova, İzmir, 378.

7. EKLER

Ek 1. Murashige ve Skoog Besi Ortamı Kimyasal İçeriği (MS,1962)

Bileşikler	Miktar (mg/L)
Amonyum Nitrat (Susuz)	134
Borik Asit	3,0
Kalsiyum Klorit (Susuz)	113,24
Kobalt Klorit-6H ₂ O	0,025
Bakır Sülfat-5H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	37,26
Demir Sülfat-7H ₂ O	27,8
Magnezyum Sülfat (Susuz)	122,09
Manganez Sülfat-H ₂ O	10
Molibdik Asit, Disodyum-2H ₂ O	0,25
Potasyum İyot	0,75
Potasyum Nitrat	2500
Sodyum Fosfat (Susuz)	150
Çinko Sülfat-7H ₂ O	2,0
<i>myo</i> -Inositol	100
Nikotik Asit	1,0
Piridoksin-HCl	1,0
Tiamin-HCl	10

Ek 2. Linsmainer ve Skoog Besi Ortamı Kimyasal İçeriği (LS,1965)

Bileşikler	Miktar (mg/L)
Amonyum Nitrat (Susuz)	134
Borik Asit	3,0
Kalsiyum Klorit (Susuz)	113,24
Kobalt Klorit-6H ₂ O	0,025
Bakır Sülfat-5H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	37,26
Demir Sülfat-7H ₂ O	27,8
Magnezyum Sülfat (Susuz)	122,09
Manganez Sülfat-H ₂ O	10
Molibdik Asit, Disodyum-2H ₂ O	0,25
Potasyum İyot	0,75
Potasyum Nitrat	2500
Sodyum Fosfat (Susuz)	150
Çinko Sülfat-7H ₂ O	2,0
<i>myo</i> -Inositol	100
Nikotirik Asit	1,0
Piridoksin-HCl	1,0
Tiamin-HCl	10

Ek 3. Gamborg B5 Besi Ortamı Kimyasal İçeriği (G B5, 1968)

Bileşikler	Miktar (mg/L)
Amonyum Nitrat (Susuz)	134
Borik Asit	3,0
Kalsiyum Klorit (Susuz)	113,24
Kobalt Klorit-6H ₂ O	0,025
Bakır Sülfat-5H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	37,26
Demir Sülfat-7H ₂ O	27,8
Magnezyum Sülfat (Susuz)	122,09
Manganez Sülfat-H ₂ O	10
Molibdik Asit, Disodyum-2H ₂ O	0,25
Potasyum İyot	0,75
Potasyum Nitrat	2500
Sodyum Fosfat (Susuz)	150
Çinko Sülfat-7H ₂ O	2,0
<i>myo</i> -Inositol	100
Nikotirik Asit	1,0
Piridoksin-HCl	1,0
Tiamin-HCl	10

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Trabzon'da doğdu. 2002 yılında Affan Kitapçioğlu Lisesi'nden mezun oldu. 2003 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümüne girdi. 2008 yılında bu bölümden "Biyolog" ünvanıyla mezun oldu. 2009 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümün' de Yüksek Lisans Programına başladı. 2012 yılından itibaren özel sektörde "Proje Koordinatörü" olarak çalışmaktadır. İyi derecede İngilizce bilmektedir.