

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***ORIGANUM MINUTIFLORUM* O. SCHWARZ VE P. H. DAVIS (SÜTÇÜLER  
KEKİĞİ)'UN MİKROÇOĞALTIMI VE *IN VITRO* KOŞULLARDA ÜRETİLEN  
FİDELERİN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Songül TANRIVER**

**ŞUBAT 2013  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***ORIGANUM MINUTIFLORUM* O. SCHWARZ VE P. H. DAVIS (SÜTÇÜLER  
KEKİĞİ)'UN MİKROÇOĞALTIMI VE *IN VITRO* KOŞULLARDA ÜRETİLEN  
FİDELERİN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ**

**Biyolog Songül TANRIVER**

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04. 01. 2013**

**Tezin Savunma Tarihi : 19. 02. 2013**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN**

**Trabzon 2013**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Biyoloji Ana Bilim Dalında**

**Songül TANRIVER Tarafından Hazırlanan**

***ORIGANUM MINUTIFLORUM* O. SCHWARZ VE P. H. DAVIS (SÜTÇÜLER  
KEKİĞİ)'UN MİKROÇOĞALTIMI VE *IN VITRO* KOŞULLARDA ÜRETİLEN  
FİDELERİN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 22 / 01 / 2013 gün ve 1490 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN** .....

**Üye : Doç. Dr. Turan ÖZDEMİR** .....

**Üye : Yrd. Doç. Dr. Aykut SAĞLAM** .....

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“*Origanum minutiflorum* O. Schwarz ve P. H. Davis (Sütçüler Kekığı)’un mikroçoğaltımı ve *in vitro* koşullarda üretilen fidelerin fenolik bileşiklerin analizi” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmamın her aşamasında destek ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Atalay SÖKMEN’e uygulamaların gerçekleştirilebilmesi için laboratuvar ve malzeme desteği sağlayan kimya bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Münevver SÖKMEN’e ve sayın Prof. Dr Murat KÜÇÜK’e teşekkür ederim.

Yüksek lisansa başladığım ilk günden bu yana hep yanımda olan ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Ersan BEKTAŞ’a ve yardımlarından dolayı Gönül HATİPOĞLU’na, her daim yanımda olan desteğini ve dostluğunu esirgemeyen Arş. Gör. Mehmet DEMİRALAY’a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme, iyi dilekleriyle hep yanımda olan başta Adem TANRIVER’e, Eda ABBASOĞLU’na, Kübra SİVRİKAYA’ya, Ebru Kalaycıoğlu’na ve tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Songül TANRIVER  
Trabzon 2013

## TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*ORIGANUM MINUTIFLORUM* O. SCHWARZ VE P. H. DAVIS (SÜTÇÜLER KEKİĞİ)’UN MİKROÇOĞALTIMI VE *IN VITRO* KOŞULLARDA ÜRETİLEN FİDELERİN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Atalay SÖKMEN’in sorumluluğunda tamamladığımı, deneyleri ve analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı, 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. 04/01/2013

.....  
Songül TANRIVER

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa No:

ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. <i>Lamiaceae</i> Familyası.....	1
1.3. Türkiye’de Yetişen <i>Origanum</i> Türleri Hakkında Genel Bilgi.....	3
1.4. Doku Kültürü.....	4
1.5. Mikroçoğaltım .....	6
1.6. Bitkilerin Sekonder Metabolitleri.....	10
1.7. <i>Origanum minutiflorum</i> Hakkında Botanik Bilgiler .....	14
1.8. Amaç .....	15
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	16
2.1. Bitki Materyali .....	16
2.2. Metod.....	16
2.2.1 Kültür Ortamının Hazırlanmasında Kullanılan Besin Ortamları .....	16
2.2.2. Kültür Ortamına İlave Edilen Bitki Büyüme Düzenleyicileri.....	17
2.2.2.1. Oksinler .....	17
2.2.2.2. Sitokininler .....	18
2.3. Tohumların Canlılık Testi .....	18
2.4. Kültür Ortamının Hazırlanması.....	19
2.5. Bitki Tohumlarının Sterilizasyonu .....	19
2.5.1. Sodyum Hipoklorit Çözeltisi Kullanılarak Yapılan Sterilizasyon .....	20
2.5.2. Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) Kullanılarak Yapılan Sterilizasyon .....	20
2.6. <i>In vitro</i> ’da Tohumların Çimlendirilmesi .....	20

2.6.1.	BBD Kullanmadan Aydınlik Ortamda Yapilan Çimlendirme .....	20
2.6.2.	BBD Kullanmadan Karanlik Ortamda Yapilan Çimlendirme .....	21
2.7.	Çimlenen Tohumlardan Alinan Sürgün Eksplantlarıyla Kallus Oluşturma .....	22
2.8.	Sürgün Eksplantlarından Fideciklerin Oluşturulması .....	22
2.9.	Özütlerin Elde Edilmesi .....	23
2.10.	HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analizi .....	23
3.	BULGULAR .....	25
3.1.	Tohumların Canlılık Testi .....	25
3.2.	Sterilizasyon Yöntemi Seçimi .....	25
3.3.	<i>O. minutiflorum</i> Bitkisinin Tohumlarının Çimlendirilmesi .....	26
3.3.1.	BBD Kullanmadan Aydınlik Ortamda Yapilan Çimlendirme .....	26
3.3.2.	BBD Kullanmadan Karanlik Ortamda Yapilan Çimlendirme .....	28
3.4.	Çimlendirilen Sürgünlerden Alinan Eksplantlardan Kallus Oluşumu .....	30
3.5.	Çimlendirilen Sürgünlerden Alinan Eksplantlardan Sürgün Oluşumu .....	31
3.6.	Fenolik Bileşen Analizi .....	36
4.	TARTIŞMA.....	50
5.	SONUÇLAR .....	57
6.	ÖNERİLER .....	58
7.	KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ		

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

*ORIGANUM MINUTIFLORUM* O. SCHWARZ VE P. H. DAVIS (SÜTÇÜLER KEKİĞİ)  
MİKROÇOĞALTIMI VE *IN VITRO* KOŞULLARDA ÜRETİLEN FİDELERİN  
FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ

Songül TANRIVER

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Atalay SÖKMEN  
2013, 68 Sayfa

*Lamiaceae* familyasından olan *O. minutiflorum* O. Schwarz ve P. H. Davis bitkisinin sürgün ucu, internod ve yaprak eksplantlarının farklı besin ortamlarındaki büyüme parametreleri ve üretilen bu bitkiciklerin fenolik bileşiklerinin analizi incelendi. MS, ½ MS, ¼ MS, B5, ½ B5, ¼ B5 ortamlarında aydınlık ve karanlıkta çimlendirme yapıldı. Sürgün oluşumu ve gelişimi ile kallus oluşumu için uygun besin ortamları belirlendi. Bu bitkinin mikroçoğaltım potansiyeli; Murashige ve Skoog (MS; 1962), besi ortamı ve 6-Benzilaminopürin (6-BA), Thidiazuron (TDZ), Zeatin, Kinetin gibi bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak araştırıldı. En iyi çimlenme aydınlıkta MS ortamında tespit edildi. Aydınlık ortamda en yüksek kallus verimi 2 mg/L 6-BA + 2 mg/L IBA'da görüldü. En iyi sürgün gelişimi sürgün ucu eksplantlarından sağlandı. 1 mg/L 6-BA + 0,5 mg/L IBA ortamında en uzun sürgün gelişimi görüldü. Bu ortamdaki en uzun sürgün boyu 81 mm iken, 1 mg/L Zeatin + 0,5 mg/L IBA'da en uzun sürgün boyu 68,5 mm, 1 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IBA'da en uzun sürgün boyu 25,55 mm olarak belirlendi. *In vitro* koşullarda üretilen 8 haftalık fidelerden elde edilen özütlerden 3 fenolik bileşik (gallik asit, kaffeik asit, protokatekualdehit) HPLC ile analiz edildi.

**Anahtar Kelimeler:** *Origanum minutiflorum*, *in vitro*, mikroçoğaltım, kallus, fenolikler, HPLC



Master Thesis

SUMMARY

MICROPROPAGATION OF *ORIGANUM MINUTIFLORUM* O. SCHWARZ AND P. H. DAVIS (SÜTÇÜLER THYME) AND THE ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS OF THE PLANTLETS WHICH ARE PRODUCED *IN VITRO* CONDITIONS

Songül TANRIVER

Karadeniz Technical University  
The Graduate School and Applied Sciences  
Department of Biology  
Supervisor: Prof. Dr. Atalay SÖKMEN  
2013, 68 Pages

The growth parameters of shoot tips, internodal segments and leaf explants excised from an aromatic plant *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et P. H. Davis belonging to *Lamiaceae* family, have been exclusively evaluated by using different growth media, and the and analysis of phenolic constituents of the plantlets herewith were also investigated. Germination procedures were applied both in the light and the dark by using Murashige ve Skoog (MS, ½ MS, ¼ MS) and Gamborg's (B5, ½ B5, ¼ B5) basal media. The best suitable medium was determined for the germination, shoot formation and development and callus formation, individually. The micropropagation potential of this plant was investigated by using Murashige ve Skoog (MS; 1962) basal medium supplemented with various plant growth regulators (PGR), such as 6-benzlyamino purine (6-BA) , thidiazuron (TDZ) and kinetin. The best germination was observed on MS medium in the presence of light. The highest callus in light medium yields was observed on the same medium supplemented with 6-BA 2 mg/L and IBA 2 mg/L. The best shoot formation was obtained from the shoot tip explants being cultured on MS basal medium supplemented with 6-BA 1 mg/L + IBA 0,5 mg/L. The extracts obtained from the plantlets grown eight weeks *in vitro* were also analysed by HPLC for their three major phenolic constituents.

**Key Words:** *Origanum minutiflorum*, *in vitro*, micropropagation, callus, phenolics, HPLC

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No:

Şekil 1. Fenolik bileşiklerin halkasal yapısı .....	11
Şekil 2. <i>O. minutiflorum</i> 'un genel görünüşü.....	15
Şekil 3. Tetrazolyum bileşiğinin dehidrojenaz enzimiyle girdiği kimyasal tepkime.....	18
Şekil 4. Aydınlık ortamda çimlenen tohumların yüzde değerleri .....	28
Şekil 5. Karanlık ortamda çimlenen tohumların yüzde değerleri .....	30
Şekil 6. 1 mg/L Zeatin + 0,5 mg/L IBA hormon konsantrasyonu .....	35
Şekil 7. 1 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IBA hormon konsantrasyonu .....	35
Şekil 8. 1 mg/L 6-BA + 0,5 mg/L IBA hormon konsantrasyonu .....	35
Şekil 9. Farklı BBD'lerine ait ortamlardaki sürgün uzunluğu.....	36
Şekil 10. Seride çalışılan 16 fenolik standartın kromatogramı (280 nm) .....	37
Şekil 11. En yüksek fenolik verimin elde edildiği 4 numunesi ve 50 µM'lık standart karışımının karşılaştırılmış kromatogramları.....	38
Şekil 12. 1. Hat numunesinin kromatogramı (280 nm) .....	39
Şekil 13. 1. Hat numunesinde tespit edilen 1-9 nolu piklere ait DAD ile elde edilmiş spektrumlar (200-400 nm).....	40
Şekil 14. 2. Hat numunesinin kromatogramı (280 nm) .....	41
Şekil 15. 2. Hat numunesinde tespit edilen 1-4 nolu piklere ait DAD ile elde edilmiş spektrumlar (200-400 nm).....	42
Şekil 16. 3. Hat numunesinin kromatogramı (280 nm) .....	43
Şekil 17. 3. Hat numunesinde tespit edilen 1-4 nolu piklere ait DAD ile elde edilmiş spektrumlar (200-400 nm).....	43
Şekil 18. 4. Hat numunesinin kromatogramı (280 nm) .....	44
Şekil 19. 4. Hat numunesinin kromatogramı (280 nm), ana pik dışındaki bileşenlerin görülebilmesi için 0-30 mAU aralığı bölge gösterilmi.....	45
Şekil 20. 4. Hat numunesinde tespit edilen 1-10 nolu piklere ait DAD ile elde edilmiş spektrumlar (200-400 nm).....	46
Şekil 21. Gallik asit, siringik asit ve numunelerde gözlenen ana bileşene ait 200-400 nm arası spektrumlar .....	48
Şekil 22. HPLC ile tespit edilen fenolik bileşiklerin konsantrasyonları.....	49

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No:

Tablo 1. Çalışmada kullanılan temel besi ortamı içerikleri .....	17
Tablo 2. A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6 ortamlarının besin içerikleri .....	21
Tablo 3. K-1, K-2, K-3, K-4, K-5, K-6 ortamlarının besin içerikleri .....	21
Tablo 4. Sürgün eksplantlarından kallus oluşturmak için hazırlanan besin ortamı içerikleri	22
Tablo 5. Çimlenen tohumlardan oluşan sürgünlerin sürgün ucu, internod ve yaprak eksplantlarından fidecik oluşturmak için hazırlanan ortamlar .....	23
Tablo 6. <i>O. minutiflorum</i> bitkisinin TTC bileşiğiyle yapılan TZ testi .....	25
Tablo 7. <i>O. minutiflorum</i> bitkisinin tohumlarının sterilizasyon yöntem seçim sonuçları ....	26
Tablo 8. BBD kullanmadan aydınlık ortamda yapılan çimlendirme sonuçları .....	27
Tablo 9. BBD kullanmadan karanlık ortamda yapılan çimlendirme sonuçları .....	29
Tablo 10. Farklı besi ortamlarında oluşan kallus ağırlıkları .....	30
Tablo 11. Zeatin - IBA hormon kombinasyonlarındaki sürgün gelişimi .....	31
Tablo 12. TDZ - IBA hormon kombinasyonlarındaki sürgün gelişimi .....	32
Tablo 13. 6-BA - IBA hormon kombinasyonlarındaki sürgün gelişimi .....	33
Tablo 14. Sürgün ortamlarından kültüre alınan eksplantlarda görülen gelişmeler .....	34
Tablo 15. HPLC analizleri için hazırlanan özütlerin verimleri .....	37
Tablo 16. 1. Hat numunesinde tespit edilen bileşenlerin alıkonma zamanı (RT), pik alanı ve pik yüksekliği değerleri .....	41
Tablo 17. 2. Hat numunesinde tespit edilen bileşenlerin alıkonma zamanı (RT), pik alanı ve pik yüksekliği değerleri .....	42
Tablo 18. 3. Hat numunesinde tespit edilen bileşenlerin alıkonma zamanı (RT), pik alanı ve pik yüksekliği değerleri .....	44
Tablo 19. 4. Hat numunesinde tespit edilen bileşenlerin alıkonma zamanı (RT), pik alanı ve pik yüksekliği değerleri .....	47

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2,4-D	: Diklorofenoksi Asetik Asit
G-B5	: Gamborg Besi Ortamı
GC-MS	: Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi
G	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IAA	: İndol Asetik Asit
IBA	: İndol-3-Bütirik Asit
<i>İn vitro</i>	: Hücre Dışı (Laboratuar ortamı)
L	: Litre
LS	: Linsmainer ve Skoog Besi Ortamı
MG	: Miligram
MM	: Mililitre
MS	: Murashige ve Skoog Besi Ortamı
NAA	: Naftalen Asetik Asit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NM	: Nanometre
TDZ	: Thidiazuran
TTC	: 2, 3, 5-Trifenil Tetrazolyum Klorit
TZ	: Tetrazolyum Testi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Tıbbi bileşiklerin kaynağı olan bitkiler, antik çağ uygarlıklarından günümüzün gelişmiş modern toplumlarına kadar pek çok insan tarafından sağlığın korunmasında önemli bir araç olarak kullanılmıştır. Modern ilaçların % 50'den fazlasının doğal ürün kökenli olması, bu durumun günümüzde de etkin bir şekilde devam ettiğini göstermektedir. Örneğin, 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'ünün bitkileri tedavi amaçlı olarak kullanıldığı anlaşılmaktadır. Gelişmiş ülkelerde ise reçete ile satılan ilaçların yaklaşık % 2'i bitkisel kökenli kimyasallardır (Babaoğlu, 2002).

Türkiye'de tıbbi olarak kullanılan bitkilerin sayısının 500 civarında olduğu tahmin edilmektedir (Sarı ve Oğuz, 2000). Ancak, yapılan bir araştırmada, doğadan toplanarak ticareti yapılan bitki türlerinin sayısının 346 olduğu ve bunların 98'inin ihraç edildiği, 24'ünün endemik olduğu ve endemik türlerin 7'sinin de halen ihraç edildiği belirtilmektedir. Örneğin adaçayı, kekik, çöven ve şalbanın bazı türleri endemik olup ihraç edilen türlerdir. Yine; doğadan toplanan ve aktarlar, semt pazarları ve marketler aracılığıyla ticareti yapılan türlerin sayısının da 179 olduğu tespit edilmiştir (Özhatay vd., 1997). Türkiye'nin ihraç ettiği önemli tıbbi ilaç ve baharat bitkileri kekik, defne yaprağı, kimyon, anason, rezene tohumu, ardıç kabuğu, mahlep, çemen, biberiye, meyan kökü, nane, sumak, adaçayı ve ıhlamur çiçeğidir (Bayram vd., 2010).

### 1.2. *Lamiaceae* Familyası

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

veren aromatik bileşiklere sahip olmalarıdır (Başer, 1994; Korosou, 1997; Metcalfe ve Chalk, 1972).

Türkiye *Lamiaceae* familyasının önemli gen merkezlerinden biridir. Bu familyası ülkemizde 45 cinste yaklaşık 574 tür temsil edilir. Ülkemizdeki endemizm oranı yaklaşık % 44,5 olan bu familya, içerdiği takson sayısı bakımından Türkiye'nin en zengin üçüncü familyası konumundadır (Davis vd., 1982; Davis vd., 1988; Güner vd., 2000; Kahraman vd., 2009).

*Lamiaceae* familyası ekonomik yönden büyük öneme sahiptir. Sahip oldukları aromatik bileşikler ve temel yağlar sayesinde parfüm gıda sanayi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Clive ve Stace 1980; Estilai ve Hatemi, 1990). Bazı türler ticari olarak kültüre alınmaktadır. Bunların çoğu genellikle gıdalarda lezzet verici olarak kullanılan, *Mentha*, *Origanum*, *Thymus* cinsleri gibi Akdeniz orjinli aromatik bitkilerdir. Diğerleri ise içerdikleri zengin temel yağlar ve aromatik bileşiklerden dolayı parfüm ve ilaç sanayisinde kullanılan bitkilerdir (Watson ve Dallwitz,1978).

Türkiye'de "kekik" olarak tanımlanan ve bu amaçla 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 takson) cinsleri hem yayılış olarak hem de ekonomik olarak büyük önem taşımaktadır (Başer, 1994).

Tüm kekik benzeri kokuya sahip *Labiatae* familyası üyelerinin kekik olarak bilinmesi ve toplanması bazı endemik ve nadir türlerin aşırı toplanmalarıyla tehdit altına girmektedir. Toplayıcılar, aracılar ve dış satımcı firmalar kekik bitkilerinin doğal populasyonlarında büyük bir azalma olduğu görüşündedirler. Ticari amaçlarla doğadan toplanan bazı bitkilerin populasyonları üzerinde meydana gelen baskının bilinmemesi ve bu baskının izlenmemesi sonucu bu bitki türlerinin nesilleri tehlike altına girebilmektedir. Dünya üzerinde bulunan 25.000 bitki taksonu yok olma tehlikesi ile karşıkarşıyadır (Özhatay ve Atay, 1997, Sadıkoğlu, 2005).

### 1.3. Türkiye’de Yetişen *Origanum* Türleri Hakkında Genel Bilgi

Geleneksel bir baharat ve halk ilacı olan *Origanum* bitkisini eski Yunanlılar güzel kokularında, kozmetik ve ilaçlarda kullanırlar ve “dağların sevinci” anlamına gelen “oregano” adıyla anarlardı. *Origanum* kelimesi Yunanca oros: dağ ve ganos: süs kelimelerinden türemiştir. Genelde “oregano” veya origan terimleri botaniksel isimlerine göre daha yaygındır. Arnavutluk dilinde rigoni olan oregano terimi Arnavutlarca sık kullanılır (Xhuveli ve Lipe, 1996). *Origanum* olmayan birçok bitki uluslar arası pazarlarda “oregano” olarak bilinmektedir. Hatta bunlardan bazıları *Lamiaceae* familyasına bile ait değildir (Bejilali,1996).

Dünya üzerinde 50 kadar türle temsil edilen *Origanum* türleri çoğunlukla Akdeniz bölgesinde ve Balkanlarda yayılış gösterirler. *Origanum* türleri, birden fazla dik gövdesi olan, çok yıllık otsu veya yarı çalimsı bitkiler olup çiçekleri salkımsı veya gövde uçlarında toplu halde bulunmaktadır (Davis, 1982). Orta büyüklükteki çok yıllık bu bitkiler, genellikle sıcak iklimi sever ve kurak, besince zengin, çoğunlukla kireçli, topraklarda iyi yetişirler. Günümüzde *Origanum* türleri doğal olarak doğadan toplandıği gibi bazılarının çelikle ve tohumla üretimi de yapılmaktadır (Kokkini, 1996).

*Origanum*’lar ağrı kesici (analjezik), cinsel gücü azaltıcı (anafrodizyak), antioksidant, antispazmik, antiviral, antibakteriyal, gaz giderici, kalbi uyarıcı, terletici, sindirimi kolaylaştırıcı, idrar artırıcı, adet söktürücü, fungisidal, balgam söktürücü, müshil, sakinleştirici, midevi, tonik, yara iyileştirici etkilere sahiptir. *Origanum* günlük hayatımızda önemli bir rol oynamakta ve özel tadından dolayı birçok yiyeceklerde baharat olarak kullanılmaktadır. Ayrıca *Origanum*’lardan elde edilen kekik suyu astım ve kronik bronşit gibi hastalıklarda, zayıflamada, yüksek tansiyonda, şeker hastalığında, parazit dökmeye ve kan dolaşımını uyarmada kullanılmaktadır (Bernath; 1996; Kitiki, 1996; Sarı vd., 2002). *Origanum* cinsine ait türlerin kimyasal bileşenleri ile ilgili olarak yapılan çalışmaların çoğu uçucu yağ bileşenleri karvakol, timol,  $\gamma$ - terpinen gibi bileşiklere yöneliktir (Bernath; 1996, Alves-Pereira ve Fernandes –Ferreira, 1998; Socorro vd., 1998). Ayrıca güzel görünümünden dolayı *Origanum* türlerinin estetik amaçlı plantasyonlarda kullanılabilmeleri de söz konusudur (Kokkini, 1996).

Türkiye’de kekik olarak en fazla *Origanum* türlerine ait bitkiler toplanır. *Origanum* türleri arasında özellikle Ege, Akdeniz ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde yayılış gösteren İzmir kekiği (*O. onites*), İstanbul kekiği (*O. vulgare ssp. hirtum*), Sütçüler kekiği

(*O. minutiflorum*), Alanya kekiği (*O. majorana*, syn. *O. dubium*) ve Suriye kekiği (*O. syriacum* var. *bevanii*) ticari olarak büyük önem taşır (Başer vd., 1993; Baydar, 2007; Baydar vd., 2009).

#### 1.4. Doku Kültürü

Biyoteknolojinin kullanımı çok eski zamanlara uzanmaktadır. İlk kez Sümerler tarafından bira ve ekmek yapımında mayaların kullanılmasıyla başladığı bilinmektedir. (Krishna ve Reddy, 2005). Biyoteknoloji tanım olarak kısaca canlı organizmaların belirli amaçlar doğrultusunda teknolojiye 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. Biyoteknoloji, ekonomik öneme sahip bitki, hayvan ve mikroorganizmaların ıslahında değiştirilerek kullanılan bilimsel teknikler şeklinde de tanımlanabilmektedir (Persley vd., 1999).

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; steril şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik çeşitlilik 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 rutin olarak uygulanmaktadır (Babaoğlu vd., 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).



Tüm doku kültürlerinin başlangıç noktası eksplant denen bitki dokularıdır. Doku kültürü bitkilerin kök, gövde, petiyol, yaprak veya çiçek parçalarından olabilmekte ve başarı oranı türlere göre değişmektedir. Önemli olan eksplant olacak bitki parçası yüzeyinin tüm mikrobiyal kontaminasyonlardan arındırılmasıdır. Bitki hücrelerinde bölünme bakteri ve mantarlara kıyasla daha yavaş olmaktadır (Collin ve Edwards,1998). Yüksek oranda başarı için eksplantın hızlı hücre bölünmesine sahip iyi gelişen ve sağlıklı bitkilerden alınması gereklidir. Olgun ve yüksek oranda organize olmuş dokuların embriyogenesis kapasiteleri son derece düşük olmaktadır. Eksplant alınacak olan bitkilerin yetiştirme şartlarıda embriyogenesisin başarısında önemli rol oynamaktadır. Işık, nem, toprağın besin durumu ve mevsimsel faktörler etkili olmaktadır (Warren, 1991).

Doku kültüründe fizyolojik aşama, bitkinin doku kültürüne başladığında cevap verecek yeteneğe sahip olmasıdır. Kaynak bitki sağlıklı olmalı ve açıkça görülebilecek çürüme veya hastalık belirtilerinden uzak olmalıdır. Eksplant denen bitki, doku kültürü çalışmaları dolayısıyla dikkatle seçilmelidir. Daha genç olan dokular, daha aktif bölünürler ve kallus oluşturma yeteneği daha yüksektir. Hücreler aktif olarak bölünebilir olmalıdır ve dormansi periyoduna girme eğiliminde olmamalıdır (Collin ve Edwards, 1998).

Kültürü başlatmak ve kültürdeki bitki hücrelerini uzun süre korumak için veya kültüre edilmiş hücrelerden tam bitkileri rejenere etmek için gereken koşullar her bitki türü için farklıdır. Bir türün her varyetesi için de bireysel olarak belirlenmiş kültürel gereksinimler farklı olacaktır. Yirminci yüzyılda, bitki doku kültürü hakkında edinilen tüm bilgilere rağmen, her bir varyete için denemeler yapılarak, kültür koşullarının doğru olarak tanımlanması gerektiği belirtilmiştir (Collin ve Edwards, 1998).

Doku kültürünün gelişimi için eksplant steril bir besiyerinde inkübe edilmelidir. Besiyerinin bileşimi bitki hücrelerini güçlendirecek, hücre bölünmesini uyaracak ya da bireysel bitki organlarının gelişmesini sağlayacak şekilde ayarlanmalıdır. Oksin ve sitokinin gibi büyüme düzenleyicilerinin besiyerindeki yoğunluğu, doku kültürünün oluşumunu başlatıp başlatmayacağını ve sonradan nasıl gelişeceğini belirlemek için kritik bir değer olarak görünmektedir (Collin ve Edwards, 1998).

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).

İlk topraksız üretim şekli olan hidrofonikler (sulu çözeltiler içinde bitkilerin topraksız ortamlarda yetiştirilmesi), tüm bir bitkinin laboratuarda tam olarak formüle edilmiş besin ortamlarında yetiştirilebilmesi düşüncesini ve daha sonra da bitki organlarının benzer şekilde kültüre alınabilmesi fikrini doğurmuştur. Bu yolda en önemli adımlardan birisi besin ortamlarının geliştirilmesi ve tamamen steril şartlarda doku kültüründe kullanılmasıdır. Ayrıca zaman içinde çalışmaların organ ve doku gibi daha büyük parçalardan tek hücre kültürüne doğru yöneldiği görülmektedir. Bunun sonucunda, 1983 yılında bitkilere ilk gen transferi gerçekleştirilmiştir. Bu transferin gerçekleştirilmesinde doku kültürünün kullanılması gerekli olmuştur. Günümüzde bitki doku kültürleri bir çok alanda uygulanmaktadır (Babaoğlu vd., 2001).

### **1.5. Mikroçoğaltım**

Mikroçoğaltım; organize meristemlerden, henüz olgunlaşmamış veya olgunlaşmasını tamamlamış somatik hücrelerden direkt (organogenesis veya somatik embriyogenesis) veya indirekt (kallus, protoplast vb.) yollarla bitkilerin çoğaltılması ve köklendirilmesi işlemine genel olarak mikroçoğaltım denilmektedir. Eğer bitkilerin uygun besin maddeleri ihtiyaçları, hormon ve kültür istekleri yeterince biliniyorsa, mikroçoğaltım tekniği kullanılarak tüm bitki türlerinin üretilmesi mümkündür (Hartman ve Kester, 1975). ABD'de doku kültürünün ticari uygulaması 1970'de başlamış (orkidelerde ve süs bitkilerinde) ve bu yolla elde edilen ürünlerin pazar değeri bu gün yılda 15 milyar dolara ulaşmıştır. Daha az sürgün elde edilmesine rağmen uç ve yan meristemlerden kitle çoğaltım ticari olarak diğerlerinden daha fazla kullanılan bir metottur (Brown ve Thorpe, 1995).

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 hijyenik 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 prosedürü 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 ve 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.

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 olmaktadır (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, konsantrasyonu 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 bileşimi ve konsantrasyonlarında değişiklik olabilmektedir (Scholten ve Pierik, 1998).

Babaoğlu vd., (2001) günümüzde en çok kullanılan yapay besi ortamının, 1962 yılında Murashige ve Skoog tarafından geliştirilen Murashige ve 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 (B5) ise, Gamborg tarafından 1968 yılında, soya kallus kültürleri için geliştirilmiş, nitrat azotu yüksek bir ortamdır. Linsmainer ve 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 µmol. m<sup>-2</sup>. sn<sup>-1</sup> ışık ve çoğunlukla beyaz floresan lambalar optimum koşullardır (Werbrouck ve Debergh, 1994; Mansuroglu ve Gürel, 2001).

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-benzilaminopürin (6-BA) 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 konsantrasyonlarda (0,05-1,0 mg/L) etkili olduğu için umut veren bir sitokindir. İndol-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).

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 konsantrasyonu ve uygulama zamanı bu yöntemin başarısını belirler. Yüksek şeker konsantrasyonu (% 3-4) köklenmeyi ve bitkilerin kalitesini artırır. Adventif ve aksiller sürgün gelişimi ortamlarında sitokininin varlığı köklenmeyi engellemektedir (Mansuroglu ve Gürel, 2001).

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 embriyogenezi önemli ölçüde etkileyen temel faktörler arasındadırlar (Babaoğlu vd., 2001).

Somatik embriyo oluşturma frekansı bakımından türler arasında önemli farklılıklar gözlemlendiği gibi, aynı tür içerisindeki farklı genotip ve çeşitlerin dahi embriyo oluşturma kabiliyetleri farklı olmaktadır (Parrott vd.,1993). Besin ortamına ilave edilen büyüme düzenleyicilerden oksinler, somatik embriyo oluşumunu en fazla etkileyen bileşiklerdir. Embriyogenesis oluşumunu teşvik etmek için en fazla kullanılan oksin 2,4-D dir. Bunun yanı sıra  $\alpha$ -naftalenasetik asit (NAA) gibi oksinler de kullanılmaktadır. Oksinler somatik embriyogenesisi teşvik etmek için kullanılmalarına karşın, ortamda oksinin sürekli bulunması somatik embriyoların gelişimini engellemektedir (Parrott vd., 1993).

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. *İn 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).

### 1.6. Bitkilerin Sekonder Metabolitleri

Sekonder metabolitler, bitki hücresinin yapısında bulunan ve devamlılığın sağlanmasında temel göreve sahip olan karbonhidrat, lipid, protein ve nükleik asit gibi birincil metabolizma ürünlerinden farklılık gösterirler (Briskin, 2000).

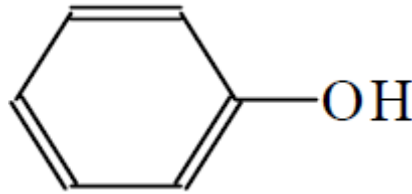
Sekonder metabolitler kimyasal olarak 3 farklı grupta toplanırlar. Bunlar terpenler, fenolikler ve alkaloidlerdir (Hartmann, 1996). Fakat organik kimyacılar, 1850'lerden beri yaygın bir şekilde bu ürünlerin kimyasal özelliklerini araştırmış ve her geçen gün bu yeni fitokimyasal ürünlere karşı gösterdikleri ilgiyi arttırmışlardır. Bugünkü çağdaş organik kimyanın temelini teşkil eden ayırıştırma tekniklerinin gelişmesi, bu doğal ürünler üzerine yapılmakta olan çalışmaları da teşvik etmiştir. Bu çalışmalar sonucunda sekonder metabolitlerin bitki bünyesindeki önemli ekolojik işlevi de yavaş yavaş aydınlatılmaya başlanmış ve bu kimyasalların bitkinin çevresiyle olan etkileşiminde oldukça önemli rolleri olduğu saptanmıştır. Geline son noktada, sekonder metabolitlerin bitkiyi herbivor ve patojen saldırılarına karşı koruduğu, allelopatide aktif rol oynadığı ve polinatörleri cezbeden önemli işlevlere sahip olduğu bilinmektedir (Babaoğlu, 2002).

Bitkilerin tedavi amacıyla kullanılması ise ilk uygarlıklara kadar dayanır. Bitkilerde elde edilen ilk etken madde 1805'te Alman Kimyacı Serturmer tarafından afyon bitkisinden izole edilen morfindir. Bunu 1820'de kınakının kabuklarından kinin, 1868'de yüksük otu (*Digitalis*) yapraklarından kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan digitalin ve 1890'da söğüt dalı kabuğundan asetilsalisilik asitin izolasyonu takip etmiştir. Daha sonraları doğal ilaçların sentetik türevleri sentezlenerek insanların hizmetine sunulmuştur. Bazı doğal ilaçların laboratuvarında sentezi pahalı bir işlem olduğu için hala bitkisel droglardan elde edilmektedir. Sentetik olarak elde edilen ilaçların istenmeyen yan etkilerinin olması, insanları tekrar doğal kaynaklı ilaçları kullanmaya yönlendirmiştir. Bitkisel drogların tedavide kullanılmasının başka bir üstünlüğü birkaç etkiye birden sahip olmalarıdır. Oysa sentetik ilaçlar sadece tek etkiye sahiptirler. Bu amaçla yeni doğal ilaç ham maddeleri bulmak üzere bitkiler üzerinde yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır (Baytop, 1984). Son yıllarda bitkiler kullanılarak gerçekleştirilen geleneksel

tedavi yöntemlerine adeta bir geri dönüş yaşanmış ve bu alan oldukça popüler hale gelmiştir (Cowan, 1999). 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).

Fenolik bileşikler adı verilen kimyasallar bitkilerin ürettiği ve esasen patojen, böcek ve herbivor saldırılarına karşı savunma amaçlı üretilen ürünlerdir (Taiz ve Zeiger, 2002). Fenolik bileşikler fenilalanin aminoasitinden türetilen sekonder metabolitlerin büyük bir grubunu oluşturur (Mann, 1987; Harborne, 1994). Bir bitkinin fenolik bileşimi genellikle bitki türlerine özgüdür ve büyüme iklimiyle değişebilir. İnsan tüketimi için bir bitkinin potansiyeli değerlendirilirken bu tür bileşiklerin potansiyel antioksidan aktiviteleri ve fenolik bileşimlerine bakılır (Manach vd., 2004). Bitkilerde 8.000'den fazla fenolik bileşik bulunur (Wrolstad, 2005).



Şekil 1. Fenolik bileşiklerin halkasal yapısı

Fenolik bileşiklerin, üretildikleri bitkilerde iki ana işlevi vardır. Bunlar fenolik asitlerde olduğu gibi patojen, böcek ve herbivor saldırısına karşı korunma ve flavonoidlerde olduğu gibi özellikle polen dağılımını sağlamak için çekicilik görevleridir. Bunların yanı sıra lignin de üç ayrı fenilpropanoit alkolden yani koniferil, kumaril ve sinapil alkollerden

kökenlenen bir fenolik polimerdir. Bitkilerdeki en önemli yapısal destek maddesidir. Lignin, hem yerçekimine karşı büyümeyi hem de topraktan su ve suda erimiş minerallerin bitkinin üst kısımlarına iletilmesini sağlar (Taiz ve Zeiger, 2002).

Bitki kökenli fenolik bileşikler, buldukları bitkilerden beslenebilecek diğer canlılar (böcekler, memeliler ve diğer herbivorlar) için caydırıcı etkilerde bulunurlar. Tanenler bunların en tipik örneğidir. İlginç olanı, insanların tadı yeterince buruk olan, elma, böğürtlen ve kırmızı şarap gibi tanen içeren yiyecekleri çoğu kez tercih etmeleridir. Son zamanlarda, kırmızı şaraptaki polifenollerin (tanenlerin) kan damarlarını daraltan bir sinyal molekül olan endotelin-1'in oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Corder vd., 2001). Şarap tanenlerinin bu etkisi sıkça sözü edilen kırmızı şarabın sağlık açısından yararlarının ve özellikle ölçülü kırmızı şarap tüketimine bağlı olarak kalp hastalığı riskinde görülen azalmanın nedenini açıklayabilir (Taiz ve Zeiger, 2002).

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).

Bitkiler çeşitli mekanik etkiler sonucunda kendilerine has bir koku verirler. Bu koku, bitkideki etkili maddenin hava ile teması sonucunda oluşur ve uçucu karakterdedir (Koç, 1999). Baharatlara özelliğini veren, başta aromayı sağlayan uçucu (uçucu yağlar gibi) bileşikler ile uçucu olmayan tat (alkaloitler gibi) ve renk (karotenoidler gibi) maddeleridir. Diğer tarım ürünleri ve gıdalarda olduğu gibi baharatlar da çok sayıda kimyasal bileşik içerir. Baharatların genel bileşimi başta iklim ve yetiştirilme şartları olmak üzere birçok etkene göre farklılık gösterir (Akgül, 1993).

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). Uçucu yağlar, bitkinin belirli organlarında veya bitkinin tüm organlarında



bulunabilmektedir (Ceylan, 1997). Bilhassa çiçek veya meyvalarda bulunsalarda diğer organlarda da sık sık rastlanır. Uçucu yağlar su buharı distilasyonu, organik çözücülerle tüketme veya sıkma yoluyla elde edilirler (Baytop, 1999). Anfloranj yöntemi de uçucu yağ elde etmede kullanılmaktadır (Ceylan, 1997).

Uçucu yağların etkileri, insan vücudunda (Spencer vd., 2004, Williams vd., 2004), yiyeceklerde (Zandi vd., 2000), kozmetik ve eczacılıkta (Moure vd., 2001) yapılan araştırmalarda da değerlendirilmiştir. Son yıllarda bitkilerin tıbbi olarak kullanımına olan ilgi artmıştır. Bitkilerin çok yönlü kullanılabilmesi sebebi ile elde edilen ilaçların biyolojik etkisini incelemek bir amaç haline gelmiştir (Evans, 1996).

Uçucu yağların ve türevlerinin antimikrobiyal etkileri uzun zamandır kabul edilmektedir (Shelef, 1983; Nychas, 1995; Özcan, 1998). Baharatların ve uçucu yağlarının antimikrobiyal, antifungal ve antioksidan etkilerini incelenmek amacıyla pek çok deneyler yapılmaktadır (Madsen vd., 1995).

Uçucu yağlar, farklı bileşenleri içeren kompleks karışımlar olduklarından biyolojik etkileri yönünden de farklılık göstermektedir. Etki dereceleri içerdikleri etken maddenin özelliğine bağlı olarak değişiklik gösteren pek çok uçucu yağın, antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu belirtilmektedir (Bağcı ve Dığrak, 1997).

Bugün doğada yetişen 300'e yakın bitki familyasından yaklaşık 1/3'ü uçucu yağ içermektedir (Ceylan, 1997). *Lamiaceae* familyasına ait bitkilerdeki uçucu yağlar (*Origanum*, *Thymus*, *Ocimum*, *Mentha*, *Rosmarinus*, *Sideritis*, *Salvia*) bazı mayalar ve bakterilerin gelişimlerini engeller ve bu özelliklerinden dolayı yiyeceklerin doğal koruyucusu konumundadırlar (Conner vd., 1984, Quattara, 1997).

Baharat ve uçucu yağlar; hazır yiyecek ürünlerine ilave edildiğinde gösterdikleri antimikrobiyal etki ile yiyeceklerin depolanma süresini arttırmaktadır (Faray vd., 1989). Bakteri ve küflere karşı antimikrobiyal etki gösteren uçucu yağlar mercanköşk, kekik, adaçayı, biberiye, karanfil, çörekotu, sarımsak ve soğana aittir (Nychas, 1995). Maya ve mantarların inhibe olmasını sağlayan yağların özellikle fenol, aldehit ve alkoller bakımından zengin olması gerekmektedir (Bruni vd., 2003).

Tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen uçucu yağların sentetik yolla elde edilenlere nazaran etkisinin çok yönlü olması, çevre ve insan sağlığına zararlı etkilerinin olmaması, ilaç sanayi yanında, gıda ve meşrubat, parfüm ve kozmetik endüstrisi ile aromaterapi gibi pek çok alanlarda kullanılması nedeniyle, dünyada her geçen yıl tüketimi artmakta, buna paralel olarak ülkemiz ekonomisinde de gelişmekte olan bir sektör olarak varlığını

sürdürmektedir. Türkiye uçucu yağ içeren bitkiler bakımından oldukça zengin bir floraya sahiptir ve yüzlerce farklı uçucu yağ bitkisi doğal olarak yetişmektedir (Öztürk vd., 2009).

### 1.7. *Origanum minutiflorum* Hakkında Botanik Bilgiler

35 cm'e kadar uzanabilen çok yıllık yarıçalıdır. İnce tüylüdür. Her gövde de 4'er cm lik 10 çift dal bulunur. Yapraklar saplı ya da sapsızdır (yaprak sapı 6 mm kadardır). Yapraklar ovat veya eliptiktir ve yaklaşık 3-16 x 1-12mm keskin sivri uçludur. İğneler yaklaşık 2-8x3 mm. Brakteler ovat ya da eliptik, 1-3 x 0,5-1,5 mm, nerdeyse küt uçlu. Kaliks yaklaşık 2 mm, üst dudak loblu veya boyunun yaklaşık 2/5'i kadar olabilen genişçe üçgen dişli; alt dudak aşağı yukarı üst dudak kadar uzun. Genişçe üçgen dişten oluşmaktadır. Korolla beyaz renkli, 2,5 - 4 mm. Tohumlar findıksı, yumurta biçimli, küçük 1 mm, düz ve kahverengi renklidir. Kayalık kireçli yamaçalarda 1500-1800m'de yayılış gösterir. Endemik, Doğu Akdeniz elemanıdır (Davis vd., 1982). Bitki 4 farklı gelişim dönemi göstermektedir. Bunlar:

1. Dönem: Çiçeklenme öncesi dönem (Mayıs-Haziran), 2. Dönem: Çiçeklenme dönemi (Temmuz-Ağustos), 3. Dönem: Tohum dönemi (Eylül-Ekim), 4. Dönem: Tohum sonrası Dönem (Kasım-Aralık)

Dünya kekik pazarında "Sütçüler kekiği" ve "Tota kekiği" olarak da bilinen yayla kekiği (*O. minutiflorum* O. Schwarz et. H. Davis) ülkemizde sadece Isparta ilinin Sütçüler yöresinde yayılış gösteren, yabani olarak yoğun bir şekilde toplanarak ihraç edilen endemik bir türdür. Kontrolsüz ve aşırı toplanması nedeniyle yoğunluğu her geçen yıl azalmaya başlayan bu tür, Türkiye'de geleceği tehdit altında olan ve acil olarak koruması gereken ilk 10 tür arasında gösterilmektedir (Özhatay vd., (1997). *O. minutiflorum*'un yöresel isimleri; Sütçüler -Isparta yöresinde Eşek kekiği, Antalya yöresinde Tota kekiği veya Yayla kekiğidir (Baytop, 1997). Sütçüler kekiği adıyla da bilinen türün çiçekli dal ve yaprakları, halk arasında baharat, soğuk algınlığı, boğaz enfeksiyonları, nefes açıcı, olarak kullanılmaktadır (Büyükgebiz, 2006).



Şekil 2. *O. minutiflorum* 'un genel görünüşü(URL-1)

### 1.8. Amaç

Bu çalışmada ülkemizde endemik olarak doğal koşullarda yetişen ve ekonomik değeri olan *O. minutiflorum* türünün kültüre alınması, *in vitro* koşullarda üretilmesi ve etkin bir üretime olanak sağlayacak optimal koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bitkilerin kültüre alınması ile doğadan toplanması sonucunda meydana gelebilecek tahribat engellenebileceği gibi aynı zamanda toplama sonucu gözlenen olumsuzluklar (yabancı madde karışması, ürünün saflığının bozulması, yanlışlıkla başka bitki toplanması vb.) ortadan kalkacaktır.

Ayrıca *O. minutiflorum*'un tohumları çok küçük ve çimlenmeleri çok yavaş olduğundan direkt tarlaya ekimde bazı güçlükler bulunmaktadır. Bu nedenle pek önerilmemektedir. Tohumların önce özel hazırlanmış fideliklere ekilmesi, buradan elde edilecek fidelerin tarlaya aktarılması en çok uygulanan ve önerilen yöntemdir. Bu sebeplerden dolayı bu türün kültüre alınması sağlanmıştır.

## **2. YAPILAN ÇALIŞMALAR**

### **2.1. Bitki Materyali**

Materyal olarak *O. minutiflorum* türü için ticari tohum alınmış ve kullanılmıştır.

### **2.2. Metod**

Araştırmada *O. minutiflorum* türüne ait tohumların yüzey sterilizasyonları farklı yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Steril tohumlar MS ve B5 besi ortamları ve bu ortamların çeşitli besin, sukroz ve agar derişimlerini içeren ortamlarda kültüre alınıp çimlenme ortamları tespit edilmiştir. Steril tohumlar farklı hormon kombinasyonlarına sahip MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Besin ortamlarının hazırlanması, tohumların sterilizasyonu, çimlendirilmesi ve eksplantların kültüre alınması ile ilgili yöntemler aşağıda ayrıntılı bir şekilde sunulmuştur.

#### **2.2.1 Kültür Ortamının Hazırlanmasında Kullanılan Besin Ortamları**

Çimlenme denemeleri için Gamborg'un B5 (Gamborg vd., 1968) ortamının çeşitli besin, sukroz (sakaroz) ve agar derişimleri ve yine MS'in (Murashige ve Skoog, 1962) çeşitli besin, sukroz ve agar derişimlerini içeren ortamlar kullanılmıştır. Sürgün oluşumu, gelişimi ve kallus oluşumu çalışmaları için bitki büyüme düzenleyicilerin farklı kombinasyonlarını içeren MS ortamları denenmiştir. MS ve B5 temel besin ortamlarının içerdikleri kimyasalları ve bu kimyasalların miktarları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan temel besi ortamı içerikleri (mg/L)

Temel besi ortamı bileşenleri	Murashige ve Skoog besi ortamı	Gamborg'un B5 besi ortamı
KNO <sub>3</sub>	1900	2500
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	250
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	150
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	150
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	10
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.30	-
KI	0.83	0.75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	3.00
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.60	2.00
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.80	27.80
Na <sub>2</sub> EDTA	37.30	37.30
Nikotink asit	0.50	1.00
Pridoksin-HCl	0.50	1.00
Thiamin-HCl	0.10	10.00
Myo-inositol	100	100
Glisin	2.00	-
Sukroz <sup>1</sup>	30.000	20.000

## 2.2.2. Kültür Ortamına İlave Edilen Bitki Büyüme Düzenleyicileri

### 2.2.2.1. Oksinler

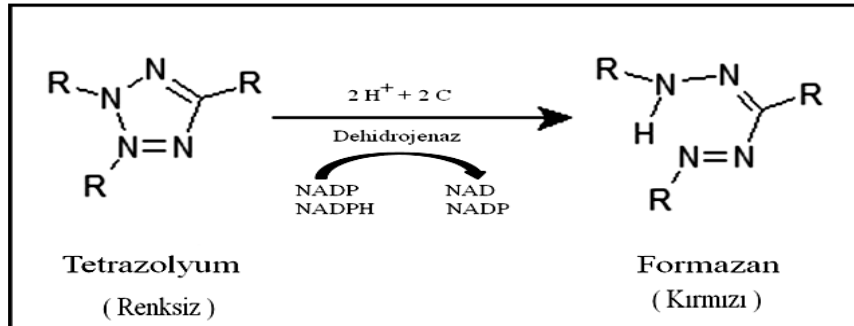
Yetiştirilen fideliklerin çoğaltılmasını, kök gelişimini, kallus oluşumunu teşvik etmek amacı ile MS ortamlarında indol-3-bütirik asit (IBA), sitokininlerle birlikte kullanılmıştır. Kallus oluşturmak için 1 mg/L ve 2 mg/L IBA kullanılırken; sürgün oluşumunda 0,1 mg/L ve 0,5 mg/L IBA kullanılmıştır.

### 2.2.2.2. Sitokininler

Çimlendirilen tohumlardan oluşan fideciklerin sürgün/kök gelişimini, kallus gelişimini teşvik etmek amacı ile MS, ortamına 6-Benzilaminopürin (6-BA veya BAP), Zeatin, TDZ (Thidiazuron), Kinetin (6-Furfurilaminopürin) gibi bitki büyüme düzenleyicileri farklı konsantrasyonlarda ilave edilerek kullanılmıştır. Kallus oluşumunu teşvik etmek amacıyla 1 mg/L ve 2 mg/L Kinetin kullanılmıştır. Sürgün oluşumunu teşvik etmek için; 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L Zeatin, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L TDZ, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L 6-BA IBA ile birlikte kullanılmıştır. Kallus oluşumunu teşvik etmek için 1 mg/L ve 2 mg/L Kinetin kullanılmıştır.

### 2.3. 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<sub>2</sub>O) ile çözelti oluşturduğunda renksiz bir halde bulunmaktadır, canlı dokularda bulunan dehidrojenaz enzimiyle tepkimeye girdiğinde ise formazan bileşiğine dönüşür (Şekil 3). 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 3. Tetrazolyum bileşiğinin dehidrojenaz enzimiyle girdiği kimyasal tepkime

*O. minutiflorum*'un tohumları iki farklı muameleden sonra; 1) Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ile sterilizasyondan sonra, 2) 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 hazırlanmıştır. İki ayrı gruba ayrılan *O. minutiflorum* 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) ayrılmıştır. Her iki şekilde ayrılan tohumlar bir petri kabına koyulmuştur. Daha önce hazırlanan TTC bileşiğinden bir miktar alınıp tohumlar kapanıncaya kadar eklenmiştir. Tohumlar bu bileşikte karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. Petri kabı içindeki tohumlar mikroskop (binoküler) altında bistürü yardımıyla tek tek açılarak renk değişimi gözlenmiştir.

#### **2.4. Kültür Ortamının Hazırlanması**

Çalışmamızda MS ve B5 besin ortamları kullanılmıştır. Makro, mikro besin elementleri ve vitaminleri içeren bu ortamlar firma (Sigma) önerisi doğrultusunda sırasıyla 4,41 g/L, 3,2 g/L tartılıp 1000 mL deiyonize su ( $dH_2O$ )'da çözülmüştür. 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 ayarlanmıştır. Ortamlar 8 g/L agar ilave edilerek katılaştırılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicileri otoklavdan önce belirli kombinasyon ve konsantrasyonlarda ilave edilmiş, ortamlar otoklavda 1 atm basınçta 121 °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.

#### **2.5. Bitki Tohumlarının Sterilizasyonu**

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

### 2.5.1. Sodyum Hipoklorit Çözeltisi Kullanılarak Yapılan Sterilizasyon

Bu sterilizasyon yönteminde Domestos adlı ticari çamaşır suyu kullanılmıştır. 20 mL çamaşır suyuna 80 mL dH<sub>2</sub>O eklenerek % 20'lik bir çözelti hazırlanmıştır. *O. minutiflorum* tohumları delikli bir eppendorfa alındı. Sonra bu eppendorf çözeltinin bulunduğu kaba bırakılarak bir manyetik karıştırıcı üzerinde 10 dk. boyunca karıştırılmıştır. Sterilizasyona tabi tutulan tohumlar daha önce hazırlanan MS besin ortamına sırasıyla; her magentaya 20'şer tane tohum gelecek şekilde 6 magentaya (6\*20\*=120 tohum) 120 tohum ekilmiştir.

### 2.5.2. Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Kullanılarak Yapılan Sterilizasyon

10 mL dH<sub>2</sub>O, 0,5 g sukroz ile karıştırılarak % 5'lik sukroz çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 2 mL alınarak daha önce hazırlanan, 120 tane tohumun bulunduğu eppendorf üzerine eklenmiştir. 12 saat boyunca buzdolabında bekletilen tohumların içinde bulunan sukroz çözeltisi bir pipetör yardımıyla eppendorf içinden çekilmiştir. Eppendorf içindeki tohumlara kapanacak kadar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenip 30 dk. buzdolabında bekletilmiştir. Buzdolabından alınan tohumlar daha önce hazırlanan MS besin ortamına; sırasıyla her magentaya 20'şer tane tohum gelecek şekilde altı magentaya (6\*20\*=120 tohum) 120 tohum ekilmiştir.

## 2.6. *In vitro*' da Tohumların Çimlendirilmesi

*O. minutiflorum* tohumlarını çimlendirmek için bitki büyüme düzenleyicisi kullanılmadan hazırlanan B5 ve MS besin ortamları kullanılmıştır. Bu ortamlar için besiyerinin, sukrozun ve agarın çeşitli derişimleri kullanılarak aydınlık ve karanlık ortamda çimlendirme yapılmıştır.

### 2.6.1. BBD Kullanmadan Aydınlik Ortamda Yapılan Çimlendirme

Herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi (bbd) kullanılmadan MS ve B5 ortamları kullanılmıştır. Bu ortamlar için besiyerinin, sukroz ve agarın çeşitli derişimleri kullanılarak aydınlık ortamda çimlendirme yapılmıştır. Bu ortamlar için A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6



sembolleri kullanılarak adlandırılma yapıldı (Tablo 2). Hazırlanan bu ortamların her biri için 3 magentanın her birine 20 tohum ekildi ve aydınlık ortamda üç hafta bekletilmiştir.

Tablo 2. A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6 ortamlarının besin içerikleri

Gruplar	Ortam	Sükroz	Katılaştırıcı ajan
A-1	4,41 g/L MS	20 g/L	8 g/L agar
A-2	2,205 g/L MS	10 g/L	4 g/L agar
A-3	1,1025 g/L MS	5 g/L	2 g/L agar
A-4	3,2 g/L B5	20 g/L	8 g/L agar
A-5	1,6 g/L B5	10 g/L	4 g/L agar
A-6	0,8 g/L B5	5 g/L	2 g/L agar

### 2.6.2. BBD Kullanmadan Karanlık Ortamda Yapılan Çimlendirme

Herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi kullanılmadan (bbd) MS ve B5 ortamları kullanılmıştır. Bu ortamlar için besiyerinin, sükroz ve agarın çeşitli derişimleri kullanılarak karanlık ortamda çimlendirme yapıldı. Bu ortamlar için K-1, K-2, K-3, K-4, K-5, K-6 sembolleri kullanılarak adlandırılma yapılmıştır (Tablo 3). Hazırlanan bu ortamların her biri için 6 magentanın her birine 10 tohum ekilmiştir. Aliminyum folyo ile sarılan magentalar karanlık ortamda üç hafta bekletilmiştir.

Tablo 3. K-1, K-2, K-3, K-4, K-5, K-6 ortamlarının besin içerikleri

Gruplar	Ortam	Sükroz	Katılaştırıcı ajan
K-1	4,41 g/L MS	20 g/L	8 g/L agar
K-2	2,205 g/L MS	10 g/L	4 g/L agar
K-3	1,1025 g/L MS	5 g/L	2 g/L agar
K-4	3,2 g/L B5	20 g/L	8 g/L agar
K-5	1,6 g/L B5	10 g/L	4 g/L agar
K-6	0,8 g/L B5	5 g/L	2 g/L agar

## 2.7. Çimlenen Tohumlardan Alınan Sürgün Eksplantlarıyla Kallus Oluşturma

*İn vitro*'da çimlenen tohumlardan oluşan fidelerden alınan yaklaşık 1 cm<sup>2</sup> lik sürgün ucu eksplantları, kallus oluşumunu teşvik etmek için, MS besin ortamlarına ekilmiştir. Kallus ortamı için 1:1 oranında IBA - 6-BA'dan iki ortam, 1:1 oranında IBA - Kinetin'den iki ortam olmak üzere 4 farklı ortam oluşturulmuştur.

Tablo 4. Sürgün eksplantlarından kallus oluşturmak için hazırlanan besin ortamı içerikleri

Gruplar	Ortam	Sükroz	Katılaştırıcı ajan	Oksin	Sitokinin
S-1	4,41 g/L MS	20 g/L	8 g/L agar	1 mg/L IBA	1 mg/L 6-BA
S-2	4,41 g/L MS	20 g/L	8 g/L agar	2 mg/L IBA	2 mg/L 6-BA
S-3	4,41 g/L MS	20 g/L	8 g/L agar	1 mg/L IBA	1 mg/L Kinetin
S-4	4,41 g/L MS	20 g/L	8 g/L agar	2 mg/L IBA	2 mg/L Kinetin

## 2.8. Sürgün Eksplantlarından Fideciklerin Oluşturulması

Çimlendirme ortamlarında kültüre alınan tohumlardan gelişen sürgünlerin sürgün ucu, internod ve yaprak eksplantları MS ortamında 3 farklı hormon gruplarında kültüre alınmıştır. Zeatin - IBA, TDZ - IBA, 6-BA - IBA'dan oluşan grupların her biri için ayrı ayrı 6 hormon kombinasyonları hazırlanmıştır. Toplamda 18 farklı ortam oluşturuldu. Her ortam için bir magentaya on sürgün ucu eksplantı, bir magentaya on internod eksplantı bir magentaya on yaprak eksplantı ekilmiştir. Üç tekerrürlü denemeler 18 ortamın her birine uygulandı. 6 hafta sonra her grup içinde en iyi sürgün gelişimi gösteren ortamlar gözlemlenmiştir. Zeatin - IBA, TDZ - IBA ve 6-BA - IBA grupları içinde en iyi sürgün gelişimi gösteren hormon konsantrasyonu kullanılarak alt kültür yapılmıştır. Sekiz hafta sonra bu bitkiciklerin fenolik bileşikleri tespit edilmiştir.

Tablo 5. Çimlenen tohumlardan oluşan sürgünlerin; sürgün ucu, internod ve yaprak eksplantlarından fidecik oluşturmak için hazırlanan ortamlar

Zeatin - IBA		TDZ - IBA		6-BA - IBA	
0,5 mg/L Zeatin	0,1 mg/L IBA	0,5 mg/LTDZ	0,1 mg/L IBA	0,5 mg/L6-BA	0,1 mg/L IBA
1 mg/L Zeatin	0,1 mg/L IBA	1 mg/LTDZ	0,1 mg/L IBA	1 mg/L 6-BA	0,1 mg/L IBA
2 mg/L Zeatin	0,1 mg/L IBA	2 mg/LTDZ	0,1 mg/L IBA	2 mg/L 6-BA	0,1 mg/L IBA
0,5 mg/L Zeatin	0,5 mg/L IBA	0,5 mg/LTDZ	0,5 mg/L IBA	0,5 mg/L6-BA	0,5 mg/L IBA
1 mg/L Zeatin	0,5 mg/L IBA	1 mg/L TDZ	0,5 mg/L IBA	1 mg/L 6-BA	0,5 mg/L IBA
2 mg/L Zeatin	0,5 mg/L IBA	2 mg/L TDZ	0,5 mg/L IBA	2 mg/L 6-BA	0,5 mg/L IBA

## 2.9. Özütlerin Elde Edilmesi

*In vitro*'da yetiştirilen *O. minutiflorum* bitkisinin sürgün hatlarından 2 farklı özüt hazırlanmıştır. 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 edilmiştir.

## 2.10. HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analizi

*In vitro*'da yetiştirilen *O. minutiflorum* bitkisinin 4 farklı sürgün hatlarının kuru örneklerinden 0,5'er g alınarak 3 saat boyunca metanolla ultrasonik banyoda özütleme yapılmıştır ve 40 °C'de rotary evaporatörde metanol uçurulmuştur. Kalıntı 5 mL deiyonize suda çözülerek etil asetat ve dietileter ile kısımlandırıldı ve organik fazlar birleştirilerek çözücüler uçurulmuştur. Kalıntı uygun miktarda metanolde çözülerek HPLC analizlerine geçilmiştir.

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 gerçekleştirilmiştir. Bileşenlerin nicel değerlendirmesinde enjeksiyon hacmi 20 µL olarak kullanılmış ve her bir bileşenin bilinen derişimlerinde hazırlanan standart karışımı kullanılmıştır. Aynı şartlarda koşturulan örnek ve standartların pik

alanlarının integrasyonu ile miktar analizi yapılmıştır. Nicel hesaplamalarda propil paraben HPLC’de iç standart olarak kullanılmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Tohumların Canlılık Testi

Canlılık testi için; 1) Sterilizasyona tabi tutulan tohumlar ve 2) herhangi bir müdahale yapılmadan test edilen normal tohumların TZ testi sonuçları Tablo 6'da verildi.

Tablo 6. *O. minutiflorum* bitkisinin TTC bileşiğiyle yapılan TZ testi

	Steril edilmeyen normal tohumlar (tane)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile steril edilen tohumlar (tane)
1. grup	16 canlı / 9 cansız	11 canlı / 14 cansız
2. grup	17 canlı / 8 cansız	15 canlı / 10 cansız
3. grup	21 canlı / 4 cansız	13 canlı / 12 cansız
4. grup	19 canlı / 6cansız	12 canlı / 13 cansız
	Toplam: 73 canlı / 27cansız	Toplam: 51 canlı / 49 cansız

Tablo 6'da ki bulgular incelendiğinde, TZ testine tabi tutulan tohumların; müdahale edilmemiş olanlarında canlılık oranının %  $73 \pm 2$  ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile sterilizasyona tabi tutulanlarda ise canlılık oranının %  $51 \pm 1$  olduğu tespit edilmiştir.

#### 3.2. Sterilizasyon Yöntemi Seçimi

İki farklı sterilizasyon yöntemi kullanarak kurulan denemelerde; 1) çamaşır suyu kullanarak yapılan sterilizasyon oranı %  $20 \pm 1,4$  iken 2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanarak yapılan sterilizasyonun oranı ise %  $78,3 \pm 1,16$ 'dır. Sonuçlar Tablo 7'de verilmiştir.

*O. minutiflorum* bitkisinin tohumlarını steril etmek için kurulan denemelerde sonuçlar incelendiğinde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanarak yapılan sterilizasyonda kontaminasyon riskinin en az olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar ele alındığında bu tez kapsamında doku kültürü çalışmalarında oluşturulan prosedürlerde tohumların sterilizasyonu için en uygun yöntemin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılarak yapılan sterilizasyon olduğu gözlenmiştir.

Tablo 7. *O. minutiflorum* bitkisinin tohumlarının sterilizasyon yöntemi seçim sonuçları

Gruplar	Çamaşır suyu kullanarak yapılan sterilizasyon	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kullanarak yapılan sterilizasyon
MS besi ortamı tane miktarı		
1. grup	8 ● / ○ 2	2 ● / ○ 8
2. grup	6 ● / ○ 4	1 ● / ○ 9
3. grup	9 ● / ○ 1	2 ● / ○ 8
4. grup	7 ● / ○ 3	4 ● / ○ 6
5. grup	8 ● / ○ 2	1 ● / ○ 9
6. grup	10 ● / ○ 0	3 ● / ○ 7

\* ●Kontamine olmuş besin ortamı, ○ kontamine olmamış besin ortamı

\* Her magentada 10 tane tohum bulunmaktadır

### 3.3. *O. minutiflorum* Bitkisinin Tohumlarının Çimlendirilmesi

#### 3.3.1. BBD Kullanmadan Aydınlik Ortamda Yapılan Çimlendirme

Herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi (bbd) kullanılmadan yapılan denemelerde B5 ve MS'in farklı besin, sükröz ve agar derişimleri içeren ortamlar için 6 tekrar yapılmıştır. Her bir magentaya 20 tohum ekilmiştir. Çimlenen tohum sayısı; MS de A-1 ortamında 76, A-2 ortamı olan ½ MS'te 70, A-3 ortamı olan ¼ MS'te 65'tir. B5 ortamı olan A-4'te çimlenen tohum sayısı 60, A-5 ortamı olan ½ B5'te 56, A-6 ortamı olan ¼ B5'te 39'dur. Çimlenmede en iyi ortamının MS olduğu görüldü. MS'in her ortamı B5'e göre daha iyi sonuç vermiştir (Tablo 8).

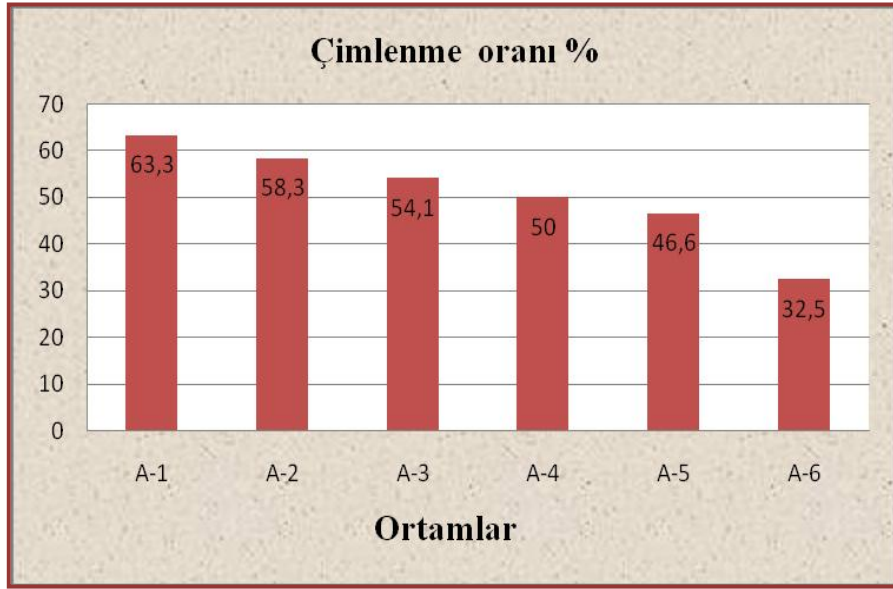
Tablo 8. BBD kullanmadan aydınlık ortamda yapılan çimlendirme sonuçları

Tohum durumu	MS ortamına ekilen tohum adeti						Gruplar	Çimlenme yüzdesi (%)
□	14	15	11	17	7	12	A-1	63,3 ± 3
■	6	5	9	3	13	8		
□	10	12	14	11	15	8	A-2	58,3 ± 2
■	10	8	6	9	5	12		
□	9	13	6	15	7	15	A-3	54,1 ± 4
■	11	7	14	5	13	5		
	B5 ortamına ekilen tohum adeti							
□	9	8	9	10	15	9	A-4	50 ± 2
■	11	12	11	10	5	11		
□	10	7	12	5	10	12	A-5	46,6 ± 2
■	10	13	8	15	10	8		
□	6	8	4	7	6	8	A-6	32,5 ± 1
■	14	12	16	13	14	12		

\* □ Çimlenen tohum ■ çimlenmeyen tohum

\*Her magentada 20 tane tohum bulunmaktadır

Elde edilen verilere göre MS ortamında çimlenme oranları daha fazladır. A-1, A-2, A-3 ortamları MS ortamları, A-4, A-5, A-6 ortamları B5 ortamlarıdır. Besiyeri miktarı, sükroz miktarı ve agar miktarı azalınca çimlenme oranları azalmaktadır. A-1 de tam içerikli MS besin ortamında çimlenme oranı % 63,3 ± 3, A-2'de ½ MS besin ortamında çimlenme oranı % 58,3 ± 2, A-3'te ¼ MS besin ortamında çimlenme oranı % 54,1 ± 4'dir. B5'tede aynı şekilde A-4'te tam içerikli B5 ortamında çimlenme oranı % 50 ± 2; iken A-5'te ½ B5 ortamında çimlenme oranı % 46,6 ± 2, A-6 da ¼ B5 besin ortamında çimlenme oranı % 32,5 ± 1'tir. Tüm durumlarda en iyi çimlenme oranı MS ortamındadır.



Şekil 4. Aydınlik ortamda çimlenen tohumların yüzde değerleri

### 3.3.2. BBD Kullanmadan Karanlık Ortamda Yapılan Çimlendirme

Herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi (bbd) kullanılmadan yapılan denemelerde B5 ve MS'in farklı besin, sükröz ve agar derişimleri içeren ortamlar için 3 tekrar yapılmıştır. Her bir magentaya 10 tohum ekilmiştir. Çimlenen tohum sayısı; MS de K- 1 ortamında 13, K-2 ortamı olan  $\frac{1}{2}$  MS'de 12, K-3 ortamı olan  $\frac{1}{4}$  MS'de 6'dır. B5 ortamı olan K-4'te çimlenen tohum sayısı 8, K-5 ortamı olan  $\frac{1}{2}$  B5'de 7, K-6 ortamı olan  $\frac{1}{4}$  B5'de 4'tür. Tablo 9'da da görüldüğü gibi çimlenmede en iyi ortamın MS olduğu görüldü. MS'in her ortamı B5'e göre daha iyi sonuç vermiştir.



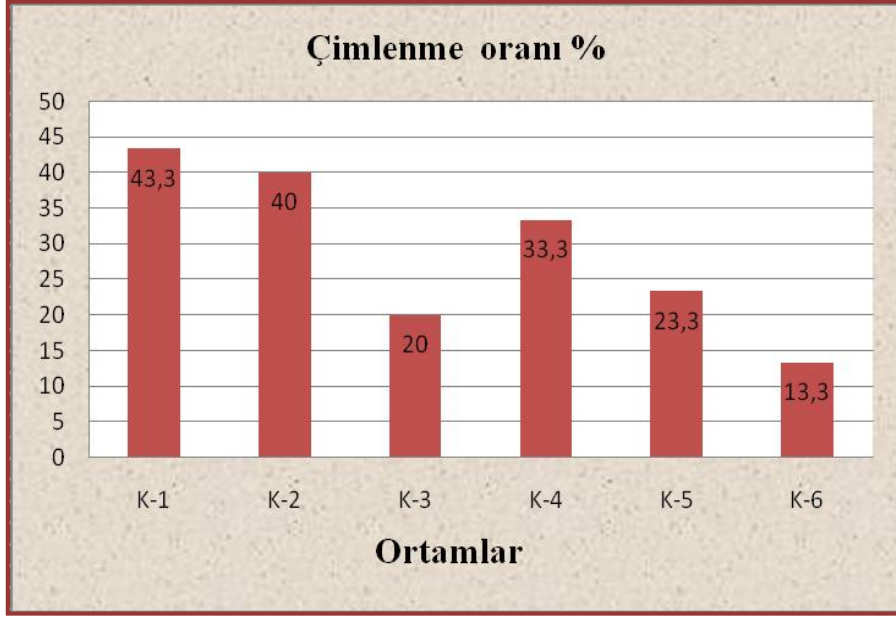
Tablo 9. BBD kullanmadan karanlık ortamda yapılan çimlendirme sonuçları

Tohum durumu	MS ortamına ekilen tohum adeti			Gruplar	Çimlenme yüzdesi (%)
□	5	3	5	K-1	43,3 ± 1
■	5	7	5		
□	4	5	3	K-2	40 ± 1
■	6	5	7		
□	1	3	2	K-3	20 ± 1
■	9	7	8		
B5 ortamına ekilen tohum adeti					
□	4	2	2	K-4	33,3 ± 1
■	6	8	8		
□	3	3	1	K-5	23,3 ± 1
■	7	7	9		
□	1	2	1	K-6	13,3 ± 0,5
■	9	8	9		

\* □ Çimlenen tohum ■ çimlenmeyen tohum

\*Her magentada 10 tane tohum bulunmaktadır

Çalışmamıza göre MS ortamında çimlenme oranları daha fazladır. K-1, K-2, K-3 ortamları MS ortamları, K-4, K-5, K-6 ortamları B5 ortamıdır. Besiyeri miktarı, sukroz miktarı ve agar miktarı azalınca çimlenme oranları azalmaktadır. K-1 de tam içerikli MS ortamında çimlenme oranı % 43,3 ± 1, K-2’de ½ MS besi ortamında çimlenme oranı % 40 ± 1, K-3’te ¼ MS besin ortamında çimlenme oranı % 20 ± 1 dir. B5’te de aynı şekilde K-4’te tam B5 besin ortamında çimlenme oranı % 33,3 ± 1, iken K-5’te ½ B5 besin ortamında çimlenme oranı % 23,3 ± 1, K-6 da ¼ B5 besin ortamında çimlenme oranı % 13,3 ± 0,5’tür. En iyi çimlenme oranı MS ortamındadır. Besiyeri miktarı, sukroz miktarı ve agar miktarı azalınca çimlenme oranları azalmaktadır.



Şekil 5. Karanlık ortamda çimlenen tohumların yüzde değerleri

### 3.4. Çimlendirilen Sürgünlerden Alınan Eksplantlardan Kallus Oluşumu

Kallus oluşturmak için kurulan denemelerde MS ortamı kullanılmıştır. Her bir ortam için iki farklı bitki büyüme düzenleyicisinden (bdd) oluşan kombinasyonda 3 tekrar olacak şekilde besin ortamları hazırlanmıştır. 4 hafta sonra oluşan kallusların ağırlıkları Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Farklı besin ortamlarında oluşan kallus ağırlıkları

Gruplar	Ortam	Oksin	Sitokinin	Kallus ağırlıkları (g)
S-1	A-1	1 mg/L IBA	1 mg/ L6-BA	6,93
S-2	A-1	2 mg/L IBA	2 mg/L6-BA	7,89
S-3	A-1	1 mg/L IBA	1 mg/L Kinetin	2,386
S-4	A-1	2 mg/L IBA	2 mg/L Kinetin	2,945

### 3.5. Çimlendirilen Sürgünlerden Alınan Eksplantlardan Sürgün Oluşumu

Çimlenen sürgünlerin; sürgün ucu, internod ve yaprak eksplantları Zeatin - IBA'nın 6 farklı konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicisi (bbd) grupların, 6 hafta sonraki gelişimleri gözlemlenmiştir Zeatin - IBA için hazırlanan gruplar içinde en iyi sürgün gelişiminin; sürgün ucu eksplantlarının kullanıldığı (Tablo 11) ve bitki büyüme düzenleyicisi olarak 1 mg/L Zeatin + 0,5 mg/L IBA'nın kullanıldığı ortamda görülmüştür. İnternod ve yaprak eksplantlarından daha çok kallus oluşumu ya da tekli fide oluşumunu gözlemlenmiştir. Sürgün uçlarından alınan eksplantlarda ise; internod ve yaprak eksplantlarına göre daha iyi sürgün oluşumunun olduğu gözlenmiştir. Zeatin - IBA'da en iyi sürgün gelişiminin görüldüğü 1 mg/L Zeatin + 0,5 mg/L IBA'nın olduğu ortam kullanılarak alt kültür yapılmış ve 8 hafta sonra bu fidecikler hasat edilip fenolik bileşikleri incelenmiştir (Şekil 6).

Tablo 11. Zeatin - IBA hormon kombinasyonlarındaki sürgün gelişimi

Zeatin - IBA				
Zeatin - IBA Kombinasyonları	Uygulamalar	10 Sürgün ucu eksplantı	10 İnternod eksplantı	10 Yaprak eksplantı
0,5mg/L Zeatin + 0,1mg/L IBA	1	4 çoklu fide ve kallus	5 çoklu fide	1 fide
	2	5 çoklu fide	3 çoklu fide	-
1 mg/L Zeatin + 0,1mg/LIBA	1	3 çoklu fide ve kallus	3 çoklu fide	3 kallus
	2	2 fide	2 çoklu fide	8 kallus
2 mg/L Zeatin + 0,1mg/L IBA	1	2 çoklu, 1 tekli fide	2 çoklu fide	-
	2	3 çoklu, 2 tekli fide	2 çoklu fide ve kallus	7 kallus
0,5mg/L Zeatin + 0,5mg/L IBA	1	4 fide ve 2 kallus	4 çoklu fide	1 çoklu fide
	2	3 fide, 3 kallus	5 fide	2 çoklu fide
1 mg/L Zeatin + 0,5mg/L IBA	1	5 çoklu,2 tekli fide	2 fide ve 7 kallus	1 fide, 8 kallus
	2	6 çoklu, 1 tekli fide	1 fide ve 9 kallus	9 kallus
2 mg/L Zeatin + 0,5mg/L IBA	1	2 çoklu, 1 tekli fide	2 fide ve kallus	1 fide
	2	2 çoklu, 1 tekli fide	1 fide	-

Sürgünlerin; sürgün ucu, internod ve yaprak eksplantları TDZ - IBA için hazırlanan 6 farklı konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicisinin olduğu (bbd) grupların 6 hafta sonraki gelişimleri gözlemlenmiştir. TDZ - IBA için hazırlanan gruplar içinde en iyi sürgün gelişiminin; sürgün ucu eksplantlarının kullanıldığı (Tablo 12) ve bitki büyüme düzenleyicisi olarak 1 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IBA'nın kullanıldığı ortamda görülmüştür. Yaprak eksplantlarından daha çok kallus oluşumu görülürken; internod eksplantlarından tekli fide ve kallus oluşumunu gözlemlenmiştir. Sürgün uçlarından alınan eksplantlarda ise; daha çok sürgün oluşumunu gözlemlenmiştir. TDZ - IBA da en iyi sürgün gelişiminin görüldüğü 1 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IBA'nın olduğu ortam kullanılarak alt kültür yapıldı ve 8 hafta sonra bu fidecikler hasat edilip fenolik bileşiklerince incelenmiştir (Şekil 7).

Tablo 12. TDZ - IBA hormon kombinasyonlarındaki sürgün gelişimi

TDZ - IBA				
TDZ - IBA Kombinasyonları	Uygulamalar	10 Sürgün ucu eksplantı	10 İnternod eksplantı	10 Yaprak eksplantı
0,5 mg/L TDZ + 0,1 mg/L IBA	1	4 tekli fide	3 fide	1 kallus
	2	3 kallus, 3 tek fide	2 kallus	5 kallus
1 mg/L TDZ + 0,1 mg/L IBA	1	3 kallus, 2çoklu fide	4 kallus, 1 çoklu fide	4 kallus
	2	5 çoklu fide, 2 fide	8 kallus	5 kallus
2 mg/L TDZ + 0,1 mg/L IBA	1	3 kallus	3 çoklu fide	3 kallus
	2	5 kallus, 1 kalluslu fide	2 çoklu fide, kallus	7 kallus, 1 kalluslu fide
0,5 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IBA	1	4 çoklu fide	2 fide, 1 kalluslu fide	8 kallus
	2	6 çoklu fide, 2 kallus, 1 kalluslu fide	6 fide, 3 kallus	-
1 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IBA	1	7 çoklu fide	-	-
	2	8 çoklu fide	2 fide	-
2 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IBA	1	2 tanede 2 dal, 2 tanede 3 dal, 1 tek fide	4 fide	2 fide
	2	3 çoklu fide	1 fide	-

Sürgün ucu, internod ve yaprak eksplantları 6-BA - IBA'nın 6 farklı hormon gruplarında, 6 hafta sonraki gelişimleri gözlemlendi. Hazırlanan bu gruplar içinde en iyi sürgün gelişiminin; sürgün ucu eksplantlarının kullanıldığı (Tablo 13) ve bitki büyüme düzenleyicisi olarak 1 mg/L 6-BA + 0,5 mg/L IBA'nın kullanıldığı ortamda görülmüştür. Internod ve yaprak eksplantlarından daha çok kallus oluşumu ya da tekli fide oluşumu gözlenmiştir. Sürgün uçlarından alınan eksplantlarda ise; internod ve yaprak eksplantlarına göre daha iyi sürgün oluşumu gözlenmiştir. 6-BA - IBA'da en iyi sürgün gelişiminin görüldüğü 1 mg/L 6-BA + 0,5 mg/L IBA'nın olduğu ortam kullanılarak alt kültür yapılmış ve 8 hafta sonra bu fidecikler hasat edilmiş ve fenolik bileşikler incelenmiştir (Şekil 8).

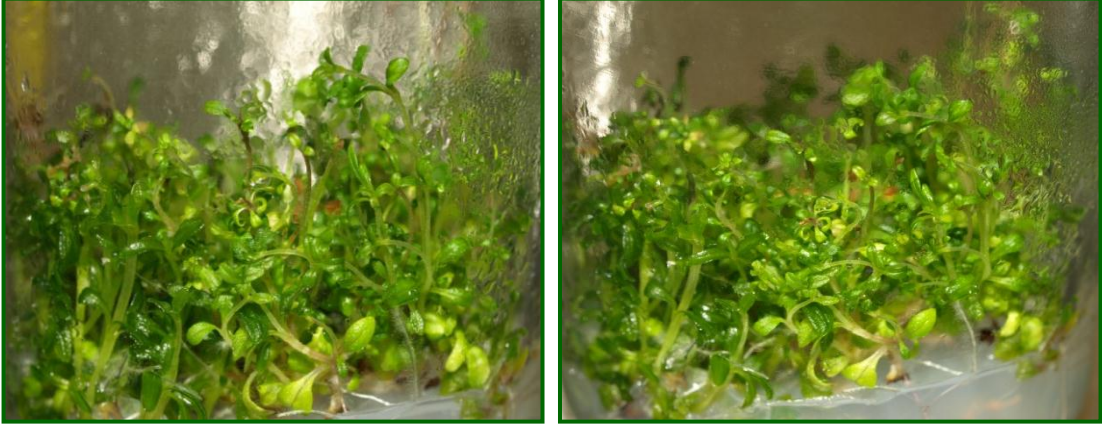
Tablo 13. 6-BA - IBA hormon kombinasyonlarındaki sürgün gelişimi

6-BA - IBA				
6-BA - IBA Kombinasyonları	Uygulamalar	10 Sürgün ucu eksplantı	10 internod eksplantı	10 yaprak eksplantı
0,5 mg/L 6-BA + 0,1 mg/L IBA	1	2 fide	4 kallus	3 kallus
	2	3 fide, kallus	2 fide	2 kallus
1 mg/L 6-BA + 0,1 mg/L IBA	1	3 fide, 2 çoklu fide	3 fide	2 kallus
	2	2 fide, 2 çoklu fide	2 kallus, fide	1 fide
2 mg/L 6-BA + 0,1 mg/L IBA	1	4 kallus, 4 fide	3 fide, 3 kallus	4 kallus, 2 fide
	2	3 fide, 2 çoklu fide	5 kallus	3 kallus
0,5mg/L 6- BA + 0,5 mg/L IBA	1	3 fide, 1 çoklu fide	2 fide	-
	2	2 kallus	2 kallus	2 kallus
1 mg/L 6-BA + 0,5 mg/L IBA	1	3 tekli fide, çoklu fide	3 kallus, 3 tekli fide	1 fide, 1 kallus
	2	4 tekli uzun boylu fideler, çoklu fideler	2 tekli fide, 2 kallus	3 kallus
2 mg/L 6-BA + 0,5 mg/L IBA	1	2 tek fide	-	2 kallus
	2	3 fide	2 kallus	-

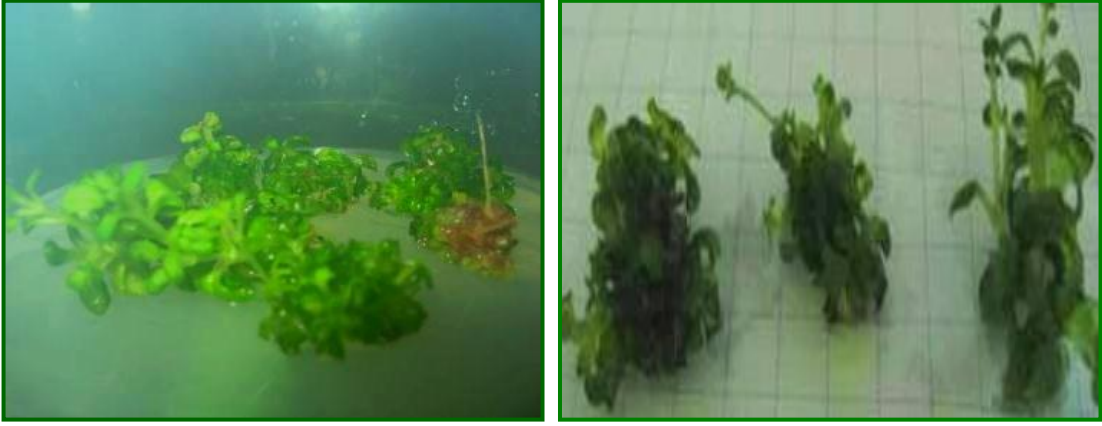
Zeatin'de altı gruptaki sürgün boylarının ortalaması 35,13 mm'dir. TDZ'de altı grubun boy ortalaması 17,32 mm'dir. 6-BA'da ise altı grubun boy ortalaması 46,02 mm'dir. 6-BA'da en uzun fideciklerde en çok nod vardır, sürgün uzunluğuna paralel olarak nod sayısı artmış olup en uzun sürgünde altı nod vardır. TDZ'de 6-BA ve Zeatin'e göre en kısa boy vardır fakat nod sayısı Zeatin'den fazladır. TDZ'de nodlar arası mesafe çok küçüktür. En uzun sürgündeki nod sayısı beştir. Zeatin'de ise en çok nod en uzun sürgündedir ve nod sayısı üçtür. Zeatin'de en uzun sürgünün boyu en ağır olup; 0,147g'dır ve altı grubun sürgün ağırlığının ortalaması 0,065 g  $\pm$  0,04 g'dır. TDZ'de en uzun sürgünün boyu en ağır olup 0,082 g'dır ve altı grubun sürgün ağırlığının ortalaması 0,051 g  $\pm$  0,018 g'dır. 6-BA'da en uzun sürgünün boyun en ağır olup 0,518 g'dır ve altı grubun sürgün ağırlığının ortalaması 0,189 g  $\pm$  0,164 g'dır. Zeatin ve 6-BA'da kök oluşumu varken TDZ'de kök oluşumu yoktur. Zeatin, TDZ ve 6-BA'da kallus oluşumu vardır.

Tablo 14. Sürgün ortamlarından kültüre alınan eksplantlarda görülen gelişmeler

Ortam	Uygulama	Grup	Nod sayısı	Sürgün uzunluğu (mm)	Sürgün ağırlığı (g)	Kök oluşumu	Kallus oluşumu
1 mg/L Zeatin + 0.5 mg/L IBA	1.magenta	1.grup	3 nod	68,5	0,147	var	var
		2.grup	2 nod	42,8	0,081		
		3.grup	3 nod	19	0,031		
	2.magenta	1.grup	3 nod	33,4	0,056	var	yok
		2.grup	4 nod	25,7	0,045		
		3.grup	3 nod	21,4	0,030		
1 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IBA	1.magenta	1.grup	5 nod	25,55	0,082	yok	var
		2.grup	4nod	17,68	0,057		
		3.grup	3nod	16,21	0,047		
	2.magenta	1.grup	4 nod	17,38	0,053	yok	var
		2.grup	3 nod	14,90	0,036		
		3.grup	3 nod	12,20	0,031		
1 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IBA	1.magenta	1.grup	5 nod	60	0,183	yok	var
		2.grup	6 nod	81	0,518		
		3.grup	4 nod	40,17	0,133		
	2.magenta	1.grup	3 nod	36	0,118	yok	var
		2.grup	3 nod	27,33	0,089		
		3.grup	3 nod	31,62	0,096		



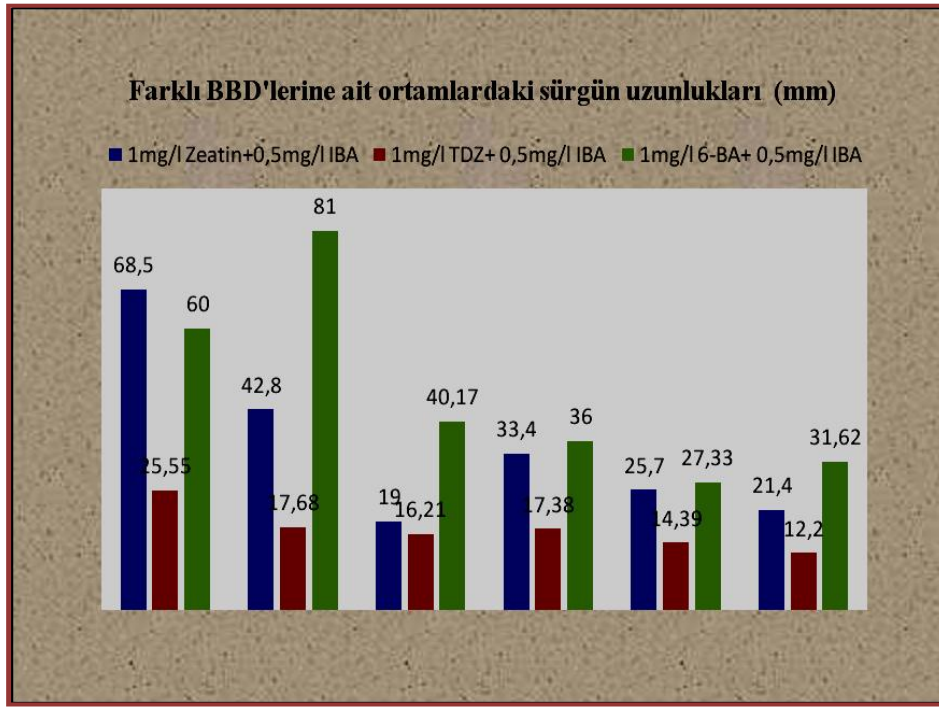
Şekil 6. 1 mg/L Zeatin + 0,5 mg/L IBA hormon konsantrasyonu



Şekil 7. 1 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IBA hormon konsantrasyonu



Şekil 8. 1 mg/L 6BA + 0,5 mg/L IBA hormon konsantrasyonu



Şekil 9. Farklı BBD'lerine ait ortamlardaki sürgün uzunluğu

Farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu ortamlardaki sürgün uzunluklarını karşılaştırdığımızda 6-BA'da en uzun sürgün boyu 81 mm, en kısa sürgün boyu; 31,62 mm'dir. Altı sürgünün boy ortalaması 46,02 mm'dir. Zeatin'de en uzun sürgün boyu 68,5 mm, en kısa sürgün boyu 19 mm'dir. Altı sürgünün boy ortalaması 35,13 mm'dir. TDZ ise en uzun sürgün boyu 25,55 mm, en kısa sürgün boyu 12,2 mm'dir. Altı sürgünün boy ortalaması 17,32 mm'dir. Sürgün boyu uzunluğu sırasıyla 6-BA, Zeatin ve TDZ'dir.

Sekiz hafta içinde kültüre alınan Zeatin, TDZ, 6-BA içinde; ortalama sürgün sayısı bakımından en uygun ortam Zeatin iken ortalama sürgün boyu, sürgün ağırlığı, ortalama nod sayısı bakımından en uygun ortam 6-BA'dır.

### 3.6. Fenolik Bileşen Analizi

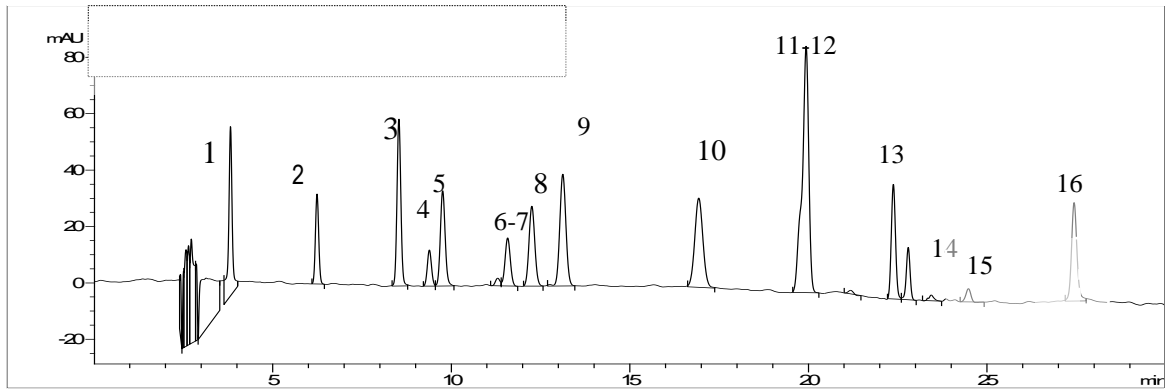
Bölüm 2.10.'da yer alan yöntemler kullanılarak elde edilen özütlerin verimleri Tablo 15'te gösterilmiştir. 16 adet fenolik bileşik standart olarak kullanılmıştır ve 3 adet fenolik bileşen analiz edilmiştir. Bunlar; gallik asit, kafeik asit, protokatekualdehittir.



Tablo 15. HPLC analizleri için hazırlanan özütlerin verimleri

Numuneler	Ortamlar	Kuru bitki örneği (g)	Özüt miktarı (mg)
1. Hat	1 mg/L Zeatin + 0,5 mg/L IBA	0,5	0,0759
2. Hat	1 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IBA	0,5	0,0723
3. Hat	1 mg/L 6-BA + 0,5 mg/L IBA	0,3787	0,0305
4. Hat	Hormonsuz ortam	0,5	0,0096

Numunelerin fenolik kompozisyonunun ortaya konması amacıyla 16 fenolik standarttan hazırlanmış karışım kullanılmış, daha önceki çalışmalarda geliştirilmiş olan ayırma yöntemi hem standart karışımda hem de bitki ekstraktlarında uygulanmıştır. Numuneler iki grup halinde iki farklı zamanda kromatografik açıdan değerlendirildiği için aynı yöntem kullanılmasına rağmen kolon değişikliği nedeniyle alıkonma zamanları kaymıştır. Bu nedenle de standart karışım da her çalışmaya eşlik edecek şekilde ayırma işlemine tabi tutulmuş ve her grup kendisiyle birlikte kullanılan standart karışım kromatogramı ile karşılaştırılmak suretiyle değerlendirilmiştir. Standart karışımla elde edilen kromatogramlara örnek Şekil 10'de verilmiştir.

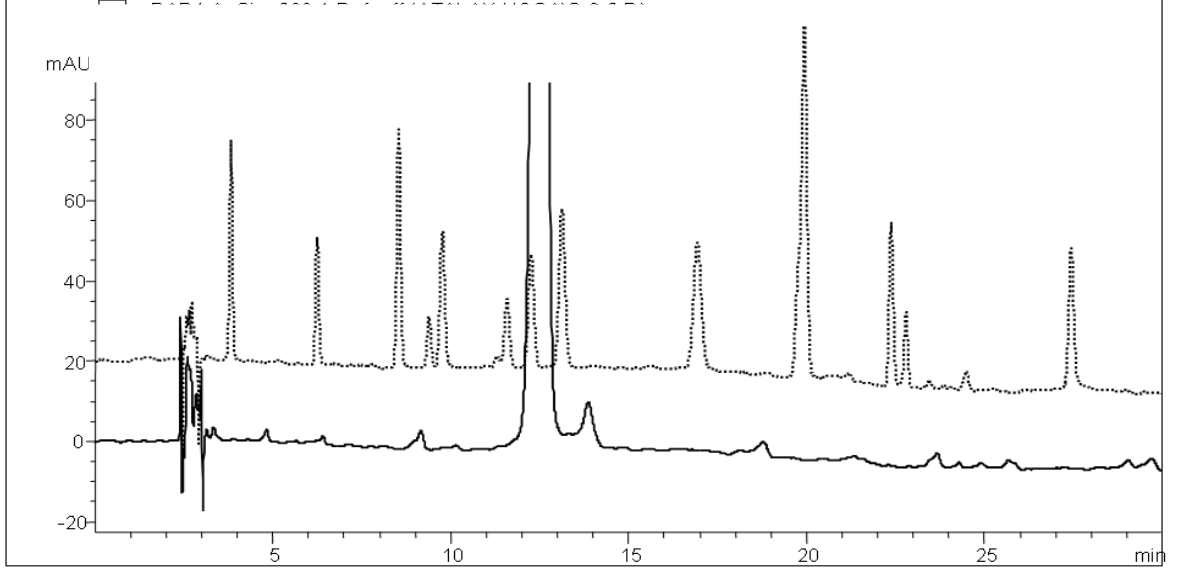


Şekil 10. Seride çalışılan 16 fenolik standartın kromatogramı (280 nm)

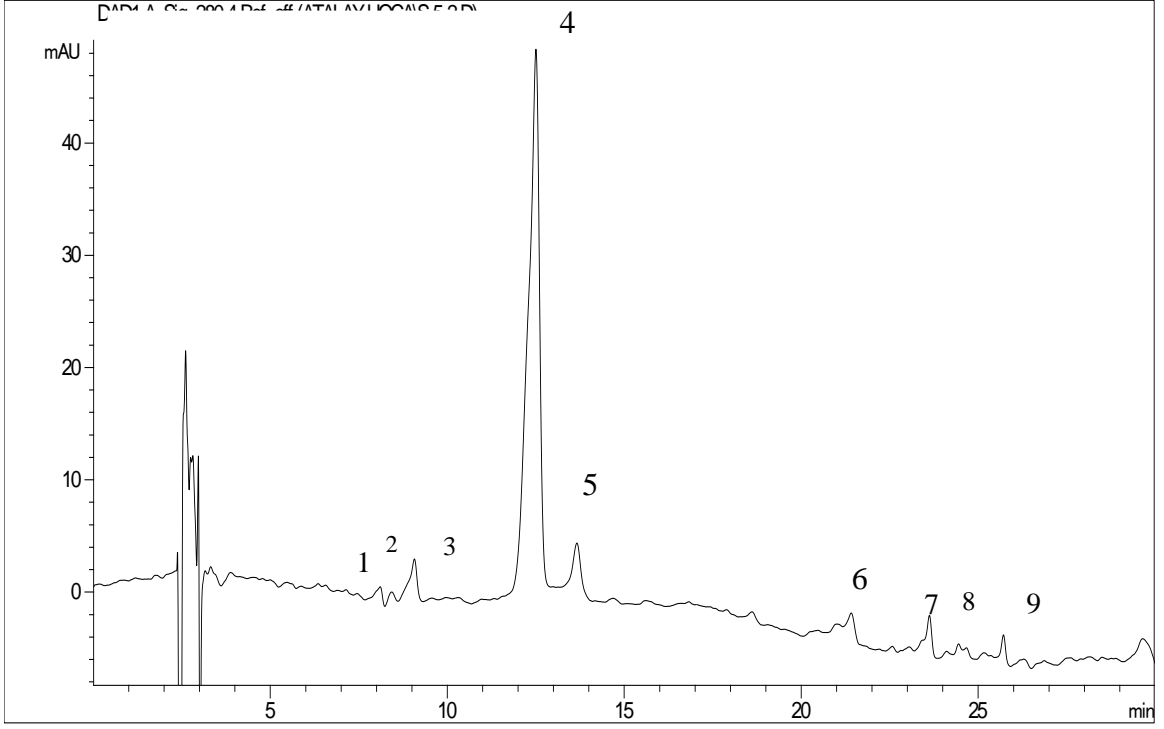
Her bir standardın konsantrasyonu 50  $\mu$ M (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. gentisik asit, 5. klorojenik asit, 6. p-hidroksi benzoik asit, 7. vanillik asit, 8. kaffeik asit, 9. siringik asit, 10. vanillin, 11. siringaldehit, 12. p-kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit, 16. rozmarinik asit).

Çeşitli şartlarda yetiştirilmiş *O. minutiflorum* kültürlerinden elde edilmiş olan 4 ekstrakt standartlara uygulanan aynı yöntemle HPLC analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen kromatogramlar, bu kromatogramlarda numaralandırılarak gösterilmiş ölçülebilir pik veren bileşenler, bu piklere ait spektrumlar ve bu bileşen piklerinin alıkonma zamanları, pik alanı ve pik yükseklikleri Şekil 10-20 ve Tablo 16.-19'da verilmiştir. Tablolarda aynı zamanda alıkonma zamanı ve spektrumu analizde kullanılan standartlarla uyuşan numune bileşenlerinin adları da bildirilmiştir.

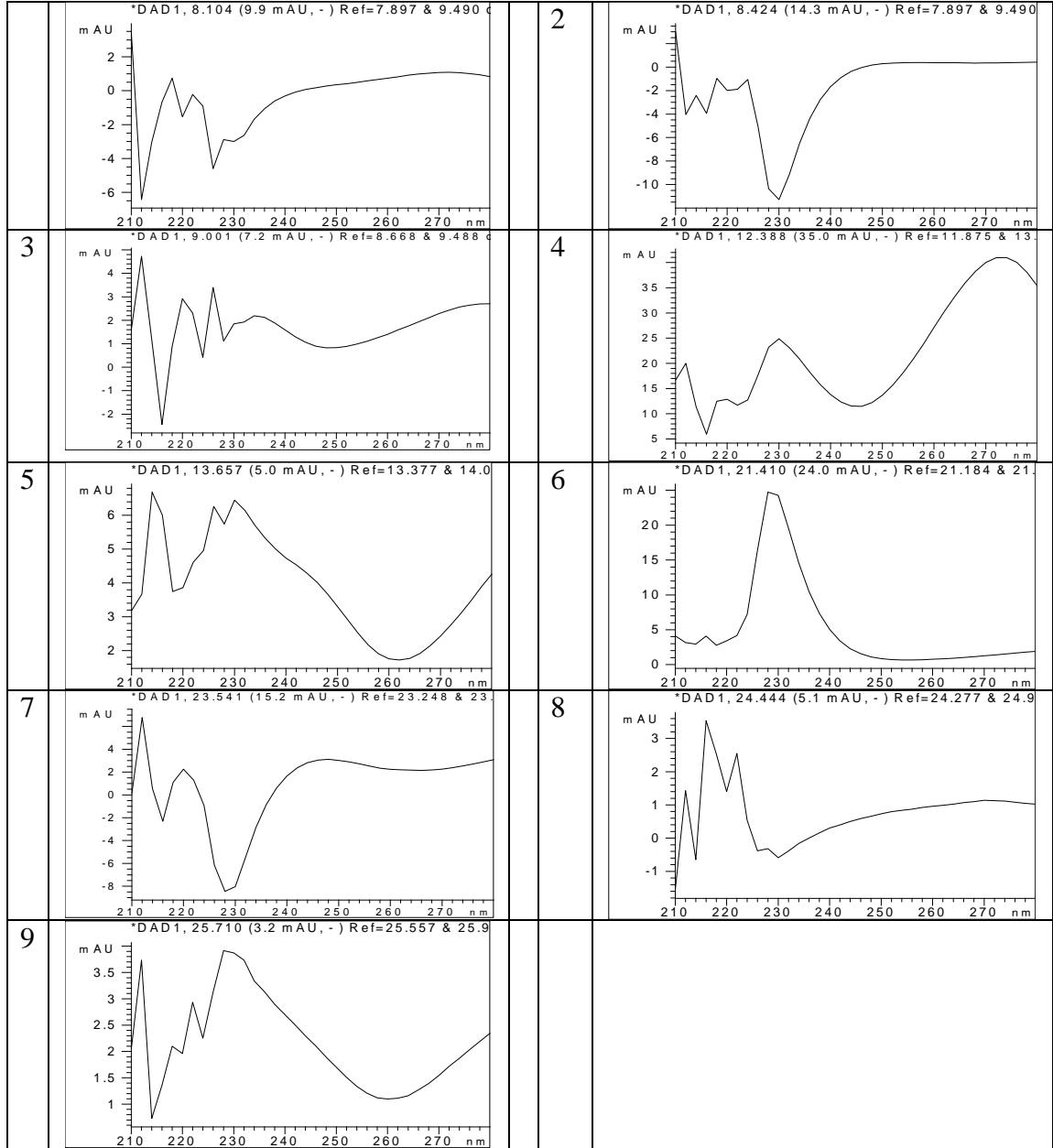
Standart karışımın kromatogramı ile seride içeriğinde en fazla bileşen olduğu görülen 4. hat numunesinin kromatogramı karşılaştırma amacıyla çakıştırılarak Şekil 11'de verilmiştir.



Şekil 11. En yüksek fenolik verimin elde edildiği 4. hat numunesi ve 50  $\mu$ M'lık standart karışımının çakıştırılmış kromatogramları



Şekil 12. 1. Hat numunesinin kromatogramı (280 nm) 3. Protokatekualdehit, 5. kaffeik asit, 1., 2., 4., 6., 7., 8., 9. bilinmemektedir. Standart bileşiklere uymamaktadır

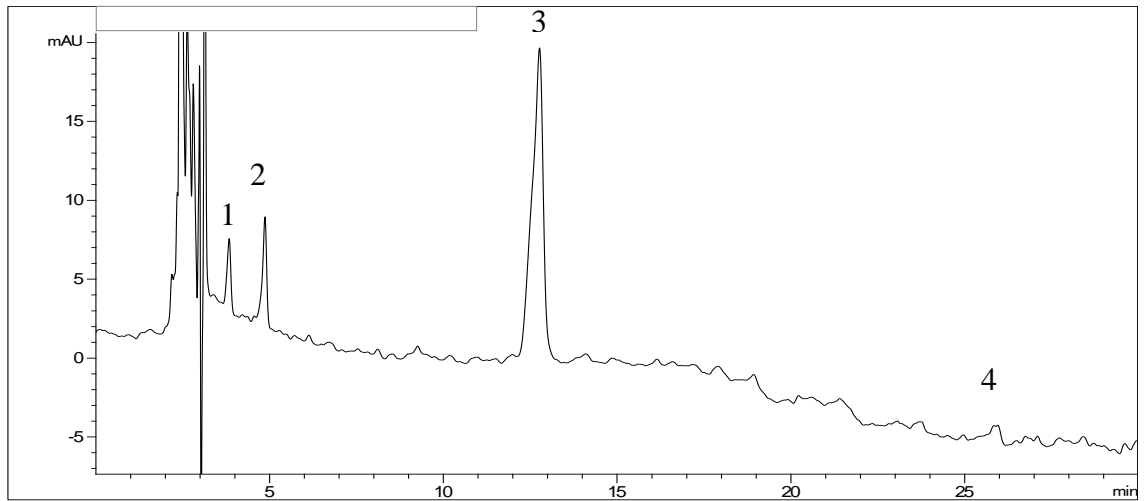


Şekil 13. 1. Hatnumunesinde tespit edilen 1-9 nolu piklere ait DAD ile elde edilmiş spektrumlar (200-400 nm)

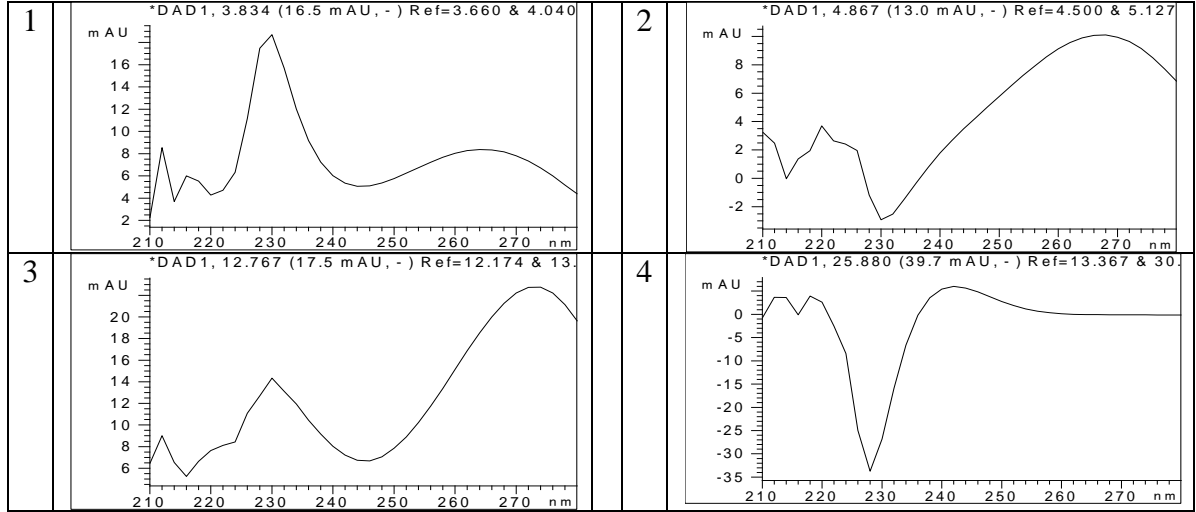
Tablo 16. 1. Hat numunesinde tespit edilen bileşenlerin alıkonma zamanı (RT), pikalanı ve pik yüksekliği değerleri

Pik no	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT)	Pik alanı (mAUxdk)	Pik yüksekliği (mAU)
1	*	8.101	17.3	1.5
2	*	8.425	15.2	1.2
3	Protokatekualdehit (L)	9.068	62.2	3.8
4	*	12.501	1062.9	48.2
5	Kaffeik asit (M)	13.658	69.3	4.4
6	*	21.409	39	2.5
7	*	23.619	39.9	3.4
8	*	24.442	16.1	1
9	*	25.711	19.6	2.4

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



Şekil 14. 2. Hat numunesinin kromatogramı (280 nm) 1. gallik asit, 2., 3., 4. bilinmeyendir. Standart bileşiklere uymamaktadır

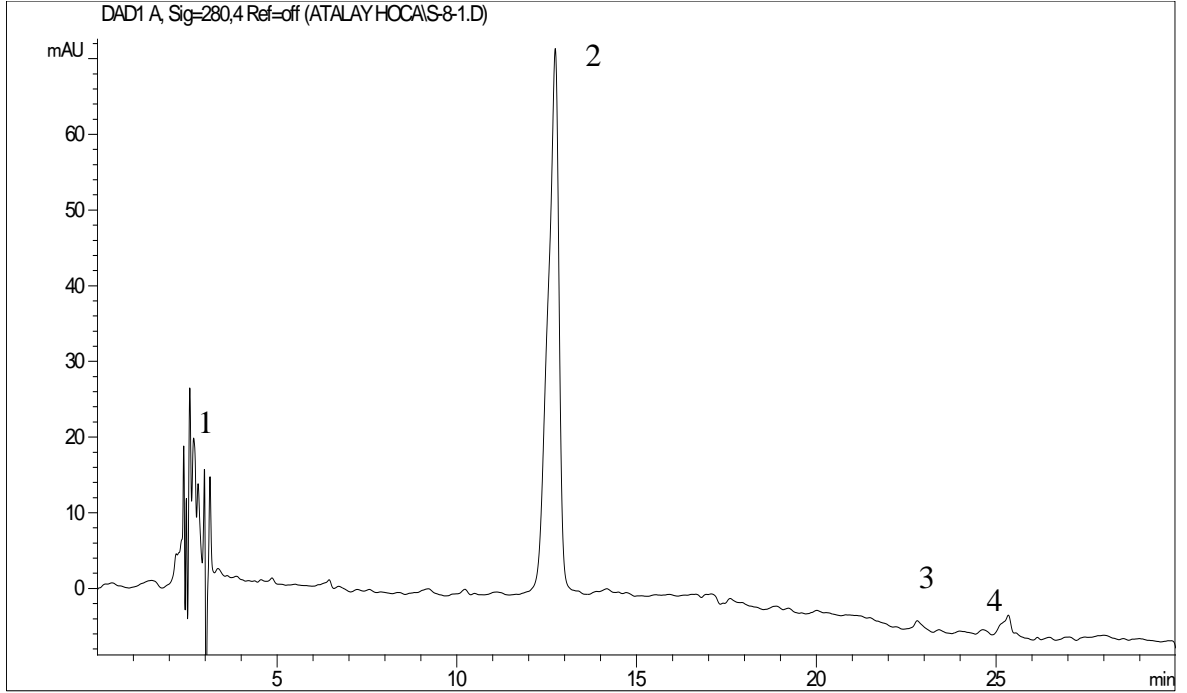


Şekil 15. 2. Hatnumunesinde tespit edilen 1-4 nolu piklere ait DAD ile elde edilmiş spektrumlar (200-400 nm)

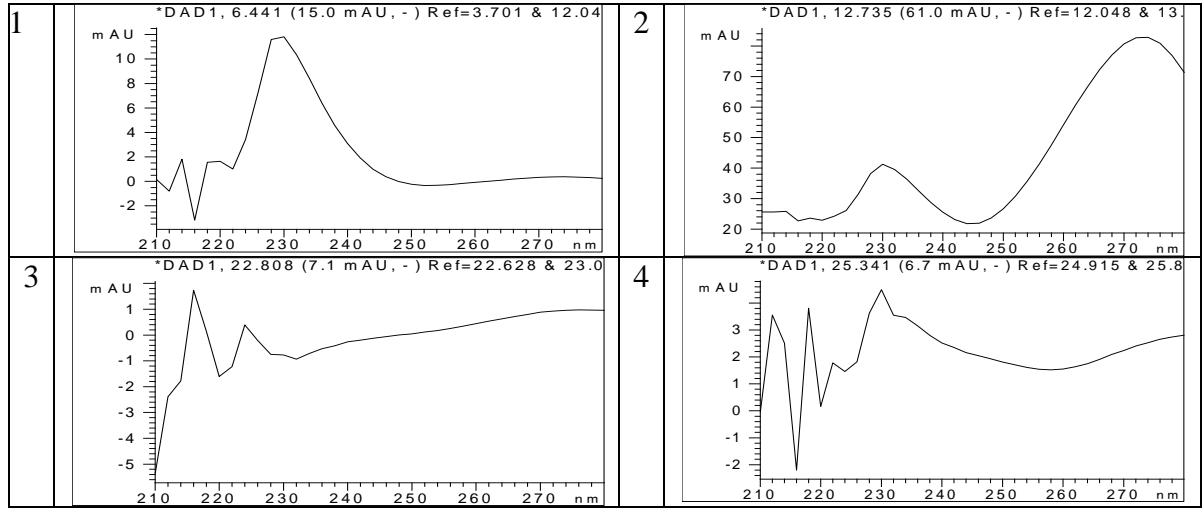
Tablo17. 2. Hat numunesinde tespit edilen bileşenlerin alıkonma zamanı (RT), pik alanı ve pik yüksekliği değerleri

Pik no	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT)	Pik alanı (mAUxdk)	Pik yüksekliği (mAU)
1	Gallik asit	3.86	38.9	4.8
2	*	4.917	61	7
3	*	12.955	418.9	19.4
4	*	25.82	10	0.9

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



Şekil 16. 3. Hatnumenesinin kromatogramı (280 nm) 1., 2., 3., 4. bilinmeyendir. Standart bileşiklere uymamaktadır

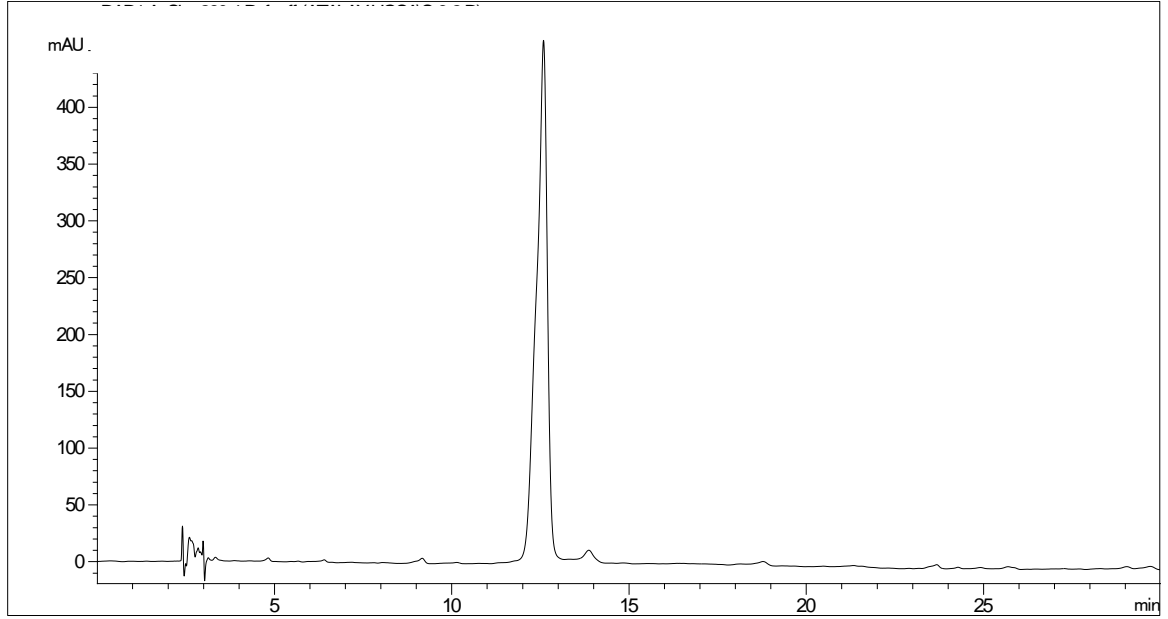


Şekil 17. 3. Hat numunesinde tespit edilen 1-4 nolu piklere ait DAD ile elde edilmiş spektrumlar (200-400 nm)

Tablo 18. 3. Hat numunesinde tespit edilen bileşenlerin alıkonma zamanı (RT), pik alanı ve pik yüksekliği değerleri

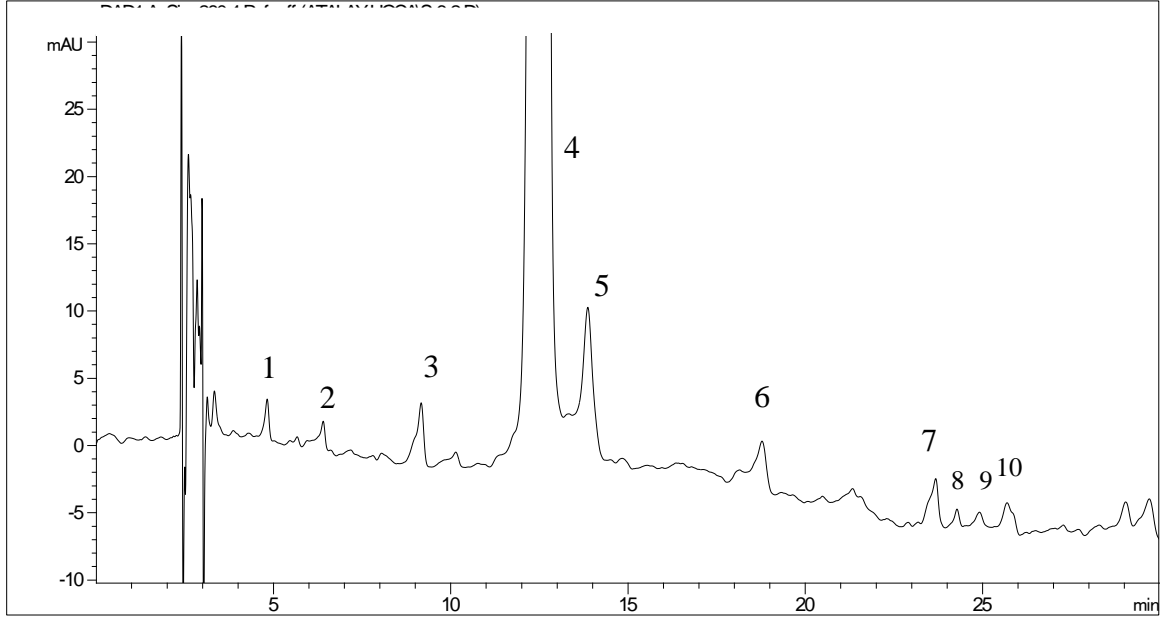
Pik no	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT)	Pik alanı (mAUxdk)	Pik yüksekliği (mAU)
1	*	6.45	14.5	2.6
2	*	12.736	1535.2	71.8
3	*	22.804	15.6	1.1
4	*	25.338	56.5	2.8

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

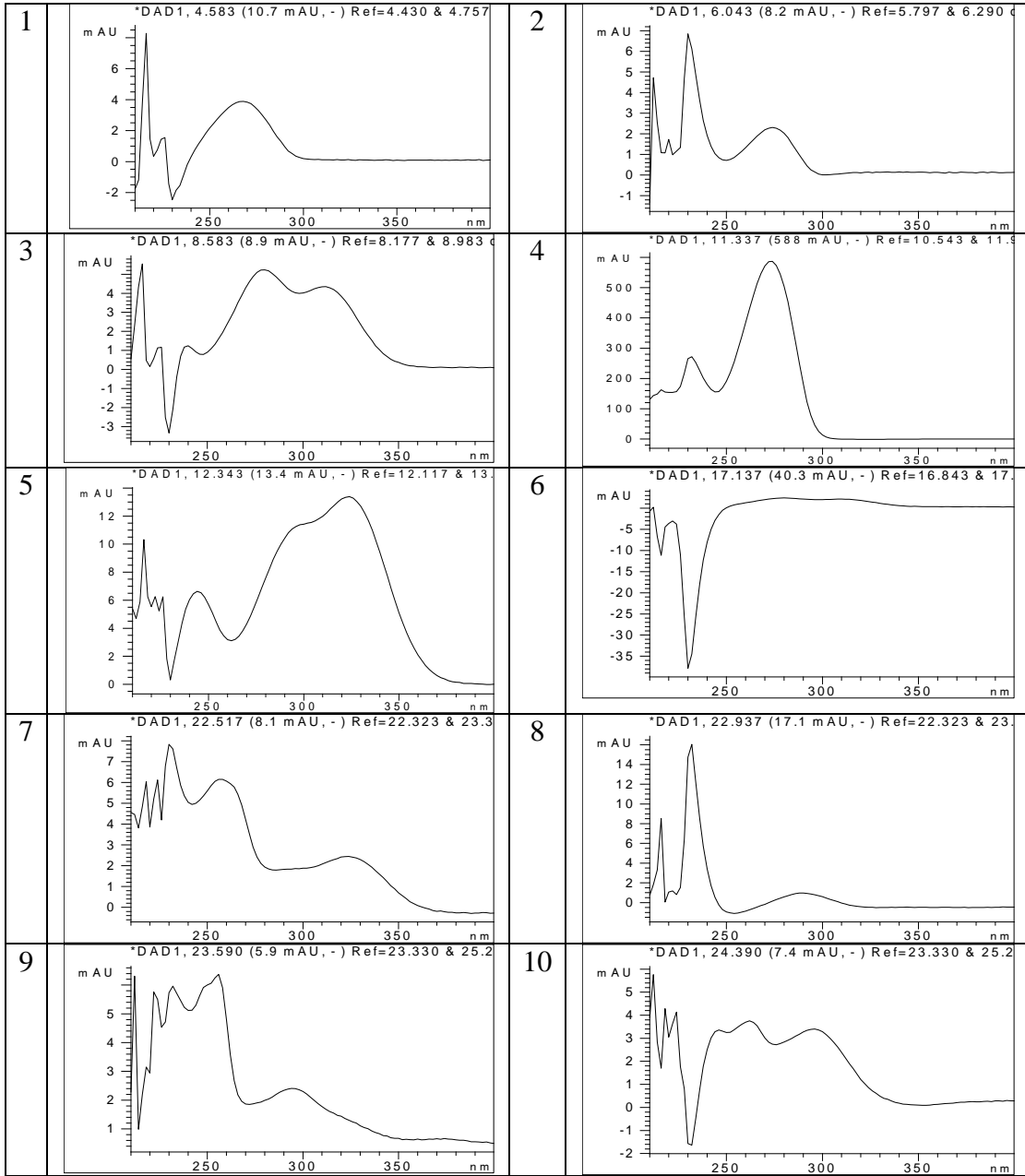


Şekil 18. 4. Hat numunesinin kromatogramı (280 nm)





Şekil 19. 4. Hat numunesinin kromatogramı (280 nm), ana pik dışındaki bileşenlerin görülebilmesi için 0-30 mAU aralığı bölge gösterilmiş. 3. Protokatekualdehit, 5. kafeik asit 1., 2., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10.bilinmeyendir. Standart bileşiklere uymamaktadır

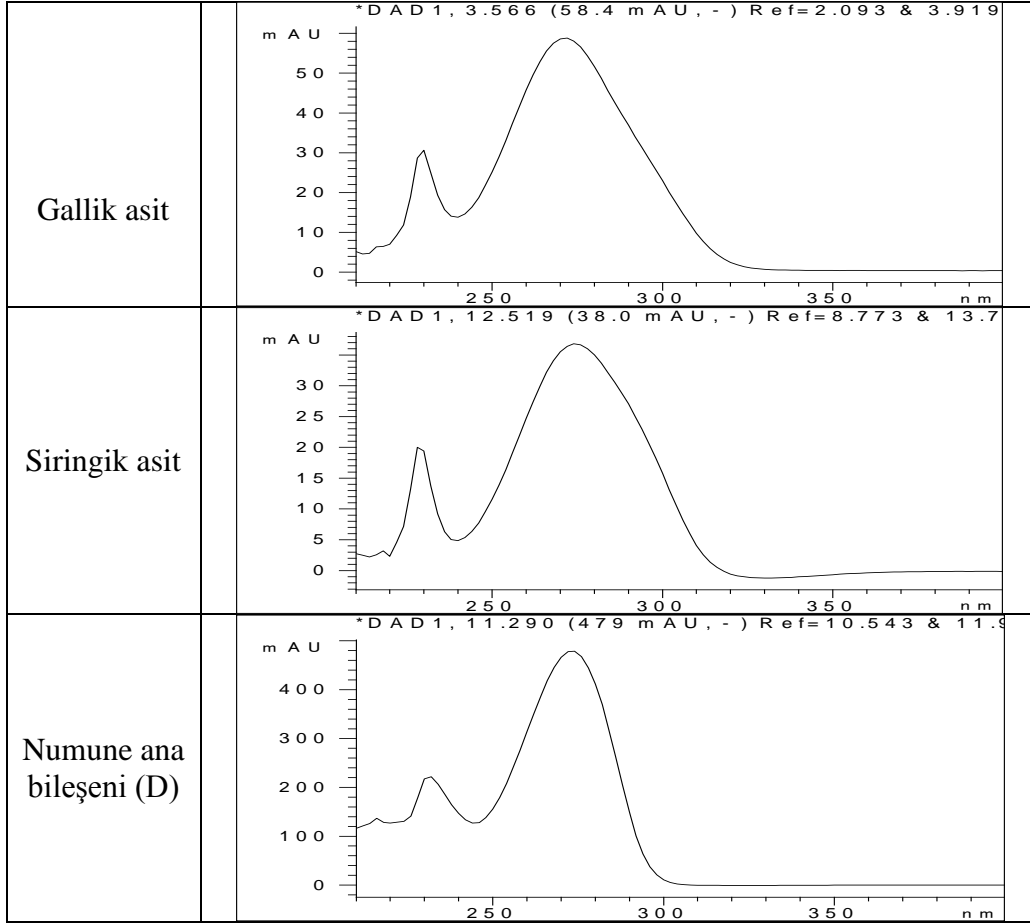


Şekil 20. 4. Hat numunesinde tespit edilen 1-10 nolu piklere ait DAD ile elde edilmiş spektrumlar (200-400 nm)

Tablo 19. 4. Hatnumunesinde tespit edilen bileşenlerin alıkonma zamanı (RT), pik alanı ve pik yüksekliği değerleri

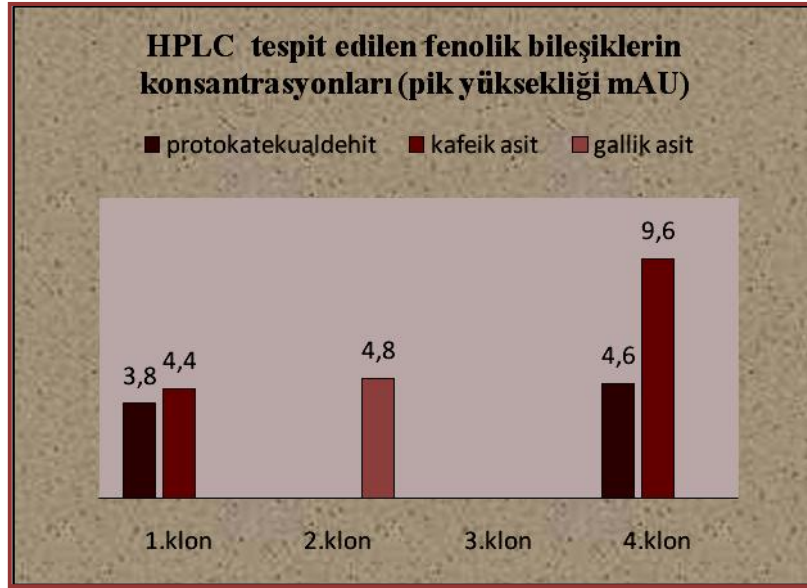
Pik no	Bileşik adı	Alıkonma Zamanı (RT)	Pik alanı (mAU $\times$ dk)	Pik yüksekliği (mAU)
1	*	4.819	25.5	3
2	*	6.399	13.2	1.8
3	Protokatekualdehit (L)	9.163	67.2	4.6
4	*	12.585	9850.9	458
5	Kaffeik asit (M)	13.863	174.2	9.6
6	*	18.777	48.3	3
7	*	23.674	53.9	3.4
8	*	24.275	10.2	1.2
9	*	24.800	11.5	1.3
10	*	25.688	32.9	1.9

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



Şekil 21. Gallik asit, siringik asit ve numunelerde gözlenen ana bileşene ait 200-400 nm arası spektrumlar

Numunelerin dört tanesinde görülen ana bileşenin çalışmada kullandığımız 16 standarttan her hangi biri olmadığı tespit edilmiştir. Ancak DAD spektrumu değerlendirildiğinde bir siringik asit ve gallik asit benzeri bir benzoik asit türevi olabileceği düşünülmektedir. Gallik asitin, siringik asitin ve numunelerdeki ana bileşenin spektrumları karşılaştırma amacıyla Şekil 21’de verilmiştir. Ana bileşen haricinde numunelerin bazılarında aynı zamanda gallik asit, kafeik asit ve protokatekualdehit tespit edilmiştir.



Şekil 22. HPLC ile tespit edilen fenolik bileşiklerin konsantrasyonları

Zeatin + IBA'da kafeik asit ve protokatekualdehite rastlanırken, TDZ + IBA'da gallik asite rastlanmış, 6-BA + IBA'da standartlara uygun fenolik bileşiğe rastlanmamıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin olmadığı ortamda ise protokatekualdehit ve kafeik asite rastlanmıştır. Zeatin + IBA'da 9 tane ana bileşen tespit edilirken, fenolik bileşiklerden kafeik asit ve protokatekualdehite rastlanmıştır. Kafeik asit miktarı protokatekualdehit miktarından daha fazladır. TDZ + IBA'da 4 tane ana bileşen tespit edilirken fenolik bileşiklerden gallik asite rastlanmıştır. 6-BA + IBA'da 4 tane ana bileşen tespit edilirken standartlara uygun fenolik bileşiğe rastlanmamıştır. BBD'lerinin olmadığı ortamda 10 tane ana bileşen tespit edilmiştir. Fenolik bileşiklerden kafeik asit ve protokatekualdehite rastlanmıştır. Kafeik asit miktarı protokatekualdehitten fazladır. Tüm ortamlar içinde en fazla ana bileşen ve alanı BBD'lerinin olmadığı ortamda görülmüştür. Tüm ortamlar içinde de en fazla fenolik bileşik miktarı BBD'lerinin olmadığı ortamda ki kafeik asitte görülmüştür. En az fenolik bileşik miktarında Zeatin + IBA'nın olduğu ortamdaki protokatekualdehite görülmüştür.

#### 4. TARTIŞMA

Günümüzde *Lamiaceae* familyasına ait bitkilerin birçoğunun çeşitli ülkelerde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Ülkemizde bu familya içerisinde yer alan bitkilerin bir bölümü doğal olarak yetişmekte, bazılarının da kültürü yapılmaktadır. Örneğin; *Origanum* türleri doğal olarak doğadan toplandığı gibi bazılarının çelikle ve tohumla üretimi de yapılmaktadır (Kokkini, 1996). Ancak ticari açıdan önemli olan bu türler, yayılış gösterdikleri alanlarda çoğunlukla yağ elde etmek, çay yapımında ve baharat olarak kullanılmak üzere yöre insanı tarafından da bol miktarda toplanmaktadır. Bununla beraber türlerin yayılış alanlarına giren küçükbaş hayvanlardan, dolayı türler zarar görmektedir (Ünal, 2003). Bu faaliyetler sonucunda florada yoğun bir tahribat söz konusu olmakta ve bazı endemik türler yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmaktadır.

Halk arasında “kekik” olarak bilinen *Lamiaceae* (*Labiatae*) familyasına ait *Thymus*, *Origanum* ve *Satureja* türleri ülkemizin en önemli aromatik bitkileridir. Bu bitkiler arasında *Origanum* türleri, özellikle daha yüksek uçucu yağ vermeleri nedeniyle, bitkisel ham madde olarak ülkemizin başlıca ihraç ürünüdür. Burada anılan aromatik bitkiler ilaç, parfüm, kozmetik, deterjan, tatlandırıcı ve aromatik yağ sanayinde ayrıca baharat olarak da kullanılmaktadır (Mulas, 2006).

Bitkilerin tıbbi ve aromatik niteliği nedeni ile doğada var olan stoklarının sökülerek ihraç ediliyor olmaları bu gen kaynaklarımızın gündün güne azalmasına neden olmakta, bu da var olanı sökmek yerine bitkiyi üretmeye yönelik hızlı ve kontrollü çoğaltım yönteminin geliştirilerek kullanılmasını zorunlu hale getirmektedir. Ticari amaçla doğadan toplanan bitkilerin korunması amacıyla uygulanabilecek en ideal alternatif yöntemin “üretim” olduğu tüm dünyada kabul edilmektedir. Doku kültürü teknikleri kullanılarak bitki üretilmesi (mikroçoğaltım), bir çok bitki türünde olduğu gibi tıbbi ve aromatik bitkilerin de vejetatif olarak hızlı ve çok miktarda çoğaltılabilmesine olanak sağlayan bir üretim şeklidir (Hardman ve Kester, 1975; Mansurođlu ve Gürel, 2001). Ayrıca yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik çeşitlilik oluşturmak, kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır (Babaoğlu vd., 2001).

Bu tez kapsamında, ekonomik değeri olan, endemik özellikteki *O. minutiflorum* bitkisinin *in vitro*'da gelişim olanakları araştırılmıştır. Çimlenme, kallus, sürgün ve kök oluşumunu teşvik etmek amacıyla bitkilerin tohumları üzerinden çalışmalar yapılmıştır. Ekonomik değeri yüksek fenolik bileşikler araştırılmış ve HPLC ile bazı spesifik fenolik bileşikler tespit edilmiştir.

Canlılık testi denemelerinde TZ testi (Patil ve Malavika, 1968) uygulanmış canlılık oranı: 1) steril edilmeyen normal tohumlarda %  $73 \pm 2$  iken 2)  $H_2O_2$  ile steril edilen tohumlarda ise %  $51 \pm 1$  olduğu tespit edilmiştir. Tohumlar sterilizasyon çözeltisinde daha uzun süre bekletildiklerinden tohum kabukları eriyerek uzaklaşmıştır. Bunun sonucunda çözelti ile sterilizasyonu tohumlardaki canlılığı % 22 oranında etkilediği görülmektedir. TZ testi hızlı, kesin sonuç veren ve canlı dokuya zarar vermeyen (çimlenmeyi etkilemeyen) avantajlarının olmasının yanı sıra; dormant (uykuda) - non dormant ayırımının 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.

Bitki tohumlarını steril etmek için 2 farklı sterilizasyon yöntemi kullanılmıştır. Önce  $dH_2O$  1:4 çamaşır suyu çözeltisi kullanılmıştır. Hızlı ve basit bir yöntem olmasına rağmen kontaminasyon oranının (%  $78,3 \pm 1,16$ ) yüksek olması başka bir yöntemin denenmesine sebep olmuştur. Diğer bir yöntem olan  $H_2O_2$  kullanarak yapılan sterilizasyonda kontaminasyon riskinin (%  $20 \pm 1,4$ ) yaklaşık 4 kat azaldığı tespit edilmiştir. Tohumlar sterilizasyon çözeltisinde daha uzun süre bekletildiklerinden tohum kabukları eriyerek uzaklaşmıştır ve bu tohumlar kültür ortamında daha hızlı çimlenmiştir.  $H_2O_2$  kullanarak yapılan bu sterilizasyon yönteminin iyi sonuç vermesi avantaj olarak göze çarparken, yaklaşık 12,5 saat (12 saat  $dH_2O$  1: 20 sukroz çözeltisinde, 30 dk.  $H_2O_2$ 'da) kadar süre alması dezavantaj olarak görülmektedir.

*O. minutiflorum* bitkisinin tohumları MS ve B5 ortamlarında çimlendirilmiştir. Benzer olarak, Cellarola (1992) *Mentha*'nın, Arrebola ve Socorro (1997) *Satureja obavata*'nın, Erdağ ve Yürekli, (2000) *Thymus sipyleus* tohumlarını MS besi ortamında, Kumari ve Saradhi (1992) ise *Origanum vulgare* tohumlarını B5 besi ortamında çimlendirmeyi başarmıştır. Bitki büyüme düzenleyicisi kullanılmadan aydınlıkta ve karanlıkta yapılan çimlenmede; besiyerinin, sukrozun ve agarın farklı derişimlerini içeren ortamlar kullanılmıştır. Aydınlıkta yapılan çimlendirmede MS ortamı B5 e göre daha iyi çimlenmiştir. MS ortamı olan A-1 de tam içerikli besi ortamında çimlenme oranı %  $63,3 \pm$

3 iken  $\frac{1}{2}$  içerikli MS ortamı olan A-2’de çimlenme %  $58,3 \pm 2$ ,  $\frac{1}{4}$  içerikli MS ortamı olan A-3’te bu oran %  $54,1 \pm 4$ ’tür. Aynı şekilde tam içerikli B5 ortamında A-4’te çimlenme oranı %  $50 \pm 2$ ,  $\frac{1}{2}$  içerikli B5 ortamı olan A-5’te çimlenme oranı %  $46,6 \pm 2$ ,  $\frac{1}{4}$  içerikli B5 ortamı olan A-6’da bu çimlenme oranı %  $32,5 \pm 1$ ’dir. Sonuçlarda da görülüşü üzere her durumda MS de çimlenme durumu B5’e göre daha iyi sonuç vermiştir.

Karanlıkta yapılan çimlendirmede MS ortamı B5’e göre daha iyi çimlenmiştir. MS ortamı olan K-1 de tam içerikli besi ortamında çimlenme oranı %  $43,3 \pm 1$  iken  $\frac{1}{2}$  MS ortamı olan K-2’de çimlenme %  $40 \pm 1$ ,  $\frac{1}{4}$  MS ortamı olan K-3’te bu oran %  $20 \pm 1$ ’dir. Aynı şekilde tam içerikli B5 ortamında K-4’te çimlenme oranı %  $33,3 \pm 1$ ,  $\frac{1}{2}$  B5 ortamı olan K-5’te çimlenme oranı %  $23,3 \pm 1$ ,  $\frac{1}{4}$ B5 ortamı olan K-6’da bu çimlenme oranı %  $13,3 \pm 0,5$ ’tir. Sonuçlarda da görülüşü gibi her durumda MS de çimlenme durumu B5’e göre daha iyi sonuç vermiştir.

Aydınlık ve karanlık çimlenme denemeleri sonuçlarına göre; MS ortamı B5 ortamına göre daha iyi sonuç vermiştir. Yapılan literatür çalışmaları ışığın bazı türlerde olumlu etki gösterdiğini, bazı türlerde ise olumsuz etki gösterdiğini söylemektedir. Tohumların bir kısmı ışıkta çimlenirken; bir kısmı karanlıkta çimlenmektedir. Bazı tohumlar ise bu anlamda nötr’dür (Yentür, 1982). Işığın şiddeti, dalga boyu ve süresi çimlenmeyi etkilemektedir (Benvenuti ve Macchia 1997; Densmore, 1997; Noranha vd., 1997; Leinonen ve Chantal, 1998). Bazı türlerin tohumları çimlenme için ışığa gereksinim göstermesine rağmen, bazı türlerde ışık çimlenmeyi engellemektedir (Devlin, 1975).

Yapılan bir başka çalışmada *Centaurea zeybekii*’nin tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine ışık ve karanlık etkisi araştırılmış ve ışık-karanlık uygulamaları arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır (Kurt ve Erdağ, 2009).

Çelik ve Yücel (2008)’in CR kategorisinde bulunan *Centaurea hausknetchii*’nin tohumlarının çimlenmesi üzerine gerçekleştirdikleri bir araştırmada ise 16/8, 8/16 fotoperiyot ile karanlık koşullarda farklı oranlarda (sırasıyla % 69.2, % 58.5 ve % 42) çimlenme elde etmişler ve araştırmacılar ışığın çimlenme üzerine teşvik edici bir etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Çimlenen sürgülerin sürgün uçlarından alınan eksplantlar MS ortamında kültüre alınmıştır. 1 mg/L 6-BA + 1 mg/L IBA, 2 mg/ 6-BA + 2 mg/L IBA, 1 mg/L Kinetin + 1 mg/L IBA ve 2 mg/L Kinetin + 2 mg/L IBA’dan oluşan 4 farklı grup içinde en iyi kallus gelişimi 2 mg/L 6-BA + 2 mg/L IBA’dan oluşan ortamda görülmüştür. Bu ortamdaki



kallus ağırlığı 7,89 g iken; en az kallus gelişimi 1 mg/L IBA+1 mg/L Kinetinden oluşan ortamda görülmüştür. Bu ortamdaki kallus miktarı 2,386 g'dır.

Mikroçoğaltım aşamalarının başarıyla tamamlanabilmesi için uygun eksplant seçimi önemli ve temel faktörlerden biridir. *In vitro* sürgün oluşumu kullanılan eksplant tipine bağlı olarak değişmektedir (Gupta ve Conger, 1998; Zobayed ve Saxena, 2003; Ayan vd., 2005). Çalışmamızda kullanılan eksplant tipine benzer olarak değişik türlerin mikroçoğaltımında farklı eksplant tiplerinin benzer olarak kullanıldığı ve sürgün oluşumu üzerinde farklı etkilere sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından da rapor edilmiştir.

Kumari ve Saradhi (1992) Nanenin (*Mentha sp*) doku kültürü ile çoğaltılma olanaklarının araştırıldığı çalışmalarda (Cellarova, 1992) sürgün ucu ve tek boğumları kullanılmıştır.

Erzen vd. (1996) *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Salvia officinali*, *Hypericum perforatum*'un doku kültürü ile çoğaltılmasında sürgün uçları Yürekli ve Baba (1995) *Thymus sipyleus*, *Sideritis syplea*'de yaprak sapı, yaprak parçaları tek boğum ve sürgün uçlarını, Arrebola ve Socorro (1997) mikroçoğaltımında tek boğumları eksplant olarak kullanmışlardır.

Sajina vd. (1997) *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*'nin *in vitro* olarak çimlendirilmiş fidelerinden alınan sürgün ucu ve tek boğum eksplantlarını kullanarak bu türlerin mikroçoğaltımıyla gerekli koşulları optimize etmişlerdir. *Origanum majorana*' da *in vitro* koşullarda yürütülen çalışmada tek boğum eksplantlarından çok sayıda sürgünler elde edilmiştir (Iyer ve Pai 1998; 2000). Minas (2001) *Origanum dictamus*'un *in vitro* koşullarda çoğaltılmasında apikal meristemi kullanmıştır. Tepe vd. (2002), *Mentha longifolia*'nın tek boğum ve sürgün ucu eksplantlarını kullanmışlardır.

Sürgün gelişimi için seçilen sürgün ucu, internod ve yaprak eksplantları içinde en iyi sürgün gelişimsürgün uçlarından alınan eksplantlardan sağlanmıştır. Yaprak eksplantlarından daha çok kallus olurken internodlardan alınan eksplantlardan ise kallus ve fidecikler oluşmaktadır. Oluşan fideler sürgün ucundan alınan eksplantlara oranla daha az, kısa boylu ve seyreklerdir. Sürgün uçlarından alınan eksplantlar diğerlerine göre (yaprak, internod) daha sık, gür ve uzundur.

MS'te Zeatin - IBA'nın 6 kombinasyonlarına (Tablo 11) ait gruplara sürgün ucu, internod ve yaprak eksplantları ekildiğinde en iyi sürgün gelişiminin, sürgün ucu eksplantlarının kullanıldığı, bitki büyüme düzenleyicisi olarak 1 mg/L Zeatin + 0,5 mg/L IBA'nın kullanıldığı ortamda görülmüştür (Tablo 5). Zeatin'de sürgünler uzun boyludur ve

çoklu sürgün oluşumu görülmektedir. En uzun sürgün boyu 68,5 mm'dir. Kök ve kallus oluşumu görülmektedir. 6-BA'ya göre sürgün boyu kısa olsada TDZ'ye göre sürgün boyu uzundur (Tablo 14). En kalabalık sürgün gelişimi TDZ ve 6-BA'ya göre Zeatin'de görülmektedir.

MS'te TDZ - IBA'nın 6 kombinasyonlarına ait (Tablo 12) gruplara sürgün ucu, internod ve yaprak eksplantları ekildiğinde en iyi sürgün gelişiminin sürgün ucu eksplantlarının kullanıldığı, bitki büyüme düzenleyicisi olarak 1 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IBA'nın kullanıldığı ortamda görülmüştür (Tablo 5). Sürgünler genelde kısa ve çoklu sürgünler görülmektedir. Sürgün boyları kısa olmakla birlikte en uzun sürgün boyu 25,55 mm'dir. Kök ve kallus oluşumu görülmektedir (Tablo 14). 6-BA'ya ve Zeatin'e göre en kısa sürgün boyu bundadır.

MS'te 6-BA - IBA'nın 6 kombinasyonlarına ait (Tablo 13) gruplara sürgün ucu, internod ve yaprak eksplantları ekildiğinde en iyi sürgün gelişiminin sürgün ucu eksplantlarının kullanıldığı, bitki büyüme düzenleyicisi olarak 1 mg/L 6-BA + 0,5 mg/L IBA'nın kullanıldığı ortamda görülmüştür (Tablo 5).

Sürgünlerin birkaçı çok uzun boylu diğerleri kısa boyludur. Genelde kısa boylu çoklu sürgün gelişimi görülmektedir. En uzun sürgün boyu 81 mm'dir. Kök ve kallus oluşumu görülmektedir. (Tablo 14). Zeatin ve TDZ'ye göre en uzun sürgün boyu 6-BA'da görülmektedir.

Yaptığımız çalışmada en kısa sürgün boyuna TDZ ortamında rastladık (Tablo14). Buna paralel olarak Debnath (2005), sitokinin olarak bilinen ve aynı zamanda oksine benzer etki gösteren Thidiazuron'un üzümde, kivide, pek çok odunsu bitkide rejenerasyonu başarılı bir şekilde sağladığı, ancak TDZ'nin birçok odunsu bitkide sürgün uzamasını engellediğini belirlenmiştir. Ayrıca, sürgün uzamasının engellenmesinin sitokininin artmasına neden olan sitokinin oksidaz enziminin faaliyet gösterememesinden kaynaklandığı saptanmıştır.

Mirici (2004) geven (*Astragalus polemoniicus* Bunge) bitkisinde yaptığı bir çalışmada, TDZ'nin düşük dozlarının sürgün gelişimini olumlu yönde etkilediğini belirlemiştir.

Sürgün çoğaltım aşaması, genel olarak başlangıç için kullanılan ortamlar çoğaltım aşamasında da kullanılmakla birlikte, bazı durumlarda değişiklik yapılabilmektedir. Bitki dokularından organ farklılaşmasında oksin ve sitokinin önemli rol oynamaktadır. Sitokin/oksin oranını yüksek olması sürgün oluşumunu, oksin/sitokin oranının yüksek

olması kök oluşumunu oksin ve sitokininin aynı miktarda kullanılması kallus oluşumunu desteklemektedir. 6-benzilaminopürin (BAP) genellikle çok sık kullanılan ve olumlu sonuçlar veren bir sitokininidir. Genel olarak 1-2 mg/L sitokinin çoğu sistemlerde yeterlidir. Yüksek düzeyler adventis sürgün oluşumunu artırma eğilimindedir. Thidiazuron (TDZ) düşük konsantrasyonlarda (0,05-1 mg/L) etkili olduğu için umut veren bir sitokininidir. (Werbrouck ve Deberg, 1994).

Bir araştırmada, Texas ve Nonpareil badem (*Amygdalus communis* L.) çeşitlerinin sürgün ucu kültürü ile *in vitro* çoğaltma olanakları araştırılmıştır. Bu amaçla; farklı IBA ve BAP düzeyleri, birbirini izleyen üç farklı kültür aşamasında (ilk dikim, şaşırtma ve çoğaltma) ayrı ayrı test edilmiştir. Sonuçlar sürgün gelişmesi için hormon içermeyen veya sadece düşük düzeyde IBA (0.1 mg/L) içeren ortamların daha uygun olduğunu göstermiştir. Hem şaşırtma hem de çoğaltma aşamasında, 0.1 mg/L IBA ile 1.0 mg/L BAP kombinasyonu sürgün verimi ve gelişmesi bakımından en iyi sonucu vermiştir. Genel olarak, sürgün oluşumu için her iki aşamada BAP'ın gerekli olduğu saptanmış, ancak yüksek düzeyde BAP (2.0 veya 3.0 mg/L 6-BA) kullanıldığında sürgünlerde camlaşma, sürgünlerin canlılığında azalma ve kallus oluşumuna neden olduğu görülmüştür (Gürel ve Gülşen, 1998). 6-BA'nın protein sentezini ve enzim aktivitesini artırarak adventif sürgün oluşumunu sağladığı Lopez-Escamilla vd., (2000) tarafından rapor edilmiştir.

Bizim çalışmamızda 1mg/L 6-BA + 0,5mg/L IBA içeren ortam sürgün gelişimi için en ideal ortam olarak görülmüştür. Yapılan çalışmalarda da fazla miktralarda kullanılan 6-BA sürgünlerde canlılığın azalmasına ve kallus oluşumuna neden olduğu kanıtlanmıştır.

En uzun sürgün boyunun Zeatin ve TDZ'ye göre 6-BA'da olduğu görülmektedir. Çalışmamızın sonucuna benzer olarak BAP'ın, birçok bitki türü için sürgün oluşumu üzerinde en etkili hormon olduğu ve sürgün oluşumunu indüklemek için NAA ile birlikte de kullanılabilceği birçok araştırmacı tarafından da bilinmektedir (Cellarova, 1992; Kumari ve Saradhi, 1992; Garcia-Granados vd., 1994; Sajina vd., 1997; Ellialtıoğlu vd., 1998; Iyer vd., Pai, 1998; 2000; Tepe vd., 2002; Arafah vd., 2003; Özkum ve Tıpırdamaz, 2004; Tisserat ve Vaughn, 2004).

Bölüm 3.6.'da *O. minutiflorum*'un HPLC yöntemiyle belirlenen fenolik bileşen türleri ve nicel miktarları verilmiştir. 16 adet fenolik bileşik standart olarak kullanılmıştır ve 3 adet fenolik bileşen analiz edilmiştir. Bunlar; gallik asit, kaffeik asit, protokatekualdehittir.

Gallik asit hidroliz olabilen tanenlerden (gallotanen) elde edilen, tıp ve eczacılıktan boya, kimya ve besin endüstrilerine kadar çok geniş bir alanda çeşitli amaçlarda kullanılan bir organik asittir. Gallik asit, anti mantar, antioksidan ve anti viral etkilere sahiptir. Normal hücrelere zarar vermeden, kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterir (URL-2)

Zeatin + IBA'da kaffeik asit ve protokatekualdehite rastlanırken, TDZ + IBA'da gallik asite rastlanmış, 6-BA + IBA'da standartlara uygun fenolik bileşiğe rastlanmamıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin olmadığı ortamda ise protokatekualdehit ve kaffeik asite rastlanmıştır. Zeatin + IBA'da 9 tane ana bileşen tespit edilirken, fenolik bileşiklerden kaffeik asit ve protokatekualdehite rastlanmıştır. Kaffeik asit miktarı protokatekualdehit miktarından daha fazladır. TDZ + IBA'da 4 tane ana bileşen tespit edilirken fenolik bileşiklerden gallik asite rastlanmıştır. 6-BA + IBA'da 4 tane ana bileşen tespit edilirken standartlara uygun fenolik bileşiğe rastlanmamıştır. BBD'lerinin olmadığı ortamda 10 tane ana bileşen tespit edilmiştir. Fenolik bileşiklerden kafeik asit ve protokatekualdehite rastlanmıştır. Kaffeik asit miktarı protokatekualdehitten fazladır. Tüm ortamlar içinde en fazla ana bileşen ve alanı BBD'lerinin olmadığı ortamda görülmüştür. Tüm ortamlar içinde de en fazla fenolik bileşik miktarı BBD'lerinin olmadığı ortamda ki kafeik asitte görülmüştür. En az fenolik bileşik miktarıda Zeatin + IBA'nın olduğu ortamdaki protokatekualdehite görülmüştür.

## 5. SONUÇLAR

1. *O. minutiflorum* tohumlarına iki farklı sterilizasyon yöntemi uygulanmış ve en başarılı yöntemin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (% 78,3 ± 1,16) ile yapılan sterilizasyon yöntemi olduğu tespit edilmiştir.
2. Canlılık testinin sonuçlarına bakılırsa; müdahale edilmemiş tohumlarda canlılık oranı % 73 ± 2 iken, sterilizasyondan sonra ki canlılık oranı % 51 ± 1'dir.
3. Aydınlik ve karanlıkta MS ve B5 besin ortamında çimlendirme yapılmıştır. Aydınlik ortamda en iyi çimlenme MS'te % 63,3 ± 3 oranında görülürken, en az çimlenme ¼ B5 ortamında % 32,5 ± 1 oranında görülmektedir. Karanlık ortamda en iyi çimlenme MS'te % 43,3 ± 1 oranında görülürken, en az çimlenme ¼ B5 ortamında % 13,3 ± 0,5 oranında görülmektedir.
4. En iyi kallus gelişimi 2 mg/L 6-BA + 2 mg/L IBA'dan oluşan ortamda görülmüştür. Bu ortamdaki kallus ağırlığı 7,89 g'dır.
5. Zeatin + IBA'da en iyi sürgün gelişimi 1 mg/L Zeatin + 0,5 mg/L IBA'nın olduğu ortamda görülmüştür. Bu ortamda en uzun sürgün boyu 68,5 mm'dir. TDZ + IBA'da en iyi sürgün gelişimi 1 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IBA'nın olduğu ortamda görülmüştür. Bu ortamda en uzun sürgün boyu 25,55 mm'dir. 6-BA + IBA'da en iyi sürgün gelişimi 1 mg/L 6-BA + 0,5 mg/L IBA'nın olduğu ortamda görülmüştür. Bu ortamda en uzun sürgün boyu 81 mm'dir. En iyi sürgün gelişiminin, sürgün ucundan alınan eksplantlardan sağlandığı görülmüştür.
6. Fenolik bileşik analizine bakıldığında; 3 adet fenolik bileşik tespit edilmiştir. Bunlar; gallik asit, kaffeik asit, protokatekualdehittir. Zeatin + IBA'da kaffeik asit ve protokatekualdehite rastlanırken, TDZ + IBA'da gallik asite rastlanmıştır. 6-BA + IBA'da standartlara uygun fenolik bileşiğe rastlanmamıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin olmadığı ortamda ise protokatekualdehit ve kaffeik asite rastlanmıştır. En fazla fenolik bileşik miktarı bitki büyüme düzenleyicilerinin olmadığı ortamda ki kaffeik asitte görülmüştür. En az fenolik bileşik miktarda Zeatin + IBA'nın olduğu ortamdaki protokatekualdehite görülmüştür.

## 6. ÖNERİLER

Ülkemizde endemik olarak doğal koşullarda yetişen ve ekonomik değeri olan türlerin kültüre alınması, *in vitro* koşullarda üretilmesi ve etkin bir üretime olanak sağlayacak koşulların belirlenmesi amaçlanabilir. Ticari amaçla doğadan toplanan bitkilerin korunması amacıyla uygulanabilecek en ideal alternatif yöntemin "üretim" olduğu tüm dünyada kabul edilmiştir. Bu bitkilerin kültüre alınması ile doğadan toplanması sonucunda meydana gelebilecek tahribat engellenebileceği gibi aynı zamanda toplama sonucu gözlenen olumsuzluklar ortadan kalkacaktır.

Değeri yeni anlaşılmaya başlanan tıbbi ve aromatik bitkilerin mikroçoğaltımı, bu proje sonuçlarının değerlendirilmesiyle yapılabilir. Buna ilave olarak, elde edilecek bulgular, ileride gerçekleştirilmesi planlanan *O. minutiflorum* bitkisine ait sekonder metabolitlerin hücre ve doku kültürü yöntemleri kullanılarak üretilmesi ile ilgili çalışmalar için de kaynak olarak kullanılabilir.

Araştırmamızda hem sürgün oluşumu ve gelişimi hem de köklenme açısından önemli bulgular elde edilmiş olup, *O. minutiflorum* için mikroçoğaltım protokolü oluşturulmuştur. Mikroçoğaltım prosedürünün hızlandırılması için bundan sonra yapılacak çalışmalarda, büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonları ile yeni denemeler kurularak ya da en iyi denemeler ile çoğaltma katsayılarının artırılması sağlanmalıdır.

Tıbbi ve aromatik bitkiler doğadan toplanarak soyları tüketilmektedir. Bunun üstesinden gelebilmek için doku kültürü ile çoğaltım için Ar-Ge faaliyetleri kapsamında devlet desteği alınarak firmalar tarafından üretim yapılması önerilecek bir yol olabilir.

## 7. 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.
- Akgül, A., 1993. Baharat Bilimi ve Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yay., Ankara.
- Alves-Pereira, I.M.S. ve Fernandes Ferreira, M., 1998. Essential oils and hydrocarbons from leaves and cali of *Origanum vulgare ssp. Virens.*, Phytochem ., 48, 5, 795-799.
- Arafah, R.M., Mahmoud, M.S, ve Shibli, R.A., 2003. In vitro seed propagation of wild syriana marjoram (*Origanum syriacum L.*), Advances in Horticultural Science, 17,4, 241-244.
- Arrebola, M.L. ve Socorro, O., 1997. Micropropagation of Satureja obovata Lag., Hort. Science, 32, 7, 1278-1280.
- Ayan, A. K., Çırak, C., Kevseroğlu, K. ve Sökmen, A., 2005. Effects of explant types and different concetrations of sucrose and phytohormones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforata L.*, Tr. J. Agr.For., 29, 197-204.
- Babaoglu, M.,2001. Bitki Biyoteknolojisi Cilt I-Doku Kültürü ve Uygulamaları- Bölüm 1. Temel Laboratuvar Teknikleri.
- Babaoglu, M., 2001. Yorgancılar, M. ve Akbudak, M., A., 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.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., 2002. Bitki Biyoteknolojisi, Cilt I.Sel-Ünv. yayınları, Konya s. 374.
- Bağcı, E. ve Dığrak, M., 1997. Antimicrobial activity of essential oils of some *Abies* (Fir) species from Turkey. J. Flavour Fragrance, 11,251-256.
- Başer, K.H.C., Tümen, G. ve Sezik, E., 1991. "The essential oil of *Origanum minutiflorum* O.Schwarz and P.H. Davis", J. Essent. Oil. Res., 3, 445. kyanak içerde varmı bak
- Başer, K.H.C., Özek, T., Tümen, G. ve Sezik, E., 1993. Composition of the essential oils of Turkish *Origanum* species with commercial importance. J. Essent. Oil Res., 5, 619-623.
- Başer, K.H.C., 1994. Essential Oil of *Labiatae* from Turkey-Recent, *Lamiales* Newslefter, Isseve Number 3, 6- 11.

- Başer, K.H.C., Özek, T., Kürtçüoğlu, M. ve Tümen, G., 1994. The Essential Oil of *Origanum vulgare subsp. hirtum* of Turkish Origin, J. Essent. Oil Res., 6, 1, 31-36.
- Baser, K., H., C., 1995. Tıbbi Bitkiler, Bilim ve Teknik, 331, Haziran, 76-79.
- Başer, K.H.C., Tümen, G., Duman, H., 1996. 'Essential oil of *Origanum* bilgeri P.H.Davis', J. Essent. Oil Res., 8, 217.
- Baydar, H., 2002. 'Isparta Koşullarında İzmir Kekikinin (*Origanum onites* L.) Verimi Ve Uçucu Yağ Kalitesi Üzerine Araştırmalar'. S.D.Ü. Fen. Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6, 2, 17.
- Baydar, H., Sagdiç, O., Özkan, G. ve Karadoğan, T., 2004. Antibacterial Activity and Composition of Essential Oils From *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* Species With Commercial Importance in Turkey. Food Control, 15, 169-172.
- Baydar, 2007. Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi (Genişletilmiş 2. Baskı). Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 51, Isparta.
- Baydar, H., Karadoğan, T. ve Özçelik, H., 2009. Göller Yöresinde Yayılış Gösteren Kekik (*Origanum*, *Thymus*, *Satureja* ve *Thymbra* sp.) Türlerinin Belirlenmesi ve Uçucu Yağ Özelliklerinin Saptanması. Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi, Ekim, Hatay, Bildiriler Kitabı 1: 91-95.
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S. ve Telci, D., 2010. Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Üretiminin Arttırılması Olanakları. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi. Ocak, Ankara, Bildiriler Kitabı, I: 437-456.
- Baytop, T., 1984. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, İstanbul Üniv. Eczacılık Fakültesi Yay., No. 3637, 40. İstanbul, 240-376.
- 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., 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.
- Bejlali, B., 1996. *Origanum*: What was this mean? The case of Morocco Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, Valenzano ( Bari), Italy, 139p.
- Benvenuti, S. ve Macchia, M., 1997. Light Environment, Phytochrome and Germination of *Datura stramonium* L. Seeds, Environ Exp. Bot. 38, 61-71.
- Bernath, J., 1996. Some scientific and practical aspects of production and utilization of oregano in central Europe. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, Valenzano (Bari), Italy, 76-91.



- Bhojwani, S.S. ve Razdan, M.K., 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Pratic. Amsterdam, Elsevier.
- Brown, DCW. ve Thorpe, TA., 1995. Crop improvement through tissue culture. World J. Microb. Biotech., 11, 409-415.
- Briskin, D. P., 2000. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. Plant Physiology, 124, 507.514.
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M. ve Dehesa, M., 2003. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, A traditional Ecuadorian spice of *Ocotea quixos* (Lam) Kosterm. (*Lauraceae*) flower calices. Food Chemistry. 85,3, 415-421.
- Büyükgebiz, T., 2006.Sütçüler (Isparta) Yöresinin Odun Dışı Orman Ürünleri.Yüksek Lisans Tezi,Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Cellarova, E., 1992.Micropropagation *Mentha L.*, Biotechnology in Agricultere And Forestry 19, High Tech. and Micropropagation II, Baraj, Y.P.S (ens.) Springer-Verlag, 262-276.
- Ceylan, A., 1997. Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ Bitkileri). Ege Üniv. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Bölümü. İzmir.
- 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.
- Clive, A. ve Stace, C.,1980. Plant Taxonomy and Biosistematics, London.
- Collin, H. A. ve Edwards, H.S., 1998. "Plant Cell Culture", BIOS scientific Publisher, 158 s.
- Conner, D.E., Beuchat, L.R.,1984. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. J. Food Sci. 49, 429-434.
- Corder, R., Douthwaite, J.A., Lees, D.M., Khan, N.Q., dos Santos, A. C.V., Wood, E.G. ve Carrier, M.L., 2001. Endotelin-1 synthesis reduced byred wine-Red Wines confer extra benefit when it comes to preeting coronary heart disease. Nature, 414, 863-864.
- Cowan, M. M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 12, 564-582.
- Çakırlar, H., Tıpırdamaz, R., Özkum, D. ve Çiçek, 2000.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.

- Çelik, S. ve E, Yücel, 2008. Conservation Strategy of Critical Endemic *Centaurea hausknechtii* Boiss. (Section: Cyanoroides) and Effects of Different Salt (NaCl), Nitrate (KNO<sub>3</sub>) and Acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl) Concentrations on the Germination of Seeds, Asian Journal of Chemistry, 20, 5, 4051-4058
- Davis, P.H., 1982. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh University Press, 7, Edinburgh, 300-307.
- Davis, P. H., Mill, R.R. ve Tan, K., 1982. Flora of Turkey and The East Aegen Islands, 7, Edinburgh, Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Davis, P.H., Milli, R.R. ve Tan, K., 1982. Flora of Turkey and the East Aegean Island, Edinburgh Univ. Pres., Edinburgh. 7,186-187 and 307-308.
- Davis, P.H., R.R., Tan, K., 1998. Flora of Turkey and the east Aegen Island, 10. Edinburg 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.
- Debnath, S.C.,2005. A two-step procedure for adventitious shoot regeneration from in vitro derived lingonberry leaves: Shoot induction with TDZ and shoot elongation using zeatin. Hort. Science, 40, 189–192.
- Densmore, R.V.,1997. Effect of Day Length on Germination of Seeds Collected in Alaska, Am. J. Bot., 84, 2, 274-278.
- Devlin, R.,1975. Dormancy,in Plant Physiology, Third Edition. D. Van Nostrand Company, 551-564.
- Erdağ, B.B. ve Yürekli, A.K., 2000.*Thymus sipyleus* Boiss. (*Lamiaceae*)' un *in vitro* çoğaltılması, Tr.J of Biol., 24, 81-86.
- Erzen- Vodenik, M. ve Baricevic, D., 1996. Tissue propagation of medicinal and aromatic plants, Novi izzivi v poljedelstvu 96, Zbornik simpozija, Ljubljana, Sloveia, 9-10 decembra, 201-206.
- Estilai, A.ve Hatemi, A., 1990. Chromosome Number and Meiotic Behavior of Cultivated Chia, *Salvia hispanica* (*Lamiaceae*), Hortscience, 25, 12, 1646-1647.
- Evans, W.C., 1996. Trease ve Evan's Pharmacognosy, 14th ed. WB Saunders, London, 780.
- Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M. ve El-Baroty,G.S.A., 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. J. Food Protect.,52, 9, 665-667.
- 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

- Garcia-Granados., A., Martinez, A., Onorato, M.E., Parra, A., Recondo, M.B., Rivas, F., Arrebola, M.L ve Socorro, O., 1994. Products with biological activity obtained from *in vitro* micropagated *Sideritis foetens*, Phytochem, 35, 3, 645-650.
- Giri, A. ve Narasu, M.L., 2000. Transgenic Hairy Roots: Recent Trends and Applications, Biotechnology Advances, 18, 1– 22.
- Gupta, S.D. ve Conger, B.V.,1998. Differentiation of multiple shoot clumps from intact seedling of switchgrass. *In Vitro*Cell. And Develop., 34, 196-202.
- Güner A, Özhatay N, Ekim T ve Başer, K.H.C., 2000. Flora of Turkey and the East Aegean Islands (supplement 2). 11. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Gürel, S. ve Gülşen, Y., 1998. The Effects of IBA and BAP on *In vitro* Shoot Production of Almond (*Amygdalus communis* L.). Tr. J. of Botany, 22, 375- 379.
- Hatipoğlu, R.,1995. Biyoteknolojiye Giriş. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 129, Ders Kitabı,Adana, s 114.
- Harborne, J. B., 1967. Comparative Biochemistry of the Flavonoids, Academic Press, New York, NY.
- Harborne, J. B.,1994. The Flavonoids Advances in Research Since 1986, Chapman and Hall/CRC, USA, 638.
- Harborne, J. B., ve Williams, C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992, Phytochemistry, 55, 481 - 504.
- Hartman, H.T. veKester, D.E., 1975. Plant Propagation-Principels and Practices. Prentice-Hall. Inc, New Jersey.
- Hartmann, T., 1996. Diversity and variability of plant secondary metabolism: amechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 80, 177-188.
- Heywood, V.H., 1996. Flowering Plants of the World, BT Batsford Ltd., 239, London.
- Hu, C.Y. ve P. J., 1983.Wang, 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.
- Iyer, P.V. ve Pai, J.S.,1998. Micropropagation of sweet marjorom (*Majorana hortensis* Moech.), Journal of Species and Aromatic Crops, 7, 1, 47-79.
- Iyer, P.V. ve Pai, J.S., 2000.*In vitro* regeneration of *Majorana hortensis* Moench from callus and nodal stem segments, Journal of Species and Aromatic Crops, 9, 1, 47-50.

- Kahraman, A., Celep, F. ve Dođan, M., 2009. Morphology, Anatomy and Palynology of *Salvia indica* L. (*Labiatae*), World Applied Sciences Journal, 6, 2, 289-296.
- Kitiki, A., 1996. Status of Cultivation and Use of Oregano in Turkey, Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, Valenzano (Bari), 122-132.
- Koç, H., 1999. İlaç-Baharat Bitkileri Cilt II. Gaziosmanpasa Üniv. Ziraat Fak. Yayınları. Tokat.
- Kokkini, S., 1996. Taxonomy, diversity and distribution of origanum species. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, Valenzano (Bari), 2-12.
- Korosou, R., 1997. Distribution and Clinal Variation of *Salvia fruticosa* Mill, on The Island of Crete, Willnowia, 27, 1-2, 113-120.
- Krishna, P., S., J. ve Reddy G., P., 2005. Agricultural Biotechnology in Developing Countries: Nature and 'Code' in Meeting The Needs of Resource Poor, AsianBiotechnology and Development Review, 7, 3, 37- 53.
- Kumari, N. ve Saradhi, P.P., 1992. Regeneration of plants from callus cultures of *Origanum vulgare* L., Plant Cell Rep., 11, 9, 476-479.
- Kurt, S.ve Erdağ, B.,2009. *In vitro* Germination and Axillary Shoot Propagation of *Centaurea zeybekii*, Biologia, 64, 1, 97-101.
- Leinonen, K.ve Cahantal, M., 1998.Regulation of *Picea abies* Seed Dormancy by Red and Far-red Light at Various Moisture Contents, Scand. J. Forest Res., 13, 43-49.
- Lopez-Escamila, A.L., Olgu'in-Santos, L.T., Marquez, J., Chavez, V. M. ve Bye, R., 2000. Adventitious bud formation from mature embryos of *Picea chihuahuana* Martinez, an endangered Mexican spruce tree, Ann. Bot., 86, 921-927.
- Madsen, H. L., ve Bertelsen, G., 1995. Spices as antioxidants. Trends in Food Science and Technology. 6,271-277.
- 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.

- Metcalfe, C.R. ve Chalk, L., 1972. Anatomy of Dicotyledon, 1, Clarendon Press, Oxford, 502-535.
- Minas, G.J., 2001. Certain dittany apical meristem micropropagation *in vitro*, Miscellaneous- Reports Agricultural Research Institute Ministry of Agriculture, Natural Resources and the Environment, No.80, 7.
- Mirici, S., 2004. Endemik Geven (*Astragalus polemoniicus* Bunge) Bitkisinin Yaprak Sapı Ve Yaprak Eksplantlarından Yüksek Oranda Adventif Sürgün Rejenerasyonu. S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 18, 34, 31-34.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J. ve Dominguez, H., 2001. Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry, 72, 2, 145- 171.
- Mulas, M., 2006. Traditional Uses of *Labiatae* in the Mediterranean Area. Workshop: Products from *Labiatae* an overview: uses, trade and quality International Symposium The *Labiatae*: Advances in Production, Biotechnology and Utilization February, Sanremo, Italy. 3.
- 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 Wtanabe, A., 1999. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of hybrid tuberous begonia (*Begoniaxtuberhybrida* Voss.), Sci. Hort., 79, 3-4, 245-251
- Noranha, A., Andersson, L. ve Milberg, P., 1997. Rate of Change in Dormancy Level and Light Requirement in Weed Seeds During Stratification, Ann. Bot., 80, 795-801.
- Nychas, G. J. E., 1995. Natural antimicrobials from plants. In: Gould, G. W. (Ed.), New Methods of Food Preservation. (58pp) London, Blackie: Academic Profesional.
- Özcan, M., 1998. Inhibitory of spice extracts on the growth of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 strain. Zeitschrift fur Lebensmittel- Untersuchung und-Forschung A, 207, 253–255.
- Özhatay, N. ve Atay, S., 1997. “Kekik” in trade in Turkey. Proceedings of the XI. World Forestry Congress, Antalya, October 3, 234–237.
- Özhatay, N., Koyuncu M., Atay, S. ve Byfield, A., 1997. Türkiye'nin Doğal Tıbbi Bitkilerinin Ticareti Hakkında Bir Çalışma. Doğal Hayatı Koruma Derneği, ISBN: 975-96081-9-7, 121, İstanbul.
- Özkum, D. ve Tıpırdamaz, R., 2004. Effects of Different Nutrient Media and Explant Types on *in vitro* Shoot Regeneration of Medical Species of *Origanum minutiflorum*, 3rd Balkan Symposium on Vegetables ve Potatoes, September, Bursa-Turkey, Bildiriler Kitabı, 14.

- Öztürk, M., Karik, Ü., Tunmaz, A.B., 2009. Türkiye’de Uçucu YağSektörünün Mevcut Durumu, SorunlarıVe Çözüm Önerileri. Türkiye VIII.Tarla Bitkileri Kongresi, Cilt 2, 236–240,19–22 Ekim 2009, Hatay
- Parrot, Wa., Merkle Sa. ve Williams Eg., 1993.Somatic embriyogenesis: Potantial for use in propagation and gene transfer system. In: Murray DR (ed), Advanced methods in plant Breeding and biotechnology, 158-200, C:A:B International, UK.
- Patil,V.N.ve Malavika,1968. Tetrazolium test for seed viability andvigour, 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 embriyogenesis and organogenesis, Int. J. Plant Sci., 160, 3, 483-490.
- Persley, J.G. ve N.J., Siedow., 1999. Applications of biotechnology to crops: benefits and risks
- 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 thr green house and field. Micropropagation Thecnology and Application, Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 71-95.
- Robbins, R., J., 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical Methodology, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 2866 - 2887.
- Quattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J., ve Begin, A., 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. Int.J. Food Microbiol. 37, 155-162.
- Sadıkoğlu, N., 2005. Kekik olarak kullanılan türler üzerinde farmasötik botanik araştırmalar. İstanbul Ü. Eczacılık Fakültesi-Doktora Tezi 113 sayfa, İstanbul.
- Sajina, A., Geetha, S.P., Mino, D., Rema, J., Babu, K.N., Sadanandan, A.K. ve Ravindran, P.N., 1997. Micropropagation of some important herbal species, Biotechnology of species medicinal and aromatic plants, Prceedings of the national seminar on biotechnolgy of species and aromatic plants, Calicut, India, April 1996, 79-86.
- Sarer, E., Scheffer, J.J.C., Janssen, A.M. ve Swendsen, A.B., 1985. Composition of The Ess. Oil of O.majorana Grown in Different Localities in Turkey, Essential Oils Aromatic Plants, Martinus Nijhoff/Dr. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Sarı, A., O.ve Oğuz, B., 2000.Türkiye ve Dünyada Bazı Tıbbi, Kokulu ve Baharat Bitkilerinin Yeri ve Önemi. TYUAP: Ege-Marmara Dilimi 2000 yılı tarla bitkileri bilgi alış-veriş toplantısı bildirileri. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Yayın No:98. İzmir.

- Sarı, A. O., Oğuz, B., Fırat, A.E., Açıkgöz, N. ve Aydın., 2002. Kekik Tarım Ve Köyişleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Yayın No: 108, İzmir, 82s.
- 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.
- Shelef, L. A., 1983. Antimicrobial effects of spices. J. Food. Safely, 6, 29-44.
- Socorro, O., Terrega, I. ve Rivas, F., 1998. Essential oils from wild and micropropagated plants of *Origanum batetatum*, Phytochem., 48, 18, 1347-1349.
- Spencer, J. P. E., El Mohsen, M. M. A., ve Rice-Evans, C., 2004. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: Implications for their bioactivity. Archives of Biochemistry and Biophysics. 423, 1, 148-161.
- Taiz, L. ve Zeiger, E., 2002. Plant. Physiology., Third Edition Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts. p.690.
- Tanker, M., Tanker, N., Şarer, E., Atasu, E., Şener, B., Kurucu, S., Meriçli, F., 1990. Result of Certain Investigation on the Volatile Oil Centaining Plants of Turkey, Essential Oils for Perfumery and Flavours, Preceedings of an İnternational Conference, 26-30 May 16-29 Antalya.
- Tepe, Ş., Ellialtıoğlu, Ş., Yenice, N. ve Tıprıdamaz, R., 2002. *In vitro* kolhisin uygulaması ve poliploid nana (*Mentha longifolia* L.) bitkilerinin elde edilmesi, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi., 15, 2, 63-69.
- Tıprıdamaz, R., Ellialtıoğlu, S. ve Çakırlar, H., 1999. Kardelenin (*Galanthus ikariae* Baker.) Doku Kültürü Yoluyla Çoğaltımı, 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.
- Tisserat, B. ve Vaughn, S.F., 2004. Techniques to improve growth, morphogenesis and secondary metabolism responses from Lamiaceae species *in vitro*, Proc.XXVI IHC-Future for Medicinal and Aromatic Plants Eds. L.E. Craker et al., Acta Hort. 629, ISHS, 333-339.
- Turhan, H., 1997. Salinity Studies in Potato (*Solanum tuberosum* L.). PhD Dissertation, The University of Reading. UK.
- URL-1, [http:// www.wrightmanalpines.com/ plant/ Origanum minutiflorum](http://www.wrightmanalpines.com/plant/Origanum_minutiflorum) 25 Mart 2013.
- URL-2, [http:// www.sifali bitkiler ve doğ al tedavi.com/ bitki\\_kimyasallari/ Gallik Asit. 31](http://www.sifali_bitkiler_ve_doğal_tedavi.com/bitki_kimyasallari/Gallik_Asit.31) Aralık 2012.

- Ünal, O., 2003. Antalya için Endemik olan *Origanum L. (Lamiaceae)* Türlerinin Bazı Biyolojik ve Ekolojik ile Özelliklerinin Saptanması Üzerinde Araştırmalar, Akdeniz Üniversitesi, Fen Fak. Biyoloji Anabilim Dalı, 172 s.
- Warren, G.,1991.The regeneration of plants from cultured cells and tissues. In: Stafford A, Warren G (eds), Plant cell and tissue Culture, 83-100, Open University Pres, Milton Keynes.
- Watson, L. ve Dallwitz, M. T., 1978. The Families of Flowering Plants, Oxford University Press, London.
- 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.
- Westwood, M.N., 1993. ‘‘Hormones and Growth Regulators,’’ Temperate Zone Pomology: Physiology and Culture. Timber Press, Inc. 9999 S.W. Wilshire, Suite 124, Portland, Oregon 97225.
- Williams, R. J., Spencer, J. P. E. ve Rice-Evans, C. 2004. Flavonoids: antioxidants or Signalling molecules. Free Radical Biology and Medicine. 36, 7, 838-849.
- 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.
- Xhuneli, L. ve Lipe, Q., 1996. Oregano (*Origanum vulgare L.*) in Albania, Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, Valenzano (Bari), 133-137.
- Yentür, S.,1982. Tohum Çimlenmesi.,Doğa Temel Bilimler, 6, 175-186.
- Yürekli, A.K. ve B, Baba.,1995. Ekonomik Öneme Sahip Endemikleri Doku Kültürü Teknikleri ile Çoğaltılması, TBAG -1190, 61 s.
- Zandi, P. ve Ahmadi, L., 2000. Antioxidant effect of plant extracts of *Labiatae* family. Journal of Food Science and Technology-Mysore. 37, 4, 436-439.
- Zobayed, S.M.A. ve Saxena, P.K., 2003. *În vitro*- grown roots:a superior exsplants for perlific shoot regeneration of St. John’s wort (*Hypericum perforatum L. Cv " New Stem"*) in a temporary immersion bioreactor Plant. Sci., 165, 463-470.



## **ÖZGEÇMİŞ**

1985 Yılında Trabzon Arsin ilçesinde doğdu. İlk ve ortaöğrenimini Trabzon'da tamamladı. 2008 yılında 19 Mayıs Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu.2009 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı Tezli Yüksek Lisans eğitimine halen daha devam etmektedir.