

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***THYMUS PSEUDOPULEGIOIDES* KLOKOV&DES-SHOST'UN**
MİKROÇOĞALTIMI, FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ VE ANTİOKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Mustafa GÜNAYDIN

TEMMUZ 2014

TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***THYMUS PSEUDOPULEGIOIDES* KLOKOV&DES-SHOST' UN
MİKROÇOĞALTIMI, FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ VE
ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Biyolog Mustafa GÜNAYDIN

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

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 22.05.2014

Tezin Savunma Tarihi : 11.06.2014

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN

Trabzon 2014

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalında

Mustafa GÜNAYDIN Tarafından Hazırlanan

**THYMUS PSEUDOPULEGIOIDES KLOKOV&DES-SHOST' UN
MİKROÇOĞALTIMI, FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ VE
ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 27/05/2014 gün ve 1555 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

Üye : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN

Üye : Doç. Dr. Rabiye TERZİ

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖN SÖZ

Thymus pseudopulegioides Klokov&Des-Shost'un Mikroçoğaltımı, Fenolik Bileşiklerinin Analizi ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi ” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışma konusunun belirlenmesinde, çalışmanın laboratuvar denemelerinin kurulmasında, literatür ve materyal temini, sonuçların yorumlanmasında katkı sağlayan, bilgi ve önerileriyle yol gösteren her türlü destek ve yardımlarını gördüğüm danışmanım Sayın Prof. Dr. Atalay SÖKMEN'e, HPLC analizleri ve antioksidan aktivite testleri sırasında yardımlarını gördüğüm Sayın Prof. Dr. Münevver SÖKMEN'e ve Abdul Hafeez Laghari'ye, bana hem arazi hem de laboratuvar işlerini öğreten Doktor Ersan BEKTAŞ'a, yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım, Yrd. Doç. Dr. Aykut SAĞLAM, Yrd. Doç. Dr. Onur TOSUN, Arş. Gör. Fuat YETİŞSİN, Arş. Gör. Mehmet DEMİRALAY, Arş. Gör. Mutlu GÜLTEPE, Arş. Gör. Çağrı BEKİRCAN, Arş. Gör. Halil İbrahim GÜLER, Öğr. Gör. Gülseren GÜNAYDIN, Figen TOSUN ve Mustafa CÜCE'ye teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Hayatımın her döneminde yanımda olan, maddi ve manevi her türlü desteklerini benden esirgemeyen canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Mustafa GÜNAYDIN

Trabzon 2014

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Thymus pseudopulegioides* Klokov&Des-Shost’un Mikroçoğaltımı, Fenolik Bileşiklerinin Analizi ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Atalay Sökmen’ in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 11/06/2014

Mustafa GÜNAYDIN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Doku Kùltürleri.....	5
1.2.1. Mikroçoğaltım.....	6
1.3. <i>Thymus</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	10
1.3.1. <i>Thymus pseudopulegioides</i> Klovov&Des-Shost Sistematikdeki Yeri.....	10
1.4. Amaç	12
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	13
2.1. Materyal	13
2.1.1. Bitki Materyali	13
2.1.2. Besi Ortamları.....	13
2.1.3. Bitki Büyüme Düzenleyicileri	13
2.1.3.1. Sitokininler.....	13
2.2. Metot	15
2.2.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu	15
2.2.1.1. Sodyum Hipoklorit Çözeltisi Kullanarak Yapılan Sterilizasyon	15
2.2.1.2. Hidrojen Peroksit Kullanılarak Yapılan Sterilizasyon.....	15
2.2.3. Tohumların Canlılık Testi.....	15
2.2.4. Besi Ortamlarının Hazırlanması	16
2.2.5. <i>In vitro</i> Uygulamalar ve Denemelerin Kurulması	16
2.2.5.1. <i>In vitro</i> tohumların Çimlendirilmesi	16
2.2.5.2. Doğrudan Organogenez Çalışmaları.....	17

2.2.6.	Özütlerin Elde Edilmesi	17
2.2.6.1.	Toplam Fenol İçeriği.....	18
2.2.6.2.	HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analizi	19
2.2.6.3.	Toplam Flavonoid İçeriği	20
2.2.7.	Antioksidan Aktivite Testleri.....	20
2.2.7.1	Bitki Özütlerinin Antioksidan Aktivite Deneyleri İçin Hazırlanması	20
2.2.7.1.1.	2,2-Difenilpikrilhidrazil (DPPH) Yöntemi İçin Hazırlanması.....	20
2.2.7.1.2.	β -Karoten Yöntemi İçin Hazırlanması.....	21
2.2.7.2.	2,2-Difenilpikrilhidrazil (DPPH) Yöntemi	21
2.2.7.3.	β -Karoten Açılımı Yöntemi-Spektrofotometrik Yöntem.....	22
2.2.8.	Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	22
3.	BULGULAR.....	23
3.1.	Tohumların Yüzey Sterilizasyonu ve Canlılık Yüzdeleri.....	23
3.2.	Farklı Besi Ortamlarının Çimlendirme Üzerine Etkisi	23
3.3.	Doğrudan Organogenez Çalışmaları.....	25
3.4.	Toplam Fenol ve Toplam Flavonoid Miktarlarının Belirlenmesi.....	30
3.4.2.	HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analizi	32
3.5.	Antioksidan Aktivite Testleri.....	34
3.5.1.	2,2-Difenilpikrilhidrazil (DPPH) Yöntemi	34
3.5.2.	β -Karoten Açılımı Yöntemi-Spektrofotometrik Yöntem.....	34
4.	TARTIŞMA	37
5.	SONUÇLAR.....	47
6.	ÖNERİLER.....	49
7.	KAYNAKLAR	50
8.	EKLER.....	62
ÖZGEÇMİŞ		

Yüksek Lisans

ÖZET

THYMUS PSEUDOPULEGIOIDES KLOKOV&DES-SHOST'UN MİKROÇOĞALTIMI VE FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ VE ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Mustafa GÜNAYDIN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Atalay SÖKMEN
2014, 61 Sayfa, 7 Sayfa Ek

Bu çalışmada, *T. pseudopulegioides* tohumlarının farklı besi ortamlarındaki çimlenme kabiliyetleri, çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temel besi ortamına yerleştirilen eksplantlardan doğrudan organogenezle fidelerinin üretimi ve bu fidelerin metanol özütlerinin toplam fenolik içerikleri ile antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amaçlandı. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besi ortamında çimlendirilen fidelerden alınan eksplantlar (1 cm) 6-benziladenin, thidiazuron ve kinetin içeren (0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L MS temel besi ortamına ortamlarına aktarıldı. Bu ortamlarda gelişen iki aylık fidelerden elde edilen metanol özütlerinin toplam fenolik ve flavonoid miktarları HPLC ile fenolik içerikleri belirlendi. Ayrıca antioksidan aktiviteleri, iki tamamlayıcı yöntem, DPPH ve β -karoten linoleik asit testleri, kullanılarak belirlendi. Farklı ortamlardan elde edilen özütlerin toplam fenolik miktarları 24,01-1083,74 mg/100g, flavonoid miktarları ise 22,48-92,08 mg/100g arasında tespit edildi. En yüksek toplam fenolik içeriği 1,0 mg/L KIN içeren ortamda yetişen fidelerde (1083,74 mg/100g) ve toplam flavonoid içeriği 0,5 mg/L 6-BA içeren ortamda yetişenlerde elde edildi (92,08 mg/100g). En yüksek radikal süpürücü etkiye 2,0 mg/L KIN ortamda gelişen fidelerden elde edilen özütte tespit edildi (IC₅₀: 4,77 mg/mL). Örneklerin β -karoten testinden elde edilen lipid oksidasyonunu engelleme derecelerinde en yüksek aktiviteyi 0,5 mg/L 6-BA ortamında gelişen fidelerin özütlerinde tespit edildi (%BAA: %100).

Anahtar kelimeler: *Thymus pseudopulegioides*, Mikroçoğaltım, Fenolik bileşikler, HPLC, *In vitro*, Antioksidan Aktivite

Master Thesis

SUMMARY

MICROPROPAGATION OF *THYMUS PSEUDOPULEGIOIDES* KLOKOV&DESHOST AND ANALYSIS OF PHENOLIC CONSTITUENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES

Mustafa GUNAYDIN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Atalay SOKMEN
2014, 61 Pages, 7 Pages Appendix

The aims of this study are to determine the best germination medium for *T. pseudopulegioides* seeds, as well as to produce seedlings via direct organogenesis from the explants being placed on the Murashige & Skoog (MS) basal media, each supplemented with various plant growth regulators and determine total phenolics and antioxidant activities of the extracts obtained from aforesaid plantlets. Explants (ca. 1 cm long) were cut from the seedlings which were previously grown on MS with PGR free medium and they were immediately placed on MS basal media supplemented with 6-BA, TDZ and KIN with the concentrations of 0,25; 0,5; 1,0 and 2,0 mg/L, individually. After two months culturing, methanol extracts of seedlings were evaluated for their total phenolic and flavonoid contents as well as their antioxidant activities. The former was carried out by using HPLC, while the latter was evaluated by two complementary test systems, namely DPPH free radical scavenging and β -Carotene color bleaching test. Total phenolic contents of all samples ranged from 24,01 to 1083,74 (mg/100 g) and whilst those of flavonoids were from 22,48 to 92,08 (mg/100 g). The highest total phenolic content was observed in medium including 1,0 mg/L KIN at the range of 1083,74 mg and the highest total flavonoid content was observed in medium including 0,5 mg/L 6-BA at the range of 92,08 mg, respectively. The highest free radical scavenging activity was observed of 2,0 mg/L KIN. In β -Carotene color bleaching test the highest activity observed of 0,5 mg/L 6-BA.

Key Words: *Thymus pseudopulegioides*, Micropropagation, Phenolics, HPLC, *In vitro*, Antioxidant Activities

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

- Şekil 1. *Thymus pseudopulegioides*'in çiçekli hali..... 11
- Şekil 2. *Thymus pseudopulegioides* taksonunun Türkiye üzerinde yayılış alanları 11
- Şekil 3. Toplam fenol tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği 19
- Şekil 4. Doğadan toplanan tohumlar (A), MS (Murashige & Skoog) besi ortamı (B), GB-5 (Gamborg's B-5) besi ortamı (C), SH (Schenk&Hildebrant) besi ortamı (D), WM (White Medium) besi ortamı (E) ve LS (Linsmaier & Skoog) besi ortamı (F)..... 24
- Şekil 5. MS besi ortamındaki *Thymus pseudopulegioides* sürgünlerinin (A) başlangıç, (B) 0.25 mg/L KIN, (C) 0.5 mg/L KIN, (D) 1.0 mg/L KIN ve (E) 2.0 mg/L KIN'in sekiz hafta sonundaki görünüşleri 26
- Şekil 6. MS besi ortamındaki *Thymus pseudopulegioides* sürgünlerinin (A) başlangıç, (B) 0.25 mg/L TDZ, (C) 0.5 mg/L TDZ, (D) 1.0 mg/L TDZ ve (E) 2.0 mg/L TDZ'nin sekiz hafta sonundaki görünüşleri 27
- Şekil 7. MS besi ortamındaki *Thymus pseudopulegioides* sürgünlerinin (A) başlangıç, (B) 0.25 mg/L 6-BA, (C) 0.5 mg/L 6-BA, (D) 1.0 mg/L 6-BA ve (E) 2.0 mg/L 6-BA'nın sekiz hafta sonundaki görünüşleri 28
- Şekil 8. *T. pseudopulegioides* bitkisinde HPLC ile tespit edilen fenolik bileşikler 34
- Şekil 9. *Thymus pseudopulegioides* bitkisinden *in vitro* koşullarda elde edilen antioksidan aktivite sonuçları 36

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>Thymus pseudopulegioides</i> botanik özellikleri	11
Tablo 2. Çalışma kapsamında kullanılan besi ortamları ve içerikleri.....	14
Tablo 3. <i>Thymus pseudopulegioides</i> tohumlarının canlılık testi ve besi ortamlarındaki kontaminasyon yüzdeleri.....	23
Tablo 4. <i>Thymus pseudopulegioides</i> tohumlarının farklı besi ortamlarındaki çimlenme verileri	24
Tablo 5. KIN, TDZ ve 6-BA'nın 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L derişimlerdeki kültüre alınan sürgünlerin 8 hafta sonundaki kardeşlenme sayıları, ortalama sürgün boyu, yapraklanma sayıları ve kuru ağırlıkları.....	30
Tablo 6. <i>Thymus pseudopulegioides</i> bitkisinin <i>in vitro</i> koşullarda üretilen toplam fenol ve flavonoid miktarları.	31
Tablo 7. <i>Thymus pseudopulegioides</i> bitkisinin <i>in vitro</i> koşullarda üretilen fenolik bileşikler	33
Tablo 8. <i>Thymus pseudopulegioides</i> bitkisinden <i>in vitro</i> koşullarda elde edilen antioksidan aktivite sonuçları	35

SEMBOLLER DİZİNİ

2, 4-D	: 2,4 Diklorofenoksiasetik Asit
BAP(6-BA)	: 6-Benzilaminopürin
BAA	: Bağlı Antioksidan Aktivite
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyicisi
BHT	: Bütillenmiş Hidroksi Toluen/Sentetik Antioksidan
dH ₂ O	: Deiyonize Su
DPPH	: 2,2-Difenilpikrilhidrazil
EtOH	: Etanol
G-B5	: Gamborg Temel 5 Besi Ortamı
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IAA	: İndol-3-Asetik Asit
IBA	: İndol-3-Bütirik Asit
KS	: Kardeşlenme Sayısı
KİN	: 6-Furfurilaminopürin/Kinetin
LS	: Linsmainer ve Skoog Temel Besi Ortamı
MeOH	: Metanol
MS	: Murashige ve Skoog Temel Besi Ortamı
M.Ö	: Milattan Önce
NAA	: Naftalenasetik Asit
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
SB	: Sürgün Boyu
SH	: Schenk Hildebrand Besi Ortamı
TDZ	: Thidiazuron
TTC	: 2,3,5-Trifenil Tetrazolyum Klorit
TZ	: Tetrazolyum Testi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WM	: White Besi Ortamı
YS	: Yapraklanma Sayısı

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Tarihin en eski kaynaklarına bakıldığında insanoğlunun var oluşundan bu yana çevresindeki canlı cansız her türlü kaynaktan faydalanma yoluna gittiği görülür. Bu kaynakların en önemlisi şüphesiz bitkilerdir. Besin sağlama gibi yaşamsal değerler taşımalarının yanı sıra yüksek bitkiler, başta ilaç sanayi olmak üzere kimya, besin, kozmetik ve zirai mücadele alanlarında yararlanılan doğal ürünleri üretirler. Yaşamsal olarak önem taşımamakla birlikte üretildiği bitkilere bir takım uyumsal değerler ya da avantajlar sağlayan bu bileşiklere ise “sekonder metabolitler” adı verilir (Sökmen ve Gürel, 2001).

Bitkiler doğal yaşam ortamlarında çok çeşitli düşmanlarla kuşatılmış durumdadır. Düşmanlarından kaçmak için yer değiştirmeleri söz konusu olmadığına göre, bitkiler birtakım özel savunma mekanizmaları geliştirmek zorundadırlar. Bunlardan birisi de ürettikleri özel kimyasallardır. İnsanoğlu ise, bu özellikten faydalanarak, eski çağlardan beri çok sayıda bitkiyi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanagelmiştir. Faydalı gördükleri bitkileri tanımış, tanıtmış ve çeşitli hastalıklarda o bitkileri kullanmışlardır (Altan vd.,1999). Bitkilerin tedavi amacı ile kullanışlarını tarif eden en eski eserler Çinlilerindir. Chen-Nung'un “Materia Medica” adlı eseri M.Ö. 3217 yılında yazılmıştır. Kitapta iki yüzün üzerinde tıbbi bitkiden söz edilmektedir (Öztürk, 1986; Acartürk, 1997). Tıbbi bitkiler konusunda en eski ve en önemli belgelerden biri de Mısır'da M.Ö. 1550 ve daha eski zamanlarda yazılmış Papyrus Ebers'dir (Karamanoğlu, 1977). Bunların yanında bitkilerin hastalıklara karşı ilaç olarak kullanılması, M.Ö. 50,000 yıllarına kadar uzanmaktadır. Kimya biliminin 18. yüzyıldan sonra gelişmesi bitkilerden elde edilen etken maddelerin analizine olanak tanırken, bitkisel tedavi yöntemleri yerine sentetik ilaç hammaddelerinin kullanımını da beraberinde getirmiştir Modern ilaçların istenmeyen yan etkilere sahip olması, son yıllarda doğal kaynaklardan elde edilen ilaçların tercih edilmesine sebep olmuştur (Baytop, 1984).

Gelişmekte olan birçok ülkede nüfusun büyük bir oranının birincil sağlık ihtiyaçlarını karşılamak için geleneksel tedavi yöntemlerine ve tıbbi bitkilere ağırlıklı olarak güvendiği ileri sürülmektedir. Aynı zamanda gelişmiş ülkelerde birçok insan

bitkisel drogları kullanarak, alternatif ya da tamamlayıcı tedavi yöntemlerine yönelmişlerdir (WHO, 1999). “Yeşil Dalga”, “Yeşil İlaç” adıyla anılan ilaç ve tedavide doğaya dönüş akımı tüm Avrupa ve Amerika’yı etkisi altına almıştır (Tümen vd., 1999).

Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) ülkenin tıbbi bitkiler üzerine yapılmış olan bazı yayınlara dayanarak hazırladığı bir araştırmaya göre tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin toplam miktarı 20,000 civarındadır (Baytop, 1999). Türkiye’de 140 kadar tıbbi bitki kaydedilmiştir (Baytop, 1999). Avrupa ülkelerinden Fransa, İsviçre ve özellikle Almanya’da bitkisel ilaçları modern tıpla birleştirmek için bir eğilim vardır (Çubukçu vd., 2002). Almanya’da 500 farklı bitkiden bitkisel ilaç üretimi için yararlanılmakta ve bunların 200 ’ü çok sık kullanılmaktadır. Halkın % 52 ’si önemsiz hastalıkların ilk tedavisi için bitkisel ilaçları kullanmaktadır. ABD’de ticari olarak bitkilerden elde edilen ilaçların % 75 ’i, etnobotanik bilgiler sonucunda elde edilmiştir. Amerika’da reçetelenmiş ilaçların % 25 ’i doğal ürünlerken, diğer bir % 25 ’de doğal ürünlerin ya kendisinden ya da model oluşturduğu maddelerden oluşmaktadır (Çubukçu vd., 2002). Ayrıca besinlere tat ve koku verici (çeşni) olarak kullanılan ve hatta parfüm ve kozmetik alanında “itriyat” olarak da bilinen “aromatik” bitkilerin de ayrı bir önemi vardır.

Tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen özütlerin veya bu etken maddelerinin biyolojik aktiviteleri ile ilgili çalışmalara dair çok sayıda makale literatürde yer almaktadır. Çoğu araştırmada, bitkilerin sekonder metabolizma ürünü olan uçucu yağların ve özütlerinin, antimikrobiyal, antibakteriyel, antifungal, antitoksijenik, antiviral, antiparazitik, antioksidan, antikarsinojenik ve insektisidal özellik gösterdiği gözlemlenmiştir (Deans, 1987; Dorman ve Deans, 2000; Semple, 2001; Ultee, 2001; Rasooli ve MirMostafa, 2002; Juglal, 2002; Mari, 2003; Skocbusic, 2006;). Bundan dolayı farmakolojide, fitopatolojide, ve koruyucu madde olarak da gıdalarda güncel kullanımları söz konusudur (Magiatis vd., 2002).

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). Bunlar terpenler, fenolikler ve alkaloidlerdir (Hartmann, 1996). Sekonder metabolitlerin önemli ekolojik işlevleri, yani bitkinin çevresiyle olan etkileşiminde rolleri, aydınlatılmıştır. Geline son noktada, sekonder metabolitlerin bitkiyi herbivor ve patojen saldırılarına karşı koruduğu, allelopatide aktif rol oynadığı ve palinatörlerin ilgisini üzerinde toplamada önemli işlevlere sahip olduğu bilinmektedir (Babaoğlu, 2002).

Lamiaceae türlerinin ürettiği “terpen” sınıfına giren kimyasallar bu bitkilerden elde edilen uçucu yağların ana bileşenidir. Ancak bu bitkilerin ürettiği ekonomik açıdan değerli bileşikler uçucu terpenlerle sınırlı değildir. Uçucu olmayan diterpenler; karnosik asit, karnozol ve türevlerinin güçlü antioksidatif aktivite gösterdiği ve bu familyadan *Rosmarinus officinalis* (biberiye) bitkisinde bol miktarda bulunduğu bildirilmiştir (Frankel vd., 1996). Bu bitkinin özütleri, gıda ürünlerinin muhafazası amacıyla kullanılır. Ayrıca, çeşitli kanser türlerini ve lösemi’yi önlediği gösterilmiştir (Ho vd., 2000).

Kimyasal olarak, fenolik bileşikler aromatik halkada bir veya daha fazla hidroksil grubuna sahip bileşiklerdir (Harborne, 1967; Macheix vd., 1990; Shahidi ve Nacz, 1995). Fenolik bileşikler fenilalanin aminoasitinden türetilen sekonder metabolitlerin büyük bir grubunu oluşturur (Mann, 1987; Harborne, 1994). Fenolik bileşikler meyvelere ve yapraklara renk katma, böcek çekici veya itici olma, antimikrobiyal aktive, zararlı ultraviyole radyasyondan koruma ve otçul hayvanlardan korunma görev yaparlar (Harborne, 1967; Macheix vd., 1990; Harborne ve Williams, 2000).

Tüketim bazında bir bitkinin potansiyeli değerlendirilirken bu tür bileşiklerin potansiyel antioksidan aktiviteleri de değerlendirilir. Bir bitkinin fenolik maddeler yönünden içeriği genellikle bitki türlerine özgüdür (Manach vd., 2004).

Bitkilerde 8,000 'den fazla fenolik bileşik bulunur (Wrolstad, 2005). Başlıca fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidlerdir (Macheix vd., 1990; Robbins, 2003). Bitkilerdeki fenolik asitler çoğunlukla hidroksinamik ve hidroksibenzoik asitlerin türevlerinin yerini almaktadır. Fenolik bileşiklerin pek çoğu bitkilerde vakuollerde yer alır ve genellikle alkoller veya diğer organik çözücülerle özüt edilir. Genellikle bir özütleme sisteminde fenolik bileşiklerin depolama sırasında enzimatik bozunma ve polimerleşmeye uğrayacağı olasılığından dolayı kurutulmuş veya dondurulmuş halde ekstre edilir (Price vd., 1997). Özütleme çözücüsü materyale doğrudan eklenir, parçalama ve homojenizasyon yapılarak bulamaç haline getirilir. Bu işlemler sırasında özütleme oranını artırmak için ultrasonik ortam da yapılabilir. Bunun dışında perkolasyon veya soxlet ekstraksiyonunda kullanılabilir (Cimpan ve Gocan, 2002).

Labiatae familyası bitkilerinden *Thymus* cinsi üyeleri dünya genelinde 400 tür ile temsil edilir. Türkiye florasında ise 27’si endemik olmak üzere 64 takson bulunur (Davis, 1982). *Thymus* özütleri geleneksel tıpta, oral olarak dispepsi ve diğer gastrointestinal rahatsızlıklarda; soğuk algınlığı, bronşit ve boğmacaya bağlı öksürüğün tedavisinde; larenjit ve tonsillite karşı gargara şeklinde kullanılır. Ayrıca, Türkiye’de *Thymus* türleri,

toprak üstü kısımlarında bulunan uçucu yağlarındaki fenolik maddelerden dolayı kuvvetli antibakteriyel ve balgam söktürücü olarak etkilidir. Uçucu yağdaki timol (karvakrol izomeri) bronşlar üzerinde spazmolitik etki gösterir. Ayrıca *Thymus* uçucu yağları antifungal antibakteriyel, sekretolitik ve bronkospazmolitik etkileri nedeniyle solunum yolları enfeksiyonlarında, soğuk algınlığında kuru ve balgamlı öksürüklerde çay veya ekstrelerinden hazırlanmış bitkisel ilaçlardan yararlanılmaktadır (Baytop, 1984; Çubukçu, 2002; Kandemir, 2002).

İnsan vücudunun metabolik faaliyetler sonucu sürekli serbest radikaller, yani “zararlı” oksijen türleri, ürettiği ve bu ürünlerin bir dizi antioksidan savunma mekanizması ile bertaraf edildiği gerçeği 1970’lerde ortaya çıkarılmıştır. Kanseri, dolaşım bozuklukları, yaşlanma gibi olumsuz etkileri olan serbest radikallerin oluşumunu önleyecek veya ortadan kaldıracak doğal veya sentetik ürünler arayışına gidilmiştir (Zarzuelo ve Crespo, 2002). Bu konudaki ilk literatür bilgilerinde “fenolik” içeriği olan bitkisel özütlerin güçlü radikal süpürücü etki gösterdiği rapor edilmiştir (Alscher ve Hess, 1993). Aromatik bitkilerin uçucu yağları ve özütlerinin antioksidan aktiviteleri ile ilgili çok sayıda araştırmanın gerçekleştirildiği söylenebilir. Sadece *Thymus* türleri değerlendirildiğinde SCI, SCI-EXPANDED dergilerde yayınlanmış makale sayısı 200’ü geçmektedir (Örneğin; Sökmen, vd., 2004; Tepe, vd., 2004a; Tepe, vd., 2004b; Amarowicz, vd., 2009; Al-Fatimi, vd., 2010; Viuda-Marcos, vd., 2010). Bu makalelere yenileri eklenmektedir.

Bitkisel kökenli antioksidanlar genellikle fenolikler sınıfında toplanır ve bu kimyasalların antioksidan etkileri redoks özelliklerine dayanır. Bu yüzden indirgeyici ajanlar, hidrojen vericiler, tekli oksijen önleyiciler ve metal kelasyonu yapıcılar olarak etki ederler. Bitki fenolikleri, fenolik asitler, fenil propanoitler, monoterpenik fenoller, flavonoidler, tanenler, vs. gibi maddelerdir (Başer, 2004). Labiyatik asit ve diğer fenolik asitler, flavonoidler ve polifenoller; Lamiaceae türlerinde sıklıkla rastlanan nutrasötik (besin) ve biyoaktif kimyasallardır (Exarchou vd., 2002; Mastelic ve Jerkovic, 2003). Polar tabiatlı fenolik bileşiklerin serbest radikaller üzerinde güçlü süpürücü etkileri çeşitli makalelerde vurgulanmıştır (Komali, vd., 1999; Moller, vd., 1999, Vardar-Ünlü, 2002, Sökmen, vd., 2004). Özellikle *Thymus vulgaris*’ te ilk kez gösterilen polifenoller, rozmarinik asit ve metoksillenmiş flavonoidlerin varlığı bu tip özütlerde güçlü antioksidatif etkinin sorumlusu olduğu rapor edilmiştir (Adzet, vd., 1988, Lu ve Foo, 2001; Sökmen, vd., 2004).

Fenolik bileşiklerin belirlenmesi ve izolasyonu için en yaygın kullanılan teknik HPLC' dir (Merken ve Beecher, 2000; Robbins, 2003; Hatipoglu vd, 2013). Fenolik bileşikler özütlenme sırasında filtre edilerek doğrudan ters faz HPLC kolonuna uygulanabilir veya jel kromatografik tekniklerle bir ön fraksiyonlama, sıvı-sıvı özütlemesi veya katı faz özütlemesi uygulanabilir.

Doğal ürünlerin tüketimindeki artışa bağlı olarak tıbbi ve aromatik bitkilerin Dünya pazar hacmi hızlı bir artış göstermektedir. Önceleri doğadan toplanan bu bitkilere olan talebin artmasıyla birlikte tıbbi ve aromatik bitkilerin tarımına yönelik çalışmalara da hız verilmiştir. Bugün bir çok ülkede tıbbi ve aromatik bitkilerin tarımı yapılmakta ve birçok bitki türünde çeşit geliştirilmektedir. Ülkemizde de son yıllarda daha çok baharat olarak kullanılan ve dışsatımda önemli payları olan tıbbi ve aromatik bitkilerin tarımına başlanmıştır. Kaliteli, standartlara uygun ve sürekli bir üretim için; doğadan toplanan bitkilerden koruma-kullanma dengesi içinde yararlanılmalı "sürdürülebilir kullanım" ilkesine dikkat edilmeli, tarımı yapılan bitkilerde ise uluslararası geçerli "özel tarım uygulamaları" ilkelerine uyulmalıdır (Özgüven, 2005). Tarımı yapılan tıbbi ve aromatik bitkilerin sayısı belirli türlerle sınırlı kalmaktadır. Bu türlerin dışında kalan aromatik bitkiler tamamen doğadan, özellikle de tohumları oluşmadan çiçeklenme dönemlerinde toplanması ekolojik tahribata neden olmaktadır. Ayrıca, doğal ortamlarda yetişen türlerin yılda bir kez ve kısıtlı bir zaman aralığında toplanabilmesi de ayrı bir sorundur. Tıbbi açıdan önemli ve ekonomik değere sahip bu türlerin üretiminde ortaya çıkan bu tür kısıtlamaların önüne geçebilmek için bitki biyoteknolojisi yöntemlerinden bitki doku kültürü uygulamaları ile hem bitkilerin hem de sekonder ürünlerinin üretimi, ilk akla gelen alternatif ve etkili çözüm yoludur. Ayrıca bitki doku kültürü yöntemleri, bu bitkileri, ihtiva ettikleri aktif bileşikler bakımından daha verimli hale getirilebilmek için de başvurulabilecek en etkili ıslah yoludur (Matkowski 2008; Zuzarte 2010). Bu nedenle mevcut çalışmada ekonomik değeri yüksek kimyasal bileşiklerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

1.2. Doku Kültürleri

Bitki doku kültürü teknikleri uygulama alanları bitki biyoteknolojisi'nin temelini oluşturur. Çoğu otsu ve odunsu bitki türü potansiyel olarak *in vitro* koşullarda üretilebilir, bilimsel yaklaşımın yanı sıra ekonomik açıdan artı değer sunar (Babaoğlu vd., 2001).

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

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).

Kültürü başlatmak ve kültürdeki bitki hücrelerini uzun süre korumak veya bitkileri rejenerere 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).

İlk topraksız üretim şekli olan hidroponikler (sulu çözeltiler içinde bitkilerin topraksız ortamlarda yetiştirilmesi), tüm bir bitkinin laboratuvarında 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 aseptik şartlarda doku kültüründe kullanılmasıdır. Ayrıca zaman içinde çalışmaların organ ve doku gibi daha büyük parçalardan tek hücre kültürüne doğru yöneldiği görülmektedir. Günümüzde bitki doku kültürleri bir çok alanda uygulanmaktadır (Babaoğlu ve ark., 2001).

1.2.1. Mikroçoğaltım

Mikroçoğaltım; organize meristemlerden, henüz olgunlaşmamış veya olgunlaşmasını tamamlamış somatik hücrelerden doğrudan (organogenesis veya somatik embriyogenesis)

veya dolaylı (kallus, protoplast vb.) yollarla bitkilerin, aseptik koşullarda ve yapay besi ortamlarında 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. 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 and Huang, 1983; Schwenkel ve Grunewaldt, 1988), rizomların terminal ve lateral uçları (Pierik vd., 1988), yaprak ve gövde eksplantları (Nakano vd., 1999), soğan pulları ve yaprakları (Pelkonen ve Kauppi, 1999; Tıpırdamaz vd., 1999; Çakırlar vd., 2000; Tıpırdamaz, 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 olmakla birlikte, virüslerle kontrol edilen bazı karakterleri yok etmektedir (Bhojwani ve Razdan, 1983).

Mikroçoğaltımda kullanılan eksplantlar aseptik koşullara konulmadan önce tam anlamıyla sterilize edilmelidir. Sterilizasyon yöntemleri verici (donör) bitkinin yetiştiği ortamın özelliklerine ve eksplantın alındığı organa göre farklılık göstermektedir. Kullanılacak dezenfektan maddenin cinsi, 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 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 (GB5) ise, Gamborg tarafından 1968 yılında, soya kallus kültürleri için geliştirilmiş, nitrat azotu yüksek bir ortamdır. Linsmainer-Skoog (LS) ortamı, Linsmainer

ve Skoog tarafından 1965 yılında geliştirilmiştir ve MS ortamının organik bileşikler bakımından farklı bir versiyonudur.

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

Sürgün çoğaltım aşaması, genel olarak başlangıç için kullanılan ortamlar çoğaltım aşamasında da kullanılmakla birlikte, bazı durumlarda değişiklik yapılabilmektedir. Bitki dokularından organ farklılaşmasında oksin ve sitokinler önemli rol oynamaktadır. Sitokin/oksin oranının yüksek olması sürgün oluşumunu, oksin/sitokin oranının yüksek olması kök oluşumunu, oksin ve sitokin aynı miktarda kullanılması ise kallus oluşumunu desteklemektedir. 6-benzil amino pürin (BAP) çok sık kullanılan ve genellikle olumlu sonuçlar veren bir sitokinidir. Genel olarak 1-2 mg/L sitokin 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 sitokinidir. 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 sitokin varlığı köklenmeyi engellemektedir (Mansuroglu ve Gürel, 2001).

Yapılan incelemeler neticesinde *Thymus pseudopulegioides* bitkisinin *in vitro* çoğaltımı hakkında literatür verilerine rastlanmamıştır. Ancak diğer *Thymus*, *Satureja* ve *Origanum* türlerine ait *in vitro* çoğaltımı yapılmış birçok çalışma mevcuttur (Örneğin; Özkum, 2006; Ulukapı, vd., 2008; Özkeçeci, 2010; Kaya, 2011; Öztürk, 2012; Tanrıver, 2013). Yapılan bu çalışmalara her geçen gün yenileri eklenmektedir.

1.3. *Thymus* Cinsinin Genel Özellikleri

Küçük çalılar, yastıksı veya en azından tabandan odunsu çok yıllık bitkilerdir. Yaprak kenarları düz veya revolut ve/veya kenarda kalınlaşmıştır. Yapraklar saplı veya sapsız, çoğu zaman laminanın tabanına doğru siliattır. Brakteler, kaliksler ve özellikle yapraklar, renksizden parlak kırmızıya değişen renkte guddeler taşır; genellikle basit tüyler bulunur. Genellikle ginodioiktir (Davis, 1982). Ülkemizde tamamı çok yıllık olan *Thymus* cinsinin 38 türü kayıtlıdır.

1.3.1. *Thymus pseudopulegioides* Klokov & Des- Shost Sistematikteki Yeri

T. pseudopulegioides'in halk arasında Anzey çayı, Anu ve Anuk gibi yerel isimleri kullanılmaktadır. Midevi, yatıştırıcı, kurt düşürücü, kan dolaşımını uyarıcı etkileri olup mutfakta baharat olarak ve ülkemizin çeşitli yörelerinde çay olarak tüketilmektedir (Baytop, 1999). Çiçekli uç kısımları ve yaprakları, infüzyon, sıvı özüt, tentür, şurup, toz ve tıbbi şarap halinde kullanılır. Antiseptik, balsamik, kasılmaya karşı gaz giderici ve antibiyotik özelliklere sahiptir. Kekik mutfakların, parfüm sanayinin ve içkilerin destilasyonunda çok sık kullanılır. Boğmaca, kancalı kurtların tedavisinde, ağız gargarası, dişetleri tedavisinde kullanılır (Gürsoy ve Gürsoy, 2004).

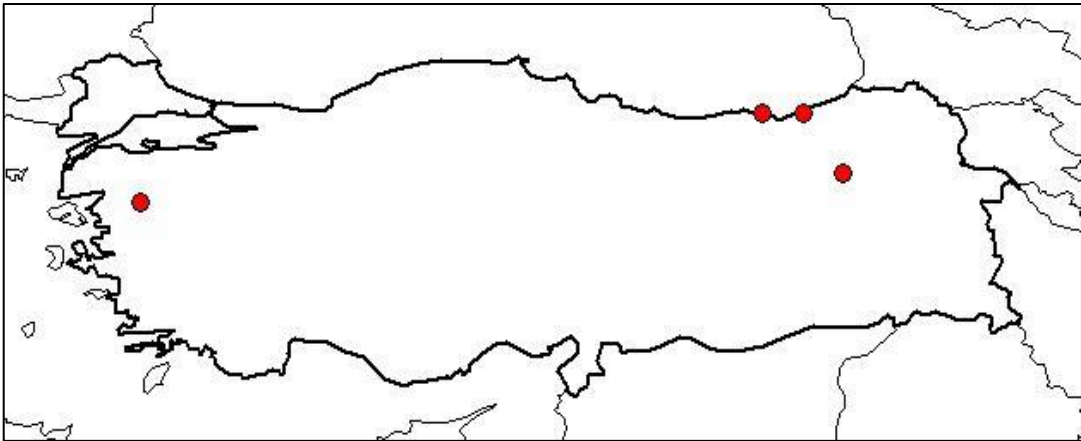
Bitki gevşek tümsekler oluşturur; dalları odunsu taban kısımlara sahiptir, yatıktan hemen hemen dik şekle kadar değişir. Uzun sürünücü çiçeksiz sürgünleri bulunmamaktadır. Temmuz ve Ağustos aylarında çiçeklenir. Çayırlarda, kayalık yamaçlarda, dağ eteklerinde bulunur. Ülkemizde 1525-2800 m yükseklikte yetiştiği kayıtlıdır (Davis, 1982). A7 Giresun: Tamdere'nin yukarısı 1620-1700 m, Trabzon: Hamsiköy, 1525 m, A8 Trabzon: Soğanlı Dağı, Çaykara'nın yukarısı, 1700 m, Rize: İkizdere, Batlaş Tepe, 2800 m, Erzurum: Hunut Dağı, 1900 m. A8 Trabzon: Maçka, Ormanüstü Köyü yaylası, 1850 m, AEF 23176!

Tablo 1. *Thymus pseudopulegioides* Klokov & Des.- Shost. botanik özellikleri (Davis, 1982)

Alem	: Plantae
Alt Alem	: Tracheobionta
Bölüm	: Magnoliophyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Alt Sınıf	: Asteridae
Takım	: Lamiales
Familya	: Lamiaceae
Cins	: <i>Thymus</i>
Tür	: <i>Thymus pseudopulegioides</i> Klokov & Des- Shost



Şekil 1. *Thymus pseudopulegioides* Klokov & Des- Shost'un çiçekli hali (URL-1)



Şekil 2. *T. pseudopulegioides* taksonunun Türkiye'deki yayılış alanları (TÜBİVES)

1.4. Amaç

Tez çalışması kapsamında, büyüme düzenleyicileri olarak sadece sitokin ve sitokin benzeri thidazuron ile desteklenmiş temel besi ortamlarında *T. pseudopulegioides* bitkisinin mikroçoğaltımı, *in vitro* koşullarda oluşturulan fidelerin fenolik bileşiklerinin analizi ve akabinde özütlerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Zira, *Thymus pseudopulegioides* Klokov & Des- Shost bitkisinin *in vitro* doku kültürleri ile fenolik bileşiklerinin tespiti ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi hakkında literatür bilgisi bulunmamaktadır.

Bu amaç doğrultusunda mikroçoğaltımı değerlendirmek sürgün boyu, yapraklanma sayısı, çoklu sürgün oluşumu (kardeşlenme sayısı) ve % kuru ağırlık bazında biyokütle parametreleri değerlendirilmiştir.

Fenolik içerikleri, toplam fenolik (Folin–Ciocalteu yöntemi) ve toplam flavonoid miktarları metanol özütlemesine tabi tutularak HPLC yöntemi ile belirlendi. Ayrıca elde edilen metanol özütlerinin antioksidan aktiviteleri, iki tamamlayıcı yöntem olan DPPH ve β -karoten linoleik asit aktivite testleri kullanılarak belirlendi.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Bitki Materyali

T. pseudopulegioides Klokov&Des-Shost tohumları Ağustos 2011’de Rize-Anzer (A8 Rize: Anzer, 1200m, Ağustos, 40⁰ 33' 04.4" E, 40⁰ 39' 29.8" N) lokasyonunda doğal olarak yetişen habitatlarından toplandı. Tohumlar, kültüre alınıncaya kadar kurutma kâğıtları içerisinde +4 °C’de bekletildi. Tohumların toplandığı bitkilerin teşhisi Artvin Çoruh Üniversitesi Arş. Gör. Mehmet DEMİRALAY tarafından yapıldı. Teşhiste bir sonraki dönem aynı lokasyonda yer alan ve tohumlarının toplandığı çiçeklenmiş bitkiler değerlendirildi. Teşhiste P. H. Davis’in (1965-1988) “Flora of Turkey and the Aegean Islands” adlı eserinden yararlanıldı.

2.1.2. Besi Ortamları

Araştırma kapsamında, Duchefa (Haarlem-The Netherlands) (katalog 2010-2012) firmasından temin edilen farklı içeriklere sahip hazır besi ortamları kullanıldı (Gamborg B5 (G-B5), Linsmainer Skoog (LS), Murashige ve Skoog (MS), Schenk Hildebrant Medium (SH), White Medium (WM). Kullanılan besi ortamları ve içerikleri Tablo 2’de verildi. Denemelerde besi ortamları katılaştırıcı ajan olarak %0,8 Phytoagar (Duchefa, The Netherlands) ve karbon kaynağı olarak %2 sukroz (Sigma-Aldrich, Austria) kullanıldı. Besi ortamları, amaca göre, aşağıda ayrıntılı verilen bitki büyüme düzenleyicileri ile desteklendi.

2.1.3. Bitki Büyüme Düzenleyicileri

2.1.3.1. Sitokinler

Bu tez çalışmasında, sitokin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinden 6-benzilaminopürin (6-BA, diğer adıyla BAP) ve 6-furfurilaminopürin/KINetin (KIN)

kullanıldı. Ayrıca sitokin benzeri kimyasal olan Thidiazuron (TDZ) çalışmalarda sitokinler grubunda değerlendirildi. Kullanılan tüm bitki büyüme düzenleyicileri Biochemie (Netherlands) firmasından temin edildi.

Tablo 2. Çalışma kapsamında kullanılan temel besi ortamları ve içerikleri

Makro Elementler (mg/L)	mg/L				
	G-B5	LS	MS	SH	WM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,10	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,20	0,001
FeNaEDTA	36,70	36,70	36,70	19,80	-
H ₃ BO ₃	3,00	6,00	6,00	5,00	1,50
KI	0,75	0,83	0,83	1,00	0,75
MnSO ₄ .H ₂ O	10,00	16,90	16,90	10,00	5,31
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,10	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,00	8,60	8,60	1,00	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	-	3,47
MoO ₃	-	-	-	-	0,0001
Na ₂ SO ₄	-	-	-	-	200,00
Mikro Elementler (mg/L)					
CaCl ₂	113,23	332,02	332,02	151,00	-
KNO ₃	2500,00	1900,00	1900,00	2500,00	80,00
MgSO ₄	121,56	180,54	180,54	195,05	351,60
NaH ₂ PO ₄	130,44	-	-	-	16,80
(NH ₄) ₂ SO ₄	134,00	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	-	170,00	170,00	-	-
NH ₄ NO ₃	-	1650,00	1650,00	-	-
Ca(NO ₃) ₂ susuz	-	-	-	-	208,47
(NH ₄)H ₂ PO ₄	-	-	-	300,00	-
Vitaminler (mg/L)					
miyo-Inositol	100,00	100,00	100,00	1000,00	-
Nikotinik asit	1,00	-	0,50	5,00	-
Piridoksin HCl	1,00	-	0,50	0,50	-
Tiyamin HCl	10,00	0,40	1,00	5,00	-
Gilisin	-	-	2,00	-	-

2.2. Metot

2.2.1. Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu

T. pseudopulegioides'in olgunlaşmış tohumlarının yüzey sterilizasyonları, iki farklı yöntem ile gerçekleştirildi. Bu yöntemler aşağıdaki Bölüm 2.2.1.1. ve 2.2.1.2'de verildi. Bu iki yöntemden elde edilen tohumların canlılık yüzdeleri ve kültür ortamlarındaki kontaminasyon sıklıklarına göre en uygun sterilizasyon koşulu belirlendi ve tüm denemelerde bu kriter izlendi.

2.2.1.1. Sodyum Hipoklorit Çözeltisi Kullanılarak Yapılan Sterilizasyon

Bu yöntemde, tohumlar 10 dakika % 20'lik ticari çamaşır suyu (Domestos) ile manyetik karıştırıcı üzerinde yavaşça karıştırılmak suretiyle muamele edildi. Bu solüsyondan alınan tohumlar, 3 kez steril saf sudan geçirilerek durulandı. Sterilize edilen tohumların bir kısmına canlılık testi uygulandı. Geriye kalan tohumlar belirlenen besi ortamlarına ekildi ve ortamlardaki kontaminasyon oluşumları gözlemlendi. Her bir deneme 3 tekrerrür olacak şekilde tasarlandı.

2.2.1.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Kullanılarak Yapılan Sterilizasyon

Tohumlar, hazırlanan % 5'lik sukroz çözeltisi içerisinde 12 saat bekletildikten sonra, 30 dakika da H₂O₂ ile muamele edildi. Steril pipetör ile H₂O₂'in çekilmesinin ardından tohumların bir kısmına canlılık testi uygulandı. Geriye kalan tohumlar belirlenen besi ortamlarına ekildi ve ortamlardaki kontaminasyon oluşumları gözlemlendi. Her bir deneme 3 tekrerrür olacak şekilde tasarlandı.

2.2.3. Tohumların Canlılık Testi

Tohumların sterilizasyon öncesi ve sonrası canlılık testleri literatürde verilen yöntemlere göre gerçekleştirildi (Lauzer vd., 1994). Her bir deneme grubuna ait tohumlar, %1'lik TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloride, Sigma-Aldrich, Austria) çözeltisine

konuldu ve karanlıkta, 30 °C’de, 48 saat bekletildi. Bu süre sonunda, tohumlar binoküler mikroskop altında incelendi ve turuncu-kırmızı renkte görünen tohumlar canlı olarak kabul edildi. Elde edilen verilere göre, tohumların yüzey sterilizasyonunda kullanılan yöntemlerin tohumların canlılıkları üzerindeki etkileri belirlendi.

2.2.4. Besi Ortamlarının Hazırlanması

Gamborg B5 (G-B5), Linsmainer Skoog (LS), Murashige ve Skoog (MS), Schenk Hildeprant Medium (SH), White Medium (WM) temel besi ortamları, önerilen prosedür doğrultusunda hazırlandı. Karışıma karbon kaynağı olarak % 2 sukroz ve katılaştırıcı % 0,8 phytoagar ilave edildi. Eğer gerekli ise bitki büyüme düzenleyicisi ya da düzenleyicileri de eklenerek, çözeltilerin pH’ları 1 molar NaOH ve 1 normal HCl kullanılarak 5,7-5,8 aralığına ayarlandı. Hazırlanan ortamlar otoklavda 1 atm basınçta 121°C’de 15 dakika süre ile steril edildi. Otoklavdan çıkarılan besi ortamları hafifçe çalkalanarak agarın homojen olarak dağılması sağlandı ve transfer odasında soğumaya bırakıldı. Yüksek sıcaklıkta etkisini kaybeden bitki büyüme düzenleyicileri 0,22 µm çapındaki filtrelerle sterilize edildi ve otoklavdan sonra besi ortamı soğumadan ortama eklendi. 40°C civarına kadar soğutulan besi ortamları, sterilize kabin içerisinde kültür kaplarına aktarıldı.

2.2.5. *In vitro* Uygulamalar ve Denemelerin Kurulması

2.2.5.1. *In vitro*’ da Tohumların Çimlendirilmesi

Herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi kullanılmadan 5 farklı temel besi ortamının (G-B5, LS, MS, SH ve WM) tohumların çimlenmesi üzerine etkileri araştırıldı. Yüzey sterilizasyonları gerçekleştirilen olgun tohumlar çimlendirme çalışmaları için kültür ortamlarına (her bir kültür kabında 5 tohum olacak şekilde) ekildi. Kültür kapları 24±2 °C’ye ve 16/8 saat fotoperiyot rejime ayarlanmış beyaz floresan aydınlatmalı (50 µmol m⁻² s⁻¹) iklim dolaplarında inkübe edildi. Kültüre alınan örneklerin çimlenme süreleri ve 1 aylık süreç sonundaki çimlenme yüzdeleri belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre *T. pseudopulegioides* Klokov&Des-Shost türünün çimlenmesi için en uygun besi ortamı belirlendi.

2.2.5.2. Doğrudan Organogenez Çalışmaları

Bu çalışmada öncelikle en etkili temel besi ortamını belirlemek amacıyla, daha önce bahsi geçen, B5 (G-B5), LS, MS, SH ve WM 3 ve büyüme düzenleyici olarak sitokinin içermeyen temel besi ortamının çimlenme ve eksplant verimi üzerine etkisi araştırıldı.

En etkili besi ortamının MS olduğu bulunduktan sonra, sitokin ve benzeri Thidiazuron (TDZ) nin farklı bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanıldığı besin ortamlarında *T. pseudopulegioides*'in mikroçoğaltımı üzerine etkileri araştırıldı. Bu aşamada her büyüme düzenleyicilerinin her birinin 4 farklı derişimi hazırlandı.

In vitro koşullarda çimlendirilen örneklerden elde edilen sürgünlerden kesilen yaklaşık 1 cm boyunda gövde parçaları eksplant olarak değerlendirildi ve belirlenen bitki büyüme düzenleyicileri ile desteklenen MS ortamına aktarıldı. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak, sitokin grubundan 6-BA (6- benzil adenin) ve KIN (KINetin) ve sitokin benzeri bitki büyüme düzenleyicisi olan TDZ (Thidiazuron)'nin, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L ve 2,0 mg/L'lik derişimleri kullanıldı. Kùltürler, 24±2 °C'ye ve 16/8 saat fotoperiyodik rejime ayarlanmış beyaz floresan aydınlatmalı (50 µmol m⁻² s⁻¹) iklim dolaplarında 2 ay boyunca inkübe edildi. Bu süre sonundaki fidelerin; ortalama sürgün uzama miktarları, yaprak sayıları ve eksplant başına çoklu sürgün sayıları belirlendi. Ayrıca, hasat edilen fidelerin, yaş ve kuru ağırlıkları üzerinden % kuru ağırlıkları belirlendi.

Fidelerin yaş ağırlıkları belirlendikten sonra, güneş ışığı almayan ortamda, loş oda sıcaklığında kurutuldu ve bu kuru ağırlıklar göz önünde bulundurularak 100 g yaş bitki ağırlıklarına tekabül eden kuru ağırlıklar hesaplandı. Sonra özütleme işlemleri için kurutulan bitkisel materyal toz haline getirildi. Tüm kurutma işlemlerinde aynı ortam ve koşullar göz önüne alındı. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS temel besi ortamından elde edilen veriler kontrol olarak kullanıldı.

2.2.6. Özütlerin Elde Edilmesi

In vitro 'da MS besi ortamında 3 farklı bitki büyüme düzenleyicisi (KIN, TDZ ve 6-BA) ve 4 farklı derişim (0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L ve 2,0 mg/L) kullanılarak yetişen *T. pseudopulegioides* fideleri uygun ortamda kurutulduktan sonra toz haline getirildi. Toz haline getirilen bitkisel materyal kullanılarak yukarıda bahsedilen her bir ortamdan elde edilen örnekler özütleme işlemine tabi tutuldu. Elde edilen özütlerin toplam fenolik ve

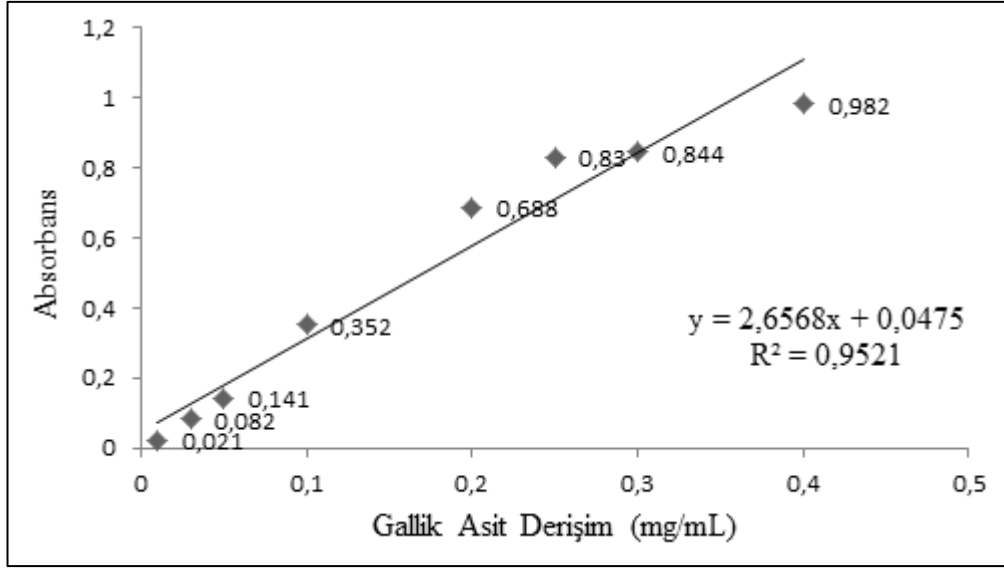
flavonoid miktarları ile fenolik içerikleri belirlendi. Her bir çalışma için izlenen özütleme yöntemleri, aşağıda ilgili başlık altında verildi.

2.2.6.1. Toplam Fenol İçeriği

Folin–Ciocalteu yöntemi tungsten ve molibden elementlerinin bir karışımı olan reaktifin kimyasal olarak indirgenmesini temel alan spektrofotometrik bir yöntemdir. (Singleton ve Rossi., 1965). Metal oksitin indirgenmesi sonucu 765 nm’de absorpsiyon gösteren mavi bir renk oluşur. Bu rengin şiddeti fenollerin derişimiyle doğru orantılıdır (Monica Guisti, M. ve Wrolstad, R., E., 2001).

T. pseudopulegioides Klovov&Des-Shost bitkisinin 3 farklı bitki büyüme düzenleyicisinin farklı derişimlerindeki özütlerden ayrı ayrı belli miktarlarda alınıp filtre kağıdı üzerinde 25 mL metanole tabi tutuldu. Elde edilen süzüntü uçurularak geriye kalan kısım Folin- Ciocalteu yöntemi kullanılarak toplam fenolik madde miktarının tayini için hazırlandı.

Artan derişimler de gallik asit standartları kullanılarak kalibrasyon grafiği elde edildi. Bu amaçla 10 mg gallik asit 1 mL metanolde çözüldü. Bu çözülden 1-40 µL’lik kısımlar alınarak metanol ile 1 mL’ye seyreltildi. Seyreltilmiş her bir çözülden 50 µL’lik kısımlar tüplere alınarak üzerine 750 µL Folin–Ciocalteu’s reaktifi/su (1:14) karışımı ve % 20’lik sodyum karbonat (Na₂CO₃) ’dan 200 µL eklendikten sonra karanlıkta 30 dk. bekletildi ve oluşan yeşil renkli kompleksin 760 nm’deki absorpsiyonu ölçüldü. Gallik asit derişimine karşı ölçülen absorpsiyon değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 3). Her bir deney üç kez tekrarlandı. Özütlerin toplam fenolik bileşik miktarları gallik asit kalibrasyon grafiğinden elde edilen veriler kullanılarak hesaplandı.



Şekil 3. Toplam fenol tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği

2.2.6.2. HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analizi

In vitro'da yetiştirilen *Thymus pseudopulegioides* bitkisinin 3 farklı bitki büyüme düzenleyicisinden 4 farklı derişimlerde hazırlanan kuru örneklerinden 0,5'er g alınarak 3 saat boyunca metanolle ultrasonik banyoda özütleme yapıldı ve 40°C'de rotary evaporatörde metanol uçuruldu. Kalıntı 5 mL deiyonize suda çözülerek etil asetat ve dietileter ile kısımlandırıldı ve organik fazlar birleştirilerek çözücüler uçuruldu. Kalıntı uygun miktarda metanolde çözülerek HPLC analizlerine geçildi. Kromatografik analizler, asetik asit ile modifiye edilen asetronitril ve sulu fazlara uygulanan gradient programı ile C18 (Agilent) kolonu (150x4,6 mm ıd, 5µ) kullanılarak 280 nm'de HPLC-UV (Agilent 1100 series) ve HPLC-DAD (Agilent 1200 series) ile 280 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Bileşenlerin nicel değerlendirmesinde enjeksiyon hacmi 20 µL olarak kullanıldı ve her bir bileşenin bilinen derişimlerinde hazırlanan standart karışımı kullanıldı. Aynı şartlarda koşturulan örnek ve standartların pik alanlarının integrasyonu ile miktar analizi yapıldı. Nicel hesaplamalarda propil paraben, HPLC' de iç standart olarak kullanıldı.

2.2.6.3. Toplam Flavonoid İçeriği

Her özütün toplam flavonoid içeriği stok çözeltileri (4 mg ml^{-1}) metanol içinde hazırlanmıştır. İçinde $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (% 2 metanol çözeltisi) 1,5 mL ve 0,5 mL örnek ilave edildi. Kapalı şişe 10 dakika boyunca karanlıkta tutuldu. Absorbans 430 nm'de okundu ve AlCl_3 metanol çözeltisi boş olarak kullanıldı (her bir ölçüm üç tekrar halinde). Rutinin bir dizi seyreltisi hazırlandı ve eş zamanlı olarak analiz edildi. Flavonoid özüt miktarları mg/L rutin eşdeğer flavonoid (Lamaison 1991) olarak ifade edildi.

2.2.7. Antioksidan Aktivite Testleri

Bitki özütleri gibi pek çok kompleks içeriğin antioksidan aktivitesinin belirlenebilmesi için çok sayıda yöntem bulunmaktadır. Bu çeşitli yöntemlerden sadece bir tanesini uygulayarak özütün veya kompleks karışımın olası antioksidan aktivitesini belirlemek mümkün değildir. Çünkü sadece bir yöntem antioksidan aktivite gösteren bir maddenin tüm olası etki mekanizmalarını belirlemek için yeterli değildir. Bu doğrultuda bitkilerden elde edilen özütlerin ve uçucu yağların antioksidan aktiviteleri iki komplementer yöntem olan 2,2-Difenilpikrilhidrazil (DPPH) ve β -Karoten Renk Açılımı Yöntemi – Spektrofotometrik Yöntem ile belirlendi.

2.2.7.1. Bitki Özütlerinin Antioksidan Aktivite DeneYleri İçin Hazırlanması

2.2.7.1.1. 2,2-Difenilpikrilhidrazil (DPPH) Yöntemi

Oda sıcaklığında, loş ortamda kurutulan fiderlerden elde edilen toz hale getirilmiş materyal (50 mg) metanol (30 mL) içeren Erlenlere alındı. Çalkalayıcıya konulan özüt + çözücü karışımı 48 saat boyunca oda sıcaklığında maserayona tabi tutuldu. Karışım daha sonra filtre edildi (Whatman No: 40 Filtre kağıdı). Filtrasyonun ardından toplanan sıvı evaporasyonla uçuruldu. Elde edilen metanol özütlerinden içeriği $30 \mu\text{g/ml}$ olacak şekilde stoklar hazırlandı. DPPH testi için hazırlanan stoklarda çözücü olarak metanol kullanıldı.

2.2.7.1.2. β -Karoten Yöntemi

Metanol özütlerinden içeriği 2 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde stoklar hazırlandı. β -Karoten yöntemi için hazırlanan stoklarda çözücü olarak etanol kullanıldı.

2.2.7.2. 2,2-Difenilpikrilhidrazil (DPPH) Yöntemi

Hazırlanan tüm özütlerin antioksidan aktiviteleri literatürde tanımlanan yöntem izlenerek yapılmıştır (Cuendet, *ve ark.* 1997; Kirby ve Schmidt, 1997, Burits ve Bucar, 2000; Burits, *ve ark.* 2001).

Bu test yöntemi, kararlı serbest radikal 2,2-difenilpikrilhidrazil (DPPH)'in elektron veya hidrojen atomları veren antioksidan kimyasalların varlığında, bu kimyasallar tarafından süpürülmesi (temizlenmesi) ile karakteristik mor renginin açılmasının spektrofotometrik olarak belirlenmesi temeline dayanır. Yani, materyal ne kadar güçlü antioksidan özelliğe sahipse metanolik DPPH çözeltisinin rengini o kadar çok açması beklenir. Bu yöntemde test edilecek olan özütlerin, çeşitli derişimlerde hazırlanan 50 μL 'lik metanol içinde hazırlanan çözeltisi %0.004'lük (w/v) DPPH çözeltisinin 5 mL'si ile karıştırılır. 30 dakikalık karanlıkta inkübasyon sonrasında, örneklerin absorbansı 517 nm'de ölçüldü. Özütlerin absorbans değeri boş kontrole (50 μL metanol) karşı değerlendirildi. Her bir özütün ve boş kontrol testlerinin absorbans değerleri kullanılarak özüt % inhibisyon değerleri aşağıda verildiği şekliyle hesaplandı (Burits ve Bucar, 2000).

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (1)$$

Elde edilen % inhibisyon değerleri özüt derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek her bir özütün %50 renk açılımını sağlayan derişimleri %50 inhibisyon (IC_{50}) değeri olarak hesaplandı. Pozitif kontrol olarak BHT ve askorbik asit kullanıldı. Aktivite belirlenen özütlerin içeriklerine uygun saf maddelerle aynı testler tekrarlanarak aktiviteden sorumlu bileşenler belirlenmeye çalışıldı.

2.2.7.3. β -Karoten Renk Açılımı Yöntemi – Spektrofotometrik Yöntem

Görsel olarak değerlendirilen özütler daha anlamlı olması yönünden spektrofotometrik olarak da çalışıldı. Bütün özütler ve pozitif kontrol BHT çözeltileri 2 g/L olacak şekilde etanolde çözülerek test örnekleri hazırlandı. Spektrofotometride kullanılacak olan β -karoten-linoleik asit karışımı şu şekilde hazırlandı: 0,5 mg β -karoten 1mL kloroformda çözüldü. 25 μ L linoleik asit 200 mg Tween 80 ile emülyon haline getirilerek β -karoten çözeltisine eklendi. Karışım iyice çalkalandıktan sonra evaporatörde 50 °C’de kuvvetli vakum uygulanarak kloroformu uçuruldu. Karışım üzerine, linoleik asitin oksidasyonunu sağlayacak olan önceden 30 dakika boyunca oksijenle doyurulmuş (akış hızı 100 mL dak⁻¹) distile sudan 100 mL eklendi ve 1 dakika boyunca hızlı bir şekilde karıştırıldı. Bu işlem sonunda berrak, sarı renkli β -karoten-linoleik asit test karışımı elde edildi. Bu karışımdan 250 μ L’lik kısımlar, çoklu otomatik okuyucu tabaklarına (mikrotiter plate) alındı. Her bir özüt ve kontrol için üç tekrarlı seriler hazırlandı. 35 μ L’lik test çözeltileri, ilgili serilere ilave edildi. Aynı miktar etanol kontrol serisine uygulandı. Daha sonra, çoklu tabaklar ağızları kapatılarak oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildi ve belli zaman aralıklarında hazırlanan serilerin absorbansı Mikrotiter okuyucuda (Bio-KINetics EL312) 490 nm’de ölçüldü. Yine BHT’nin ve özütlerin absorbans değeri (üç tekrarın ortalaması) karşılaştırılarak bağıl antioksidan aktivite (BAA) değerleri aşağıdaki eşitliklerden hesaplandı.

$$BAA = \frac{\text{Özütün Absorbansı}}{\text{BHT' nin Absorbansı}} \quad (2)$$

2.2.8. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Yapılan bu tez çalışmasında 3 farklı bitki büyüme düzenleyicisinin 4 farklı derişiminde kardeşlenme sayısı, sürgün boyu ve yapraklanma sayıları verileri elde edildi. Bu verilerin istatistiksel analizi yapıldı. Bunun için SPSS 17,0 programında çok yönlü Duncan testi kullanıldı. Ölçümleri yapılan değerler arasındaki istatistiki farklar ve benzerlikler ortaya konuldu (P < 0,05)

3. BULGULAR

3.1. Tohumların Yüzeysel Sterilizasyonu ve Canlılık Yüzdeleri

Tohumların çamaşır suyu ve H₂O₂ ile yüzeysel sterilizasyonları sonrası elde edilen canlılık yüzdeleri ve besi ortamlarındaki kontaminasyon sıklıkları Tablo 3'te verilmiştir. Kontrol grubu olarak değerlendirilen tohumların (sterilize edilmemiş) canlılık yüzdesi % 64,5'tir. Bu iki yöntemden elde edilen canlılık oranları; sodyum hipoklorit ile sterilizasyona tabi tutulanlarda %59,7 ve H₂O₂ ile olanlarda ise % 62,8 olduğu hesaplanmıştır. İki farklı yöntemden elde edilen canlılık yüzdelerinin, kontrolden elde edilen değerlere yakın olduğu görülmüştür. Ancak besi ortamlarındaki kontaminasyon sıklıklarına bakıldığında; H₂O₂ ile sterilize edilen tohumların %10, çamaşır suyu ile sterilize edilen tohumların %90 oranında kontaminasyon görülmüştür. Bu sonuçlardan hareketle, H₂O₂ ile yapılan sterilizasyon yönteminin, *T. pseudopulegioides* tohumlarının yüzeysel sterilizasyonlarında kullanılmasının daha uygun olduğu sonucuna varılmış (Tablo 3) ve sonraki denemelerde H₂O₂ (%62) ile sterilizasyon tercih edilmiştir.

Tablo 3. *Thymus pseudopulegioides* tohumlarının canlılık testi ve besi ortamlarındaki kontaminasyon yüzdeleri

Sterilizasyon denemeleri	Canlı tohum oranı (%)	Kontaminasyon sıklığı (%)
Sodyum Hipoklorit	59,7±2,0	90±2,0
H ₂ O ₂	62,8±2,6	11±2,2
Kontrol ¹	64,5±3,6	100

¹: Yüzeysel sterilizasyonuna tabi tutulmayan tohumlar kontrol grubu olarak değerlendirildi.

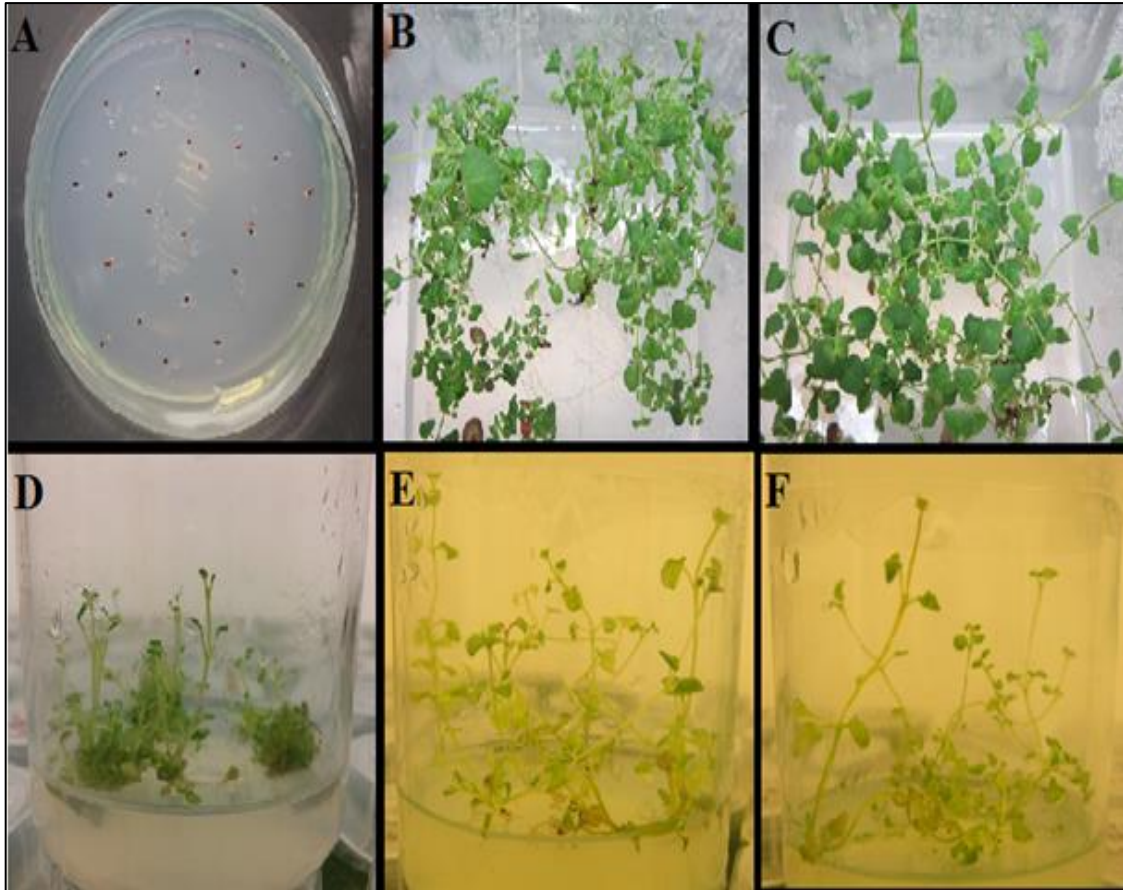
3.2. Farklı Besi Ortamlarının Çimlenme Üzerine Etkisi

Denenen 5 farklı besi ortamından elde edilen çimlenme verileri Tablo 4'te verildi. MS, LS, WM, GB-5 ve SH besi ortamlarından elde edilen çimlenme oranları sırasıyla, %92,57, %90,19, %71,18, %90,93 ve %60,91 olarak belirlendi. Bu besi ortamlarındaki en kısa çimlenme süreleri ise sırasıyla 5, 11, 6, 5 ve 7 gün olarak tespit edildi (Tablo 4). Bu sonuçlara göre en kısa zamanda ve en yüksek çimlenme oranını veren besi ortamının MS

olduğu belirlendi. Bu olumlu sonuçlardan dolayı, bundan sonraki denemelerde temel besi ortamı olarak MS tercih edildi (Şekil 4).

Tablo 4. *Thymus pseudopulegioides* tohumlarının farklı besi ortamlarındaki çimlenme verileri

% / Gün	MS	GB-5	LS	WM	SH
Çimlenme oranı (%)	92,57±2,3	90,93±2,8	90,19±3,1	71,18±2,6	60,91±3,2
Minimum çimlenme zamanı (gün)	5	5	11	6	7



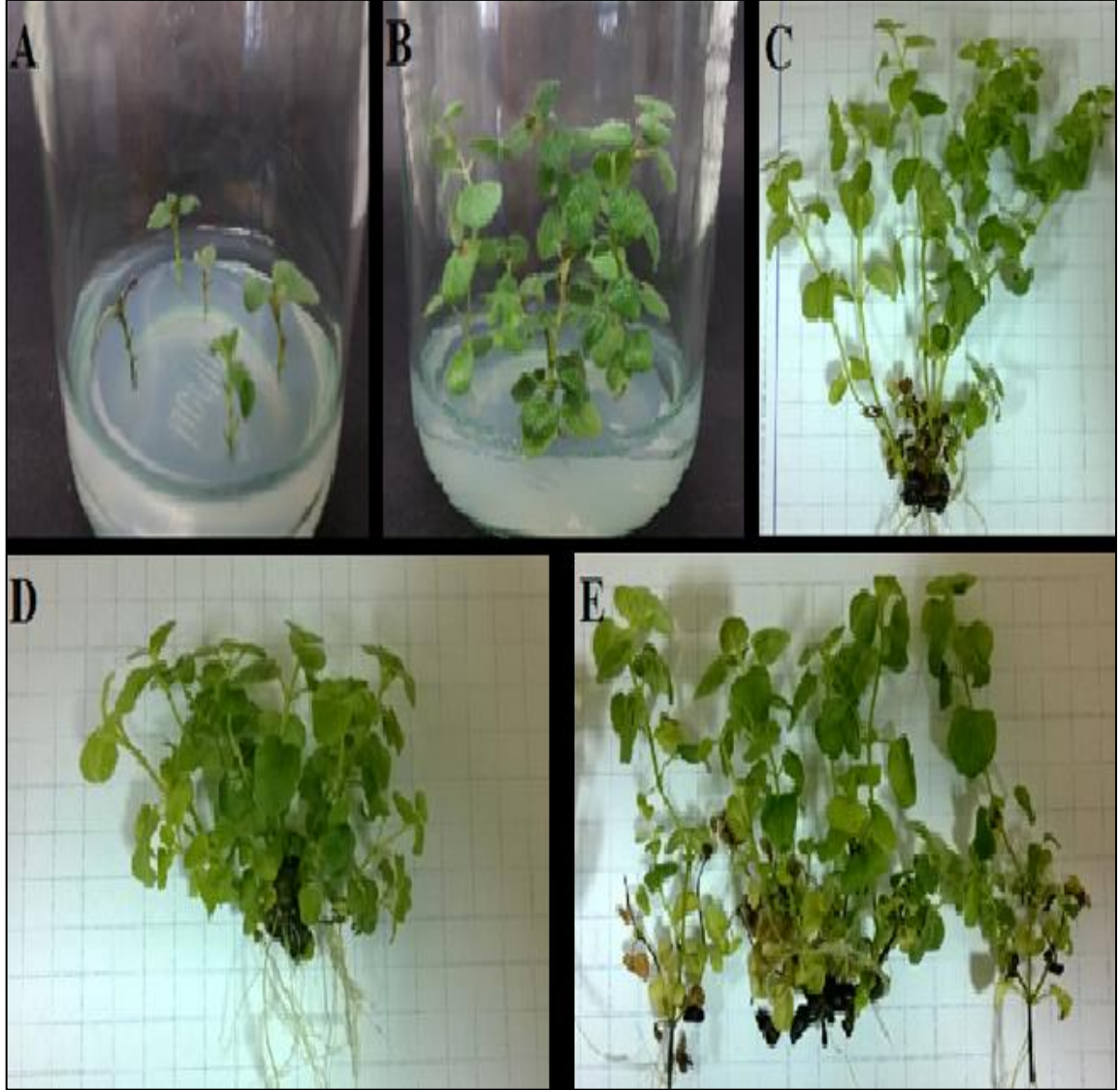
Şekil 4. Doğadan toplanan tohumlar (A), farklı temel besi ortamlarında çimlenmeleri; MS (Murashige & Skoog) (B), GB-5 (Gamborg's B-5) (C), SH (Schenk&Hildebrant)(D), WM (White Medium)(E) ve LS (Linsmaier & Skoog)(F)

3.3. Doğrudan Organogenez Çalışmaları

Çalışmanın bu safhasında, en etKIN temel besi ortamının seçildiği, büyüme düzenleyicisi içermeyen agarla katılaştırılmış MS ortamına, çimlendirilmiş fidelerden elde edilen ortalama $19.7 \pm 2,0$ uzunluğunda olan sürgünlerden 1'er cm boyutunda eksplantlar yerleştirildi.

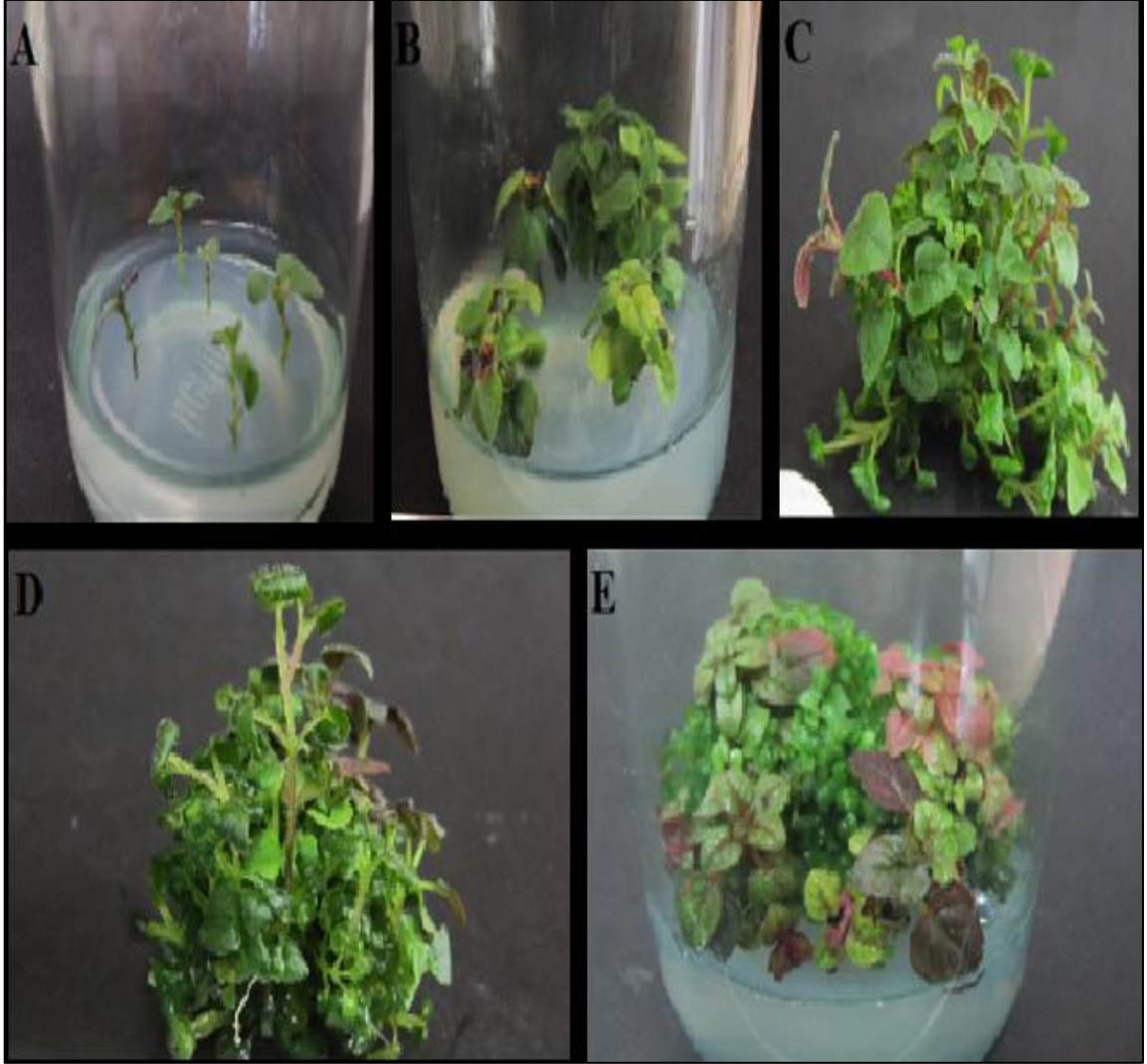
Eksplantlarda görülen kararına üzerine, yeni eksplantlar bu kez her bitki bir büyüme düzenleyicisinin (KIN, 6-BA ve TDZ) farklı derişimleri (0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L) ile desteklenen MS ortamlarında in vitro organogenez çalışmaları başlatıldı. *T. pseudopulegioides* fidelerinin sürgün uzaması, yaprak sayısı, çoklu sürgün oluşumu ve % kuru ağırlıkları üzerindeki etkilerinin tespit edildiği denemelerden elde edilen sonuçlar Tablo 5'te sunuldu.

KIN'in yapılan çalışmalar sonucunda alınan verilere göre sürgün boyunda ve çoklu sürgün oluşumunda derişim arttıkça (0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L) sürgün boyu ve çoklu sürgün oluşumunun arttığı sadece çoklu sürgün oluşumunda 2,0 mg/L derişiminde bir önceki derişime göre azalma olduğu saptandı (sırasıyla 34,1; 39,1; 43,4 ve 49,1 / 1,2; 2,1; 3,0 ve 2,5). % kuru ağırlık ve yapraklanma sayıları incelendiğinde derişim artıkça % kuru ağırlık ve yapraklanma sayısının azaldığı sadece % kuru ağırlığın 2,0 mg/L derişiminde bir önceki derişime göre (1,0 mg/L) arttığı görülmüştür (sırasıyla %16,5; %14,1; %13,3 ve %14,6 / 14,9; 12,4; 10,3 ve 8,7) (Şekil 5 ve Tablo 5).



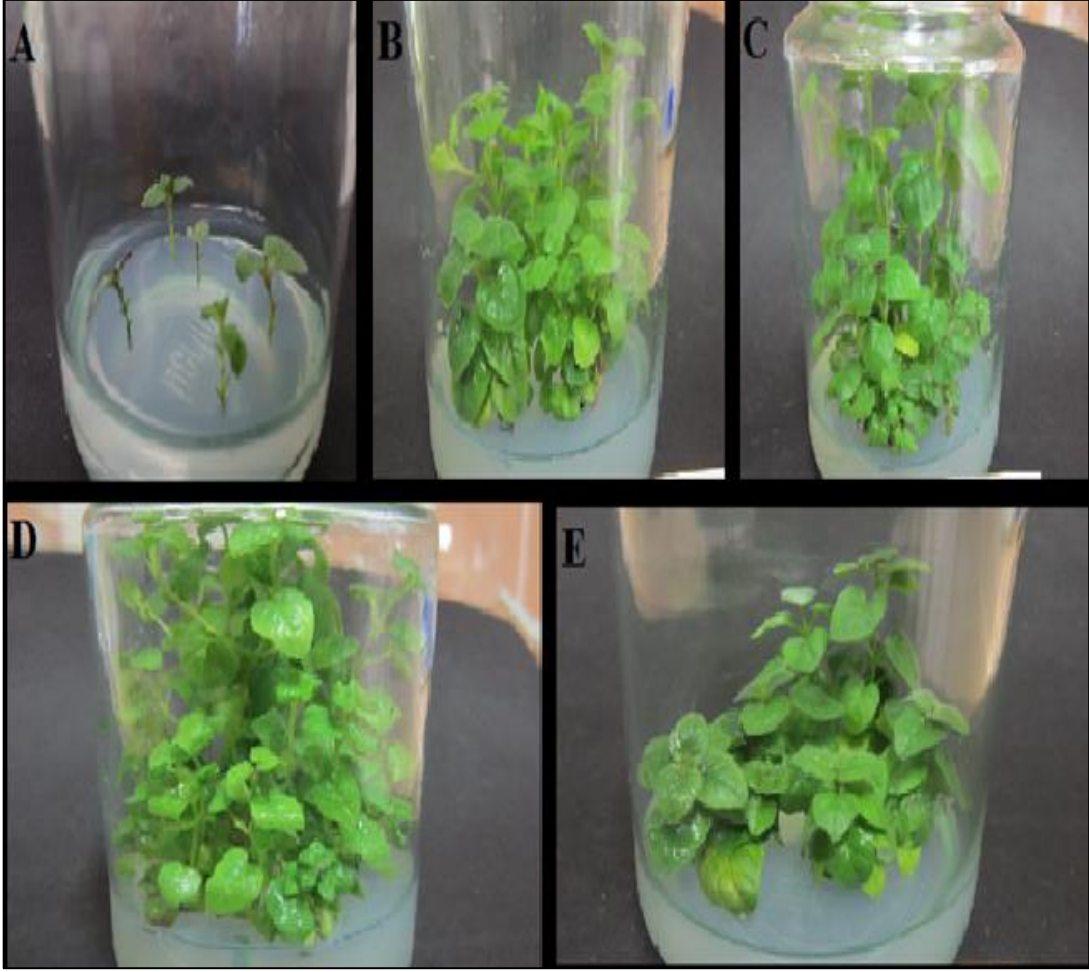
Şekil 5. MS besi ortamındaki *T. pseudopulegioides* sürgünlerinin (A) başlangıç, (B) 0,25 mg/L KIN, (C) 0,5 mg/L KIN, (D) 1,0 mg/L KIN ve (E) 2,0 mg/L KIN'in sekiz hafta sonundaki görünüşleri

TDZ'nin etkilerine bakıldığında; sürgün boyunda ve çoklu sürgün oluşumunda derişim arttıkça (0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L) sürgün boyu ve çoklu sürgün oluşumunun arttığı (sırasıyla 17,2; 20,6; 26,1 ve 30,2 / 1,4; 3,4; 3,9 ve 4,3), ancak % kuru ağırlığın azaldığı saptanmıştır (sırasıyla 18,6; 10,4; 8,7 ve 6,9). Yapraklanma sayıları incelendiğinde ise 0,25 mg/L ve 0,5 mg/L derişimlerinin artışa, 1,0 mg/L ve 2,0 mg/L derişimlerinin ise azalışa yol açtığı görülmüştür (sırasıyla 13,3 ve 14,9 / 12,0 ve 10,1) (Şekil 6, Tablo 5).



Şekil 6. MS besi ortamındaki *T. pseudopulegioides* sürgünlerinin (A) başlangıç, (B) 0,25 mg/L TDZ, (C) 0,5 mg/L TDZ, (D) 1,0 mg/L TDZ ve (E) 2,0 mg/L TDZ'nin sekiz hafta sonundaki görünüşleri

6-BA'da derişim arttıkça sürgün boyunda (0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L), yapraklanma sayısında ve çoklu sürgün oluşumunda artış, ancak 2,0 mg/L derişiminde değerlerde azalışa neden olduğu gözlemlenmiştir (sırasıyla 32,5; 35,3; 44,7 ve 40,5 / 9,4; 11,5; 13,0 ve 11,4 / 1,9; 2,3; 3,2 ve 2,4). % kuru ağırlık verileri değerlendirildiğinde ise derişim arttıkça % kuru ağırlığın azaldığı sadece 2,0 mg/L derişiminde bir önceki derişime göre (1,0 mg/L) arttığı verileri elde edildi (sırasıyla 23,8; 17,6; 12,1 ve 14,4) (Şekil 7, Tablo 5).



Şekil 7. MS besi ortamındaki *T. pseudopulegioides* sürgünlerinin (A) başlangıç, (B) 0,25 mg/L 6-BA, (C) 0,5 mg/L 6-BA, (D) 1,0 mg/L 6-BA ve (E) 2,0 mg/L 6-BA'nın sekiz hafta sonundaki görünüşleri

Çalışma neticesinde alınan sonuçlara göre ortamlar ve derişimler kıyaslandığında; 0,25 ve 0,5 mg/L TDZ içeren ortamlardan elde edilen ortalama sürgün uzamaları, 1,0 ve 2,0 mg/L KIN ve 0,25 mg/L 6-BA içeren ortamlardan elde edilen yaprak sayıları hariç diğer tüm derişimlerin kontrole göre olumlu etkiye sahip olduğu gözlemlendi. Ayrıca, KIN'in 0,25 ve 1,0 mg/L derişimlerinden, 1,0 mg/L 6-BA derişiminden ve TDZ'nin tüm derişimlerinden elde edilen % kuru ağırlık miktarları ise kontrolden daha düşük değerlerdedir.

En yüksek sürgün uzama miktarı ve en fazla yaprak sayısı sırasıyla 2,0 mg/L ve 0,25 mg/L KIN içeren ortamlarda tespit edildi. KIN'in artan derişiminin sürgün uzamasında artışa, yaprak sayısında azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Ayrıca, artan KIN derişiminin

kardeşlenme sayısını 1,0 mg/L derişimine kadar teşvik ettiği ve bu derişimden sonra inhibe ettiği görüldü. KIN derişimlerinden elde edilen % kuru ağırlıkları 13,3-16,5 aralığındadır.

En fazla çoklu sürgün oluşumu 2,0 mg/L TDZ içeren ortamdan elde edildi. KIN'de olduğu gibi TDZ'nin de artan derişiminin sürgün uzamasını teşvik ettiği belirlendi. Aynı şekilde artan derişimin kardeşlenme sayısında artışa fakat % kuru ağırlıkta azalmaya neden olduğu tespit edildi. TDZ derişimleriyle desteklenen ortamlardaki en yüksek ortalama yaprak sayısı 14,9 ile 0,5 mg/L derişimindedir.

6-BA'nın artan derişimlerinden elde edilen sürgün uzama miktarları sırasıyla 32,5; 35,3; 44,7 ve 40,5, yaprak sayıları ise 9,4; 11,5; 13,0 ve 11,4'tür. Çoklu sürgün oluşum miktarı 1,9-3,2 adet aralığında iken % kuru ağırlıkları 12,1-23,8 aralığındadır.

KIN, TDZ ve 6-BA'nın 0,25 mg/L derişimleri incelendiğinde, sürgün boyunda en fazla uzamanın KIN ortamında (34,4), yapraklanma sayısında en fazla yaprak sayısının KIN ortamında (14,9), kardeşlenme sayısında en fazla 6-BA ortamında (1,9) ve % kuru ağırlıkta ise en fazla 6-BA ortamında (23,8) olduğu, kontrol grubu ile kıyaslandığında ise 0,25 mg/L derişimin daha avantajlı olduğu anlaşılmıştır.

KIN, TDZ ve 6-BA'nın 0,5 mg/L derişim incelendiğinde, sürgün boyunda en fazla uzamanın KIN ortamında (39,1), yapraklanma sayısında en fazla yaprak sayısının TDZ ortamında (14,9), kardeşlenme sayısında en fazla TDZ ortamında (3,4) ve % kuru ağırlıkta ise en fazla 6-BA ortamında (17,6) olduğu, kontrol grubu ile kıyaslandığında ise 0,5 mg/L derişimin daha avantajlıdır.

KIN, TDZ ve 6-BA'nın 1,0 mg/L derişim incelendiğinde, sürgün boyunda en fazla uzamanın 6-BA ortamında (44,7), yapraklanma sayısında en fazla yaprak sayısının 6-BA ortamında (13,0), kardeşlenme sayısında en fazla TDZ ortamında (3,9) ve % kuru ağırlıkta ise en fazla KIN ortamında (13,3) olduğu, kontrol grubu ile kıyaslandığında ise % kuru ağırlığı benzerlik gösterdiği, diğer parametrelerin ise 0,5 mg/L derişimlerinin kontrol grubuna göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

KIN, TDZ ve 6-BA'nın 2,0 mg/L derişim incelendiğinde, sürgün boyunda en fazla uzamanın KIN ortamında (49,1), yapraklanma sayısında en fazla yaprak sayısının 6-BA ortamında (11,4), kardeşlenme sayısında en fazla TDZ ortamında (4,3) ve % kuru ağırlıkta ise en fazla KIN ortamında (14,6) olduğu, kontrol grubu ile kıyaslandığında ise 2,0 mg/L derişimlerinin kontrol grubuna göre daha iyi olduğu görülmüştür.

Bu veriler ışığında genel bir değerlendirme yapıldığında, sürgün boyunda KIN, yapraklanma sayısında 6-BA, çoklu sürgün oluşumunda (kardeşlenme sayısı) TDZ ve % kuru ağırlıkta ise KIN ve 6- BA ön plana çıkmıştır.

Tablo 5. KIN, TDZ ve 6-BA'nın 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 mg/L derişimlerdeki kültüre alınan sürgünlerin 8 hafta sonundaki kardeşlenme sayıları, ortalama sürgün boyu, yapraklanma sayıları ve % kuru ağırlıkları

BBD ¹	Derişim (mg/L)	Sürgün boyu(mm)	Yaprak sayısı	Kardeşlenme sayısı	Kuru ağırlık %
KIN	0,25	34,4±1,8f	14,9±1,8a	1,2±0,4h	16,5±0,8d
	0,5	39,1±1,3e	12,4±1,6c	2,1±0,8fg	14,1±1,0ef
	1,0	43,4±1,5c	10,3±1,3e	3,0±0,7d	13,3±0,6g
	2,0	49,1±1,5a	8,7±1,0g	2,5±0,5e	14,6±0,7e
TDZ	0,25	17,2±1,3k	13,3±1,2b	1,4±0,5h	18,6±0,5b
	0,5	20,6±2,6j	14,9±0,9a	3,4±0,6c	10,4±0,5i
	1,0	26,1±1,3i	12,0±0,8cd	3,9±0,6b	8,7±0,4j
	2,0	30,2±2,2h	10,1±0,8e	4,3±0,7a	6,9±0,5k
6-BA	0,25	32,5±1,8g	9,4±0,9f	1,9±0,1g	23,8±0,6a
	0,5	35,3±1,2f	11,5±0,9d	2,3±0,4ef	17,6±0,7c
	1,0	44,7±1,6b	13,0±0,8b	3,2±0,7cd	12,1±0,3h
	2,0	40,5±1,6d	11,4±0,8d	2,4±0,5e	14,4±0,5ef
KONTROL		19,7±2,0j	10,7±0,8e	1,1±0,3h	13,8±0,7fg

¹BBD: Bitki büyüme düzenleyicisi

3.4. Toplam Fenol ve Toplam Flavonoid Miktarlarının Belirlenmesi

Tüm örneklerin toplam fenolik miktarları 24,01-1083,74 mg/100g, toplam flavonoid miktarları ise 22,48-92,08 mg/100g değerleri arasındadır (Tablo 6). Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ortamlardan elde edilen fidelerden toplam fenolik ve flavonoid miktarları sırasıyla 57,12 ve 4,78 mg/100g'dır. Bitki büyüme düzenleyicileriyle desteklenen ortamlarda en yüksek fenolik ve flavonoid madde miktarları sırasıyla 1083,74 ve 92,08 mg/100g değerleriyle sırasıyla 1,0 mg/L KIN ve 0,5 mg/L 6-BA içeren

ortamdadır. 0,5 mg/L KIN ile desteklenen ortamda flavonoid miktarı belirlenememesine rağmen, KIN içeren ortamların, ihtiva ettikleri fenolik ve flavonoid maddeler bakımından diğer ortamlardan daha zengin olduğu belirlendi. Her bir bitki büyüme düzenleyicisinin derişimlerinde yetişen fidelerin ihtiva ettikleri fenolik madde miktarları kendi aralarında değerlendirildiğinde, KIN, TDZ ve 6-BA'nın 1,0 mg/L derişimlerinin diğerlerine göre daha verimli olduğu belirlendi. Buna paralel olarak, aynı ortamlardaki flavonoid madde miktarlarının da KIN ve TDZ'nin 1,0 mg/L, 6-BA'nın 0,5 mg/L daha yüksek olduğu görüldü.

Tablo 6. *T. pseudopulegioides* bitkisinin *in vitro* koşullarda üretilen toplam fenol ve flavonoid miktarları

BBD ¹	Derişim (mg/L)	Toplam Fenol Miktarı (mg/100g)*	Toplam Flavonoid Miktarı (mg/100g)**
KIN	0,25	407,40	32,89
	0,5	24,01	-
	1,0	1083,74	37,33
	2,0	940,38	31,44
TDZ	0,25	315,23	22,48
	0,5	321,36	70,92
	1,0	495,36	70,09
	2,0	425,35	61,25
6-BA	0,25	317,23	61,54
	0,5	556,20	92,08
	1,0	663,23	46,36
	2,0	458,31	60,92
Doğal Ortam		632,94	60,77
Kontrol ²		57,12	4,78

¹BBD: Bitki büyüme düzenleyicisi

²Kontrol: Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamı

*: Gallik asit eşdeğer

** : Kuersetin eşdeğer

3.4.2. HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analizi

HPLC analizleri sonucunda bütün ortamlarda gelişen fidelerin özütlerinde Protokateşik asit, Kafeik asit, Epikateşin, Rutin, Ferulik asit ve *o*-kumarik asit fenolikleri bulundu (Şekil 8). Kontrol grubu ve 0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L KIN içeren ortamlarda gelişen fidelerden elde edilen özütlerde *o*-kumarik asit bileşiğinin sentezlenmediği, ayrıca 0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L TDZ ve 6-BA içeren ortamlarda gelişen fidelerden elde edilen özütlerde Epikateşin bileşiğinin sentezlenmediği tespit edildi. 0,25 mg/L KIN derişiminde protokateşin, kafeik asit, rutin, epikateşin ve ferulik asit, 0,5 mg/L KIN derişiminde hiçbir bileşiğin sentezlenmediği ve 1,0 mg/L ve 2,0 mg/L KIN derişimlerinde de protokateşin, kafeik asit, rutin, epikateşin ve ferulik asit bileşikleri bulunmuştur. En fazla protokateşin bileşiği sentezlenmiş ve en fazla 0,5 mg/L 6-BA derişiminde tespit edilmiştir (41,53 mg/100gr) (Tablo 7).

0,25 mg/L TDZ derişiminde protokateşin, kafeik asit ve *o*-kumarik asit, 0,5 mg/L TDZ derişiminde protokateşin, kafeik asit, rutin ve ferulik asit, 1,0 mg/L TDZ derişiminde protokateşin, kafeik asit, rutin, ferrulik asit ve *o*-kumarik asit ve 2,0 mg/L TDZ derişiminde ise protokateşin, kafeik asit, rutin, ferulik asit bileşikleri tespit edilmiştir. En fazla protokateşin bileşiği sentezlenmiş ve en fazla 1,0 mg/L TDZ derişiminde görülmüştür (32,64 mg/100g) (Tablo 7).

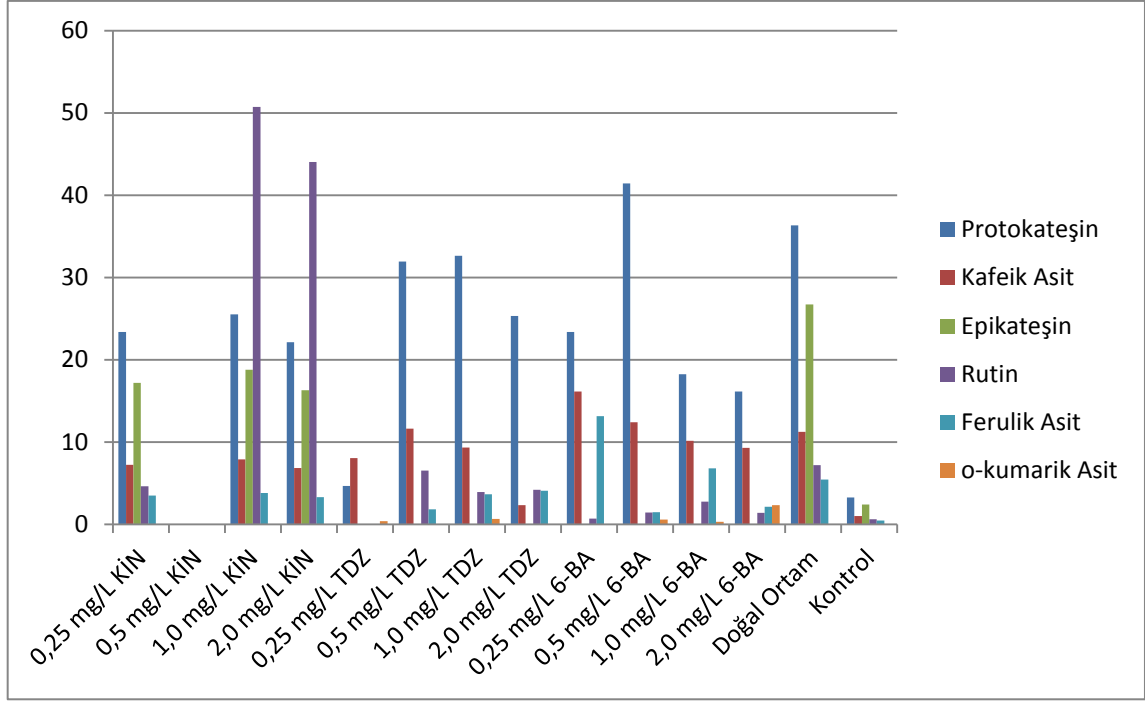
0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L ve 2,0 mg/L 6-BA derişimlerinde protokateşin, kafeik asit, rutin ve ferulik asit sentezlendiği görülmüştür. Bu bileşikler arasından en fazla protokateşin sentezlendiği ve en fazla 0,5 mg/L 6-BA derişiminde olduğu saptanmıştır (41,53 mg/100g) (Tablo 7).

Tablo 7. *T. pseudopulegioides* bitkisinin *in vitro* koşullarda üretilen fenolik bileşikler (mg/100g kuru madde miktarı)

BGD ¹	Derişim (mg/L)	Protokateşik asit	Kafeik asit	Epikateşin	Rutin	Ferulik asit	<i>o</i> -kumarik asit
KIN	0,25	23,39	7,23	17,22	4,65	3,50	-
	0,5	-	-	-	-	-	-
	1,0	25,51	7,89	18,78	50,74	3,82	-
	2,0	22,13	6,84	16,30	44,03	3,31	-
TDZ	0,25	4,68	8,07	-	-	-	0,41
	0,5	31,96	11,65	-	6,54	1,83	-
	1,0	32,64	9,36	-	3,94	3,68	0,66
	2,0	25,35	2,33	-	4,23	4,08	-
6-BA	0,25	23,40	16,15	-	0,70	13,16	-
	0,5	41,53	12,42	-	1,45	1,48	0,61
	1,0	18,26	10,16	-	2,79	6,83	0,33
	2,0	16,17	9,32	-	1,42	2,16	2,36
Doğal Ortam		36,33	11,24	26,75	7,22	5,44	-
Kontrol ²		3,29	1,01	2,42	0,65	0,493	-

¹BBD: Bitki büyüme düzenleyicisi

²Kontrol: Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamı



Şekil 8. *T. pseudopulegioides* bitkisinde HPLC ile tespit edilen fenolik bileşikler

3.5. Antioksidan Aktivite Testleri

3.5.1. DPPH Yöntemi

Yapılan çalışmalar bölümünde ayrıntılarıyla anlatılan yöntem izlenerek (Bölüm 2.2.7.1) kararlı DPPH radikalının *T. pseudopulegioides* bitkisinden elde edilen metanol özütleri hazırlanarak incelendi. Tablo 8 ve Şekil 9'da görüleceği gibi yapılan çalışma sonucunda en yüksek radikal süpürücü etkiye sahip olan özüt 2,0 mg/L KIN ortamda gelişen fidelerden elde edildiği (IC_{50} : 4,77 mg/mL), en düşük aktiviteye ise 0,5 mg/L KIN ortamda gelişen fidelerden elde edilen özütlerde tespit edildi (IC_{50} : 45,44 mg/mL).

3.5.2. β -Karoten Renk Açılım Testi-Spektrofotometrik Yöntem

Antioksidan aktivitesinde uygulanan diğer bir test yöntemi de β -karoten renk açılımı-spektrofotometrik yöntemidir. Bu yöntemde β -karoten'in karakteristik sarı renginin belli bir periyotta korunumu esas alındı. 24 saatlik zaman süresinde ölçülen absorbans değerleri

BHT nin absorbansına karşı değerlendirildi ve % BAA değerleri rapor edildi (Tablo 8 ve Şekil 9).

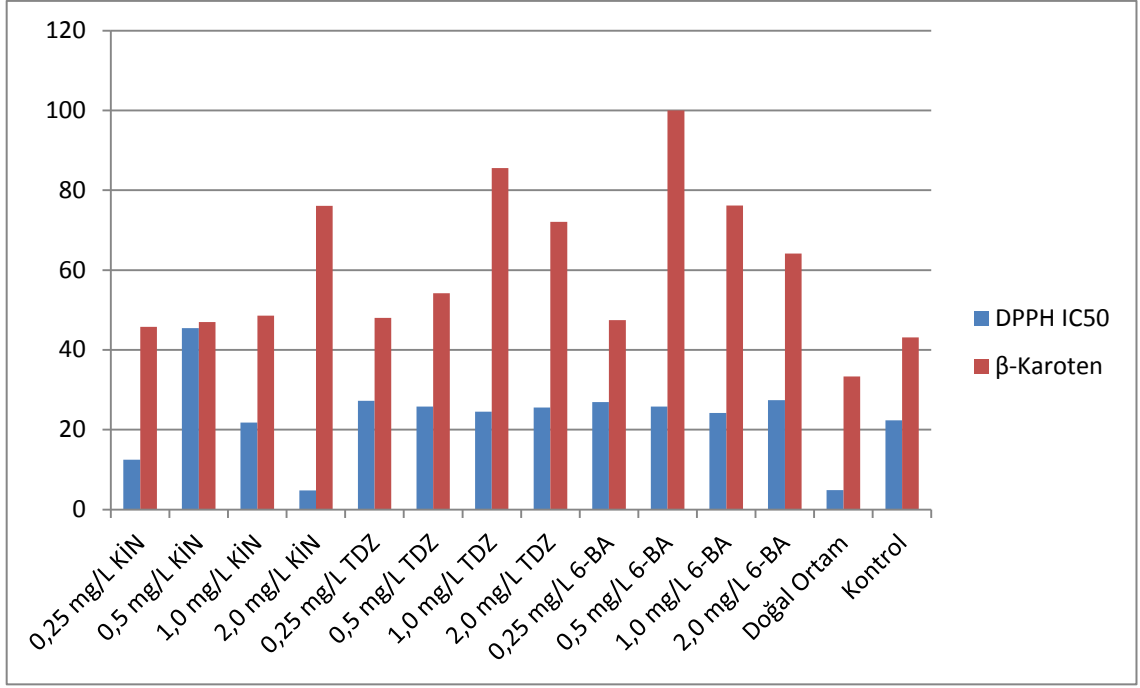
Tablo 8. *T. pseudopulegioides* bitkisinden elde edilen antioksidan aktivite sonuçları

BBD ¹	Derişim (mg/L)	DPPH IC ₅₀ mg/mL	β Karoten R %
KIN	0,25	12,50	45,74
	0,5	45,44	46,99
	1,0	21,76	48,58
	2,0	4,77	76,06
TDZ	0,25	27,27	48,03
	0,5	25,77	54,18
	1,0	24,50	85,56
	2,0	25,60	72,05
6-BA	0,25	26,90	47,47
	0,5	25,83	100,00
	1,0	24,20	76,18
	2,0	27,37	64,12
Doğal Ortam		4,89	33,33
Kontrol ²		22,38	43,09

¹BBD: Bitki büyüme düzenleyicisi

²Kontrol: Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamı

Yapılan çalışma sonucunda örneklerin β-karoten testinden elde edilen lipid oksidasyonunu engelleme derecelerinde en yüksek aktiviteyi 0,5 mg/L 6-BA ortamında gelişen fidelerin özütleri (%BAA: %100), en düşük aktiviteyi kontrol (hiçbir BBD içermeyen MS ortamı) ve 0,25 mg/L KIN ortamında gelişen fidelerin özütleri (sırasıyla %BAA: %43,09 ve %BAA: %45,74) gösterdi (Tablo 8).



Şekil 9. *T. pseudopulegioides* bitkisinden elde edilen antioksidan aktivite sonuçları (IC_{50} mg/mL ve %BAA)

4. TARTIŞMA

Bitki doku ve hücre kültürleri ile doğal ürünlerin (sekonder metabolitlerin) üretimi bitki biyoteknolojisinin ilgi çekici konularından birisidir (Sökmen ve Gürel, 2001). İnsanoğlu bu metabolitleri ilaç, besin katkı maddeleri, parfüm ve kozmetik, zirai mücadele gibi amaçlarla kullanmaktadır. Bu bileşiklerin birçoğu, kimyasal olarak sentezi zor ya da üretilmeleri veya miktarlarının artırılması genetik mühendislik müdahaleleri ile dahi büyük çabalar gerektirir (Zhong ve ark., 2001). Ekonomik değer taşıyan doğal ürünlerin doğal ortamlarda yetişen bitkilerden doğrudan elde edilmesi, bu bitkiler üzerinde tahribata neden olmaktadır. Bu tahribatın önüne geçilmesi hususunda bitki biyoteknolojisinden yararlanma olanağı güncel ve etkili bir yaklaşımdır (Sökmen ve Gürel, 2001). Ayrıca yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak, kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır (Babaoğlu ve ark.,2001).

Bununla beraber, doku ve hücre kültürü tekniklerini kullanarak sekonder metabolit üretimi gerçekleştirme süreci de yoğun emek gerektirir. Kaynak bitkinin seçimi, bitkinin uygun kısımlarından doku ve/veya hücre kültürlerinin başlatılması, kültürlerin sürdürülebilmesi, hedef ürünün kültürler tarafından üretilip üretilmediğinin tespit edilmesi, eğer üretilabiliyorsa ürünün miktarının artırılması, yani kültürü optimize etme olanağının araştırılması evrelerinin her biri bu süreçte dönüm noktalarıdır.

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

Bu tez kapsamında, *T. pseudopulegioides* bitkisinin *in vitro*' da gelişim olanakları araştırılmıştır. Doğal ortamlarından *T. pseudopulegioides* tohumlarından başlatılan kültürlerde; ilk olarak tohumların çimlenmesi için en uygun besi ortamı belirlendi ve daha sonra oluşan fidelerden alınan eksplantlardan doğrudan organogenez ile fideler oluşturulmuştur. Doğrudan organogenez çalışmalarında, TDZ, 6-BA ve KIN'in, 0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L derişimlerinin sürgün boyu, kardeşlenme sayısı, yapraklanma sayısı ve yüzde kuru ağırlık üzerine etkileri belirlenmiştir. Aynı zamanda ekonomik değeri yüksek fenolik bileşikler araştırılmış analizler sonucu her bir ortamdaki toplam fenol, flavonoid

miktarları ve HPLC ile bazı spesifik fenolik bileşikler ve antioksidan aktivite testleri tespit edilmiştir.

Mikroçoğaltım çalışmalarının başlangıcı ve belki de en önemli basamağı olan, eksplant sterilizasyonu, bu çalışmada iki farklı yol izlenerek gerçekleştirilmiştir. Birinci yolda %20'lik çamaşır suyu ile tohumların yüzey sterilizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu yönteme tabi tutulan tohumların canlılık yüzdeleri % 59,7 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, sterilize edilen tohumların besi ortamlarına ekiminden sonra, ortamlardaki kontaminasyon sıklıkları da belirlenmiştir. Bu yöntemle sterilize edilen tohumların ekildiği ortamlardaki kontaminasyon sıklığının %90 olduğu gözlenmiştir. Denenen bu sterilizasyon sonrası gözlenen kontaminasyon sıklığının fazla olması, tohumların sterilizasyonu için yeni bir yöntemin gerekliliğini doğurmuştur. Kullanılan çamaşır suyu derişiminin ya da uygulama süresinin artırılmasının, bu olumsuzluğu ortadan kaldırmada yeterli olabileceği akla gelse de, canlılık yüzdesinde neden olacağı azalma göz önünde bulundurulduğunda, yeni bir kimyasalın denemesi ihtiyacı doğmuştur. Bu bağlamda, tohumlar H₂O₂ ile sterilize edilmiş ve çamaşır suyu ile yapılan sterilizasyondan daha olumlu sonuçlar gözlenmiştir. Bu yöntem sonucunda elde edilen canlılık yüzdelerinin (%62,8) daha yüksek, kontaminasyon sıklığının da (%11) çok daha düşük seviyelerde olduğu görülmüştür. Hiçbir sterilizasyon yöntemine tabi tutulmayan ve kontrol grubu olarak değerlendirilen tohumların canlılık yüzdeleri %64,5 olarak tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlara benzer olarak, Srivastava ve arkadaşları (2010), tıbbi bir bitki olan *Aconitum heterophyllum* tohumlarının yüzey sterilizasyonu için NaOCl, HgCl₂ ve H₂O₂ kimyasallarını kullanmışlar ve H₂O₂ ile yapılan yüzey sterilizasyonun diğerlerine göre daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir. NaOCl ile yapılan sterilizasyon sonucunda düşük çimlenme yüzdesi ve yüksek kontaminasyon sıklığı elde etmişlerdir. Bir başka çalışmada da, benzer sonuçlar elde edilmiş, sterilizasyonda kullanılan H₂O₂ olumlu sonuçlar gösterirken, çamaşır suyu tohumların canlılığını azaltmış ve kontaminasyon oluşumunu engelleyememiştir (Tanrıver, 2013).

Doku kültürü işlemlerine başlarken verilecek en önemli kararlardan birisi de kullanılacak besi ortamının belirlenmesidir. Çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilen bir çok besi ortamı mevcut olmasına rağmen en sık kullanılanları MS, LS, SH, G-B5 ve WM ortamlarıdır. MS yüksek tuz içeriğine, WM düşük tuz içeriğine, GB-5 nitrat azotu yüksek bir ortamdır. LS ortamı ise MS ortamının organik madde bakımından farklı versiyonudur (Babaoğlu vd., 2002).

Bu çalışmada, yukarıda bahsi geçen ve sıklıkla kullanılan 5 farklı besi ortamının, *T. pseudopulegioides* tohumlarının çimlenme yüzdesi ve süresi üzerine etkileri belirlenmiştir. Çalışmanın bu aşamasından elde edilen sonuçlar doğrultusunda, çalışılan türün tohumlarının çimlenmesi için uygun ortamın belirlenmesinin yanında, sonraki çalışmalarda (doğrudan organogenez çalışmaları) kullanılabilir en uygun temel besi ortamı belirlenmiştir. Buna göre denenen ortamlardan MS'in hem en kısa çimlenme süresine (5 gün) hem de en yüksek çimlenme yüzdesine (%92,57) sahip olduğu saptanmış ve tohumların çimlendirilmesi için ve daha sonraki çalışmalarda kullanılabilir en uygun ortam olduğuna karar verilmiştir. SH ortamında çimlenme yüzdesinin en düşük değerinde (%60,91), LS ortamında ise tohumların çimlenmesi için gereken sürenin (11 gün) daha yüksek olduğu gözlenmiştir. LS ve G-B5 ortamlarındaki çimlenme yüzdelerinin yakın değerinde olduğu fakat çimlenme sürelerinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde *T. pseudopulegioides* türünün *in vitro* çimlendirilmesine dair herhangi bir rapora rastlanmamıştır. Ancak *Thymus* cinsine ait farklı türler ile yapılan çalışmalar mevcuttur (Özüdoğru, 2011; Shabnum ve Wagay, 2011; Nordine vd., 2013). Bu çalışmalarda araştırmacılar, denemelerinde MS ortamını kullandıklarını ve yüksek çimlenme oranlarını elde ettiklerini bildirmişlerdir. Azot kaynağı olarak besi ortamlarında kullanılan NH_4^+ ve NO_3^- iyonlarının önemi yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Nongrum vd., 2007; Dohling vd., 2008). MS ortamı azot kaynağı olarak amonyum nitrat içerirken, WM ve G-B5 ortamları amonyum sülfat formunu içerirler. Ayrıca WM ve G-B5 ortamlarındaki NO_3^- , CaNO_3 formunda bulunur. Bu CaNO_3 formundaki bileşiklerin ihtiva ettikleri azot miktarlarının, diğer mineral elementlere göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (Alan, 1989). MS ortamındaki amonyum nitratın varlığı, bu bileşiğin gelişimin en erken safhalarından itibaren asimile edilebilmesi ve büyüme ve farklılaşmayı önemli derecede teşvik etmesinden dolayı, elde edilen yüksek çimlenme oranlarının sebebi olarak gösterilebilir (Raghavan ve Torrey, 1964; Kramer ve Kozlowski, 1979). Literatürden elde edilen bu bilgilerin yanı sıra, MS ortamının diğer ortamlara göre makro ve mikro elementler bakımından daha zengin olması, çimlenmeyi artıran unsurlardan olabileceği de akla gelmektedir.

Mikroçoğaltım, homojen bitkilerin yüksek miktarlarda ve kısa sürelerde üretimine olanak sağlamaktadır. Ortama yeterli oranda bitki büyüme düzenleyicilerinin ilave edilmesi büyüme ve gelişmeyi teşvik etmekte ve böylece hem üretim süresinin daha da kısalmasına hem de üretilen miktarın artırılması sağlamaktadır. Çalışma kapsamında, *in*

in vitro'da çimlendirilen örneklerden alınan nodal eksplantlardan, TDZ, KIN ve 6-BA'nın 0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L derişimleriyle desteklenen MS ortamlarında, doğrudan organogenez yoluyla fideler oluşturulmuştur. 2 ay sonunda her bir ortamdaki fidelerin; sürgün boyu, yapraklanma sayısı, kardeşlenme sayısı ve yüzde kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

Elde edilen sürgün boyları incelendiğinde; KIN ve TDZ'nin artan derişimlerinin fidelerin boylarında uzamaya neden olduğu gözlenmiştir. 6-BA'nın derişimleriyle desteklenen ortamlarda ise boy uzunluklarında, 1,0 mg/L derişime kadar artış ve bu derişimden sonra azalış belirlenmiştir. Sürgün uzaması üzerinde en olumlu etkiye sahip olan bitki büyüme düzenleyicisinin KIN ve derişiminin 2,0 mg/L olduğu tespit edilmiştir. TDZ'nin düşük derişimlerinin (0,25 ve 0,5 mg/L) sürgün uzamasında inhibe edici etkisinin olduğu gözlenmiştir. Yaprak oluşumunda ise 0,25 mg/L KIN ve 0,5 mg/L TDZ içeren ortamların daha etkili olduğu belirlenmiştir. KIN ve TDZ'nin 2,0 mg/L ve 6-BA'nın 0,25 mg/L derişimlerindeki yaprak sayıları kontrolden daha düşük değerlerde ölçülmüştür. Kardeşlenme sayılarına bakıldığında TDZ'nin diğer bitki büyüme düzenleyicilerinden daha olumlu sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

Coelho ve arkadaşları (2012), MS ortamının kullanılmasının sürgün oluşumunu, uzamasını ve çoklu sürgün oluşumunu teşvik ettiğini rapor etmişlerdir. Kumar ve arkadaşları (2001), besi ortamlarına sitokin ilavesinin sürgün oluşumunu teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz verilere benzer olarak, daha önce yapılan çalışmalarda, TDZ'nin artan derişimin kardeşlenme sayısını artırdığını bildirilmiştir (Preece ve Imel, 1991; Heutteman ve Preece, 1993). Bir başka çalışmada ise 6-BA'nın sürgün uzamasını TDZ'ye göre daha fazla teşvik ettiği tespit edilmiştir (Ledbetter ve Preece, 2004). Bizim çalışmamızın aksine, artan TDZ derişiminin sürgün uzamasını inhibe ettiğine dair bir rapor mevcuttur (Heutteman ve Preece, 1993).

T. vulgaris ve *T. hyemalis* ile yapılan çalışmalarda, sürgün uzamasında en etkili sitokin KIN olduğu belirlenmiştir (Ozudogru vd., 2011; Nordine vd., 2013). Ayrıca, Tatari Vernosefadrani ve arkadaşları (2009), besi ortamlarının 2,0 mg/L KIN ile desteklenmesinin sürgün uzamasını diğer derişimlerden daha fazla teşvik ettiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca 1,0 mg/L'ye kadar artan KIN derişiminin kardeşlenme sayısında artışa neden olduğunu, daha yüksek derişimlerin kardeşlenme sayısını azalttığını gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da KIN'in sürgün uzamasında daha etkili olduğu

görülmüş ve en yüksek sürgün boyu 2,0 mg/L derişiminde ölçülmüştür. Artan KIN derişimlerinin kardeşlenme sayılarına etkilerinde de benzerlik tespit edilmiştir.

Saez ve arkadaşları (1994), 6-BA'nın çoklu sürgün oluşumunda KIN'e göre daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, 1,0 mg/L derişimine kadar artan 6-BA derişimin kardeşlenme sayısında artışa ve bu derişimden sonra azalmaya neden olduğunu belirlemişlerdir. Buna benzer olarak, bu tez çalışmasında, artan 6- BA derişimlerindeki sürgün boyunun, yaprak sayısının ve kardeşlenme sayısının 1,0 mg/L derişimine kadar arttığı ve bu derişimden sonra azaldığı gözlenmiştir.

Doğrudan organogenez çalışmaları sonucunda incelenen parametrelerden bir tanesi de, elde edilen fidelerin % kuru ağırlıklarının belirlenmesi olmuştur. TDZ'nin artan derişimiyle, % kuru ağırlığın azladığı, 6-BA ve KIN'in artan derişimlerinde ise 1,0 mg/L derişimlerine kadar azalmanın olduğu ve bu derişimden sonra az da olsa artışın olduğu gözlenmiştir. Bu Ledbetter ve Preece (2004), TDZ'nin artan derişiminin bitkilerin % kuru ağırlıklarında azalmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları, bu tez çalışmasında denenen TDZ derişimlerinden elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

% kuru ağırlık miktarlarının derişim artıka azalmasının nedeni mikroçoğaltımda karşılaşılan sorunlardan olan vitrifikasyon veya hiperhidrasyon olduğu düşünülmektedir. Çünkü elde edilen sürgünlerin sayısının artırılması için alt kültürler yapılmakta ya da uzun inkübasyon sürelerine maruz bırakılmaktadır. Vitrifikasyon (camlaşma), bu aşamada karşılaşılan en önemli fizyolojik sorunlardan birisidir. Besin ortamındaki oksin, sitokin, minarel madde, şeker ve agar miktarı vitrifikasyonun nedenlerini oluşturmaktadır (Hempel, 1985). Pasqualetto (1992) ise vitrifikasyonun bazı morfolojik (hücrenin aşırı su alması, hücre duvarının yıkılması, klorofil eksikliği, yaprak yapısı ve besin kompozisyonu) ve ekolojik (ağarın niteliği ve konsantrasyonu, 6-BA konsantrasyonu, ortamdaki K ve Mg bileşikleri ve kültür kabı içerisindeki atmosferin durumu) etmenlere bağılı olduğunu bildirmiştir. Coelho ve arkadaşları (2012), yaptıkları çalışmada hiçbir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamında *T. lotocephalus* fidelerinin sağlıklı bir biçimde geliştiklerini ve 6-BA eklenmesiyle vitrifikasyonla karşılaştıklarını bildirmişlerdir.

Doku kültürü yöntemleri, özellikle tıbbi ve aromatik bitkilerin, ihtiva ettikleri sekonder metabolitlerin üretimini artırılmasını ve optimizasyonunu mümkün kılmaktadır. Özellikle, bitkilerden elde edilen özüt ya da uçucu yağlardaki fenolik maddelerin, antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olmaları, doku kültürü yöntemlerini daha da önemli kılmaktadır. Literatürde daha çok kallus ya da

hücre kültürleri kullanılarak sekonder metabolit üretimi gerçekleştirilse de, sürgün kültürleri ile sekonder metabolit üretiminden daha fazla verim elde edildiği bildirilmiştir. Hatta bazen üretilen metabolit miktarı ana bitkide KIN'den daha da yüksek olabilmektedir (Hirata vd., 1987).

Bu tezde, dolaylı organogenez çalışmalarında denenen 3 bitki büyüme düzenleyicisinin farklı derişimlerinden elde edilen fidelerin, ihtiva ettikleri toplam fenolik ve flavonoid miktarlarının ve bazı spesifik fenolik bileşiklerinin HPLC ile tayini gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak hiçbir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi ortamı kullanılmış ve ayrıca elde edilen değerler, doğal ortamlarından elde edilen örneklerle kıyaslanmıştır.

Elde edilen verilere göre, 1,0 mg/L KIN ile desteklenen ortamlardan elde edilen örneklerin toplam fenolik madde miktarının (1083,74 mg/100g) en fazla olduğu belirlenmiştir. Toplam flavonoid miktarı (92,08 mg/100g) ise 0,5 mg/L 6-BA içeren ortamda tespit edilmiştir. 0,5 mg/L KIN içeren ortamdaki toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları hariç, diğer tüm örneklerden elde edilen değerler kontrolden yüksektir. Doğal olarak yetişen örneklerin toplam fenolik madde miktarı 1,0 ve 2,0 mg/L KIN ile 1,0 mg/L 6-BA'lı ortamlarda KIN'den düşük, toplam flavonoid miktarı ise 0,5; 1,0 ve 2,0 TDZ ile 0,25 ve 0,5 6-BA içeren ortamlardaki örneklerden daha düşüktür.

Bu çalışmadan elde edilen toplam fenolik ve flavonoid miktarlarının değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Artan bitki büyüme düzenleyicisi derişimleriyle ya da artan ya da azalan büyüme parametreleriyle (sürgün boyu, yapraklanma sayısı, kardeşlenme sayısı, % kuru ağırlık) toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir. Bu farklılığın, farklı tohumlardan başlatılan kültürlerden elde edilen ve muhtemelen farklı genetik özelliklere sahip fidelerden alınan eksplantların kullanılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, kültür ortamlarındaki hücrelerin içerdikleri büyüme düzenleyicilerinin içsel düzeyleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Hücre ve hücre gruplarının boyutu; hücreler arası ilişkiler, büyüme, morfolojik farklılaşma ve dolayısı ile sekonder metabolit mekanizması üzerinde doğrudan etkili olmaktadır (Sakuta ve Komamine, 1987). Sitokin grubu bitki büyüme düzenleyicileri, bitki büyüme ve gelişmesinde önemli rolleri olan bileşiklerdir. Sitokinlerin, sekonder metabolitler üzerindeki etkisi metabolit çeşidine ve bitki türüne göre değişmektedir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin *in vitro* sekonder metabolit

üretimindeki etkilerinin oldukça karmaşık ve çelişkili olduğu görülecektir (Sökmen ve Gürel, 2001).

HPLC’de, 14 farklı standart bileşiğin kullanıldığı ve bazı spesifik fenolik maddelerin tespit edildiği çalışmalarda, farklı ortamlardan elde edilen *T. pseudopulegioides* fidelerinin genel olarak protokateşik asit, kafeik asit, epikateşin, rutin, ferulik asit *o*- kumarik asit kimyasallarını ihtiva ettikleri belirlenmiştir. KIN ile desteklenen ortamlarda, kontrol grubunda ve doğal ortamlardan alınan örneklerde *o*- kumarik asit tespit edilememiştir. Epikateşinin ise TDZ ve 6- BA ile desteklenen ortamlarda sentezlenmediği gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre; TDZ ve 6-BA’nın kullanılmasının *o*- kumarik asit sentezlenmesine, epikateşin sentezinin de inhibisyonuna neden olduğu söylenebilir. 0,5 mg/L KIN içeren ortamlardan gelişen fidelerin, analiz edilen 14 farklı standart bileşikten hiçbirini içermediği görülmüştür. Farklı içeriğe sahip ortamlardan ve doğal ortamlardan elde edilen örneklerde tespit edilen fenolik bileşik miktarlarının kontrol grubundan daha yüksek değerlerde oldukları saptanmıştır.

Literatürde, *T. pseudopulegioides*’in fenolik bileşenlerinin HPLC ile tayinine dair herhangi bir rapora rastlanmamıştır. Ancak, *Thymus* cinsine ait diğer türlerle yapılmış ve literatüre kazandırılmış birçok makale mevcuttur (Adzet vd., 1988; KurKIN vd., 1988; Kulevanova vd., 1997; Kulevanova vd., 1998; Mouhajir vd., 2001; Zgorke vd., 2001; Ziakova vd., 2003; Takeucki vd., 2004). Verilen bu raporlarda tespit edilen başlıca fenolik bileşikler arbutin (*T. vulgaris*), kafeik asit (*T. aestivus*, *T. albanus*, *T. vulgaris*), kumarik asit (*T. vulgaris*, *T. carnosus*), protokateşik asit (*T. vulgaris*, *T. serpyllum*), ferulik asit (*T. vulgaris*), vanilik asit (*T. vulgaris*, *T. carnosus*), benzoik asit (*T. vulgaris*, *T. carnosus*), siringik asit (*T. vulgaris*, *T. carnosus*) olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında, daha önceki çalışmalarda *Thymus* türlerinde belirlenen fenolik bileşiklerden vanilik asit, siringik ve benzoik asit, kullanılan standart bileşikler arasında var olmalarına rağmen tespit edilememiştir. Yine bu çalışmalardan farklı olarak, çalışmamızda, rutin (0,5 mg/L KIN hariç geri kalan tüm örneklerde) ve epikateşin (sadece doğal örneklerde, kontrolde ve 0,5 mg/L derişimi hariç KIN ile desteklenen ortamlarda) fenolik bileşiklerine rastlanmıştır. Robby ve arkadaşları (2013), bu tez çalışmasındaki bulgularda farklı olarak, *T. vulgaris*’te kafeik asit, kunik asit (Quinic acid), kumarik asit, karnosik asit, sinamik asit, rosmarinik asit, metil rosmarinik, apigenin ve ferulik asit fenolik bileşiklerini, benzer olarak ta ferulik asit, kafeik asit ve kumarik asit bileşiklerini tespit etmişlerdir. Yine benzer olarak, *T. vulgaris* özütlerinde gallik asit ve klorojenik asit belirlenememiştir.

HPLC ile tayin edilen fenolik bileşiklerin toplam miktarları ile toplam fenolik madde miktarları karşılaştırıldığında, HPLC yönteminden elde edilen verimin çok daha düşük olduğu görülmektedir. Öyle ki, bu sonuç, elde edilen özütlerde birçok tanımlanamayan fenolik madde olduğunu akla getirmektedir. Bunun sebebi olarak, HPLC ile, var olan birçok fenolik bileşiğin, kullanılan kısıtlı sayıdaki standart bileşikten dolayı tespit edilememesi olduğu söylenebilir. 0,5 mg/L TDZ derişimden elde edilen fidelere ait metanol özütlerinden HPLC analizleri sonucunda standart bileşiklerden hiçbirine rastlanmaması fakat toplam fenolik madde tayininde 24,01 mg/100g fenolik madde miktarının belirlenmesi bunun kanıtı olarak gösterilebilir.

Antioksidanlar serbest radikallerin etkilerini yok edici sistemlerdir. Günümüzde, sentetik antioksidanların güvenilirlikleri üzerinde artan endişelerden dolayı çeşitli bitkisel materyallerden doğal antioksidanların elde edilmesi üzerinde yoğun bir ilgi oluşmuştur. Bu durum, doğal antioksidan kaynağı olarak büyük bir potansiyele sahip olan tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanımının giderek artmasına neden olmuştur (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013). Fenolik bileşiklerde, bitkilerden elde edilen doğal antioksidanların bir grubunu oluşturmaktadır (Shahidi ve Wanasundara, 1992). Tıbbi ve aromatik bitkilerin *in vitro* antioksidan aktivitelerinin değerlendirildiği birçok çalışma mevcuttur (Sökmen vd., 2004; Tepe vd., 2004a; 2004b; Amarowicz vd., 2009; Al-Fatimi vd., 2010; Bektaş, 2010 ; Viuda-Marcos vd., 2010;). *T. pseudopulegioides* özütlerinin antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı sadece tek bir çalışma mevcuttur (Bektaş, 2010). Bu çalışmada doğal ortamlardan toplanan *T. pseudopulegioides* örneklerinin aktiviteleri araştırılmış, herhangi bir doku kültürü uygulaması yapılmamıştır.

Antioksidan aktivite testlerinde, DPPH testi ve beta karoten yöntemi sıklıkla kullanılan ve tamamlayıcı yöntemlerdir. DPPH testi, kararlı serbest radikal olan DPPH'ın, antioksidanların varlığında süpürülmesi (temizlenmesi) esasına dayanmaktadır (Burits ve Bucar, 2000). Ayrıca, lipid oksidasyonu sonucunda da serbest radikaller oluşmaktadır. β -karoten renk açılım testi spektrofotometrik yönteminde ise, bu lipid oksidasyonunun önlenme derecesi belirlenmektedir. Yapılan DPPH testleri sonucunda, doğal ortamlarda yetişen bitkilerin radikal süpürücü etkilerinin maksimum seviyede olduğu belirlenmiştir. Buna benzer olarak 2,0 mg/L KIN içeren ortamlardan yetişen fidelere ait özütlerinin de yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Doğal *T. pseudopulegioides* bitkilerinin özütlerinin, DPPH testinde gösterdikleri yüksek aktivitenin aksine, β -karoten testinde en düşük aktiviteye sahip olan özütler olduğu gözlenmiştir. Yine DPPH testinde yüksek

aktivite gösteren 2,0 mg/L KIN derişiminden elde edilen özütlerin çok yüksek olmasa da kayda değer aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. 0,5 mg/L 6-BA ile desteklenen ortamlardan elde edilen özütlerin lipid oksidasyonunu tamamen engellediği görülmüştür ve dolayısıyla oluşması muhtemel serbest radikallerin oluşumunu engellemiştir.

Polar tabiatlı fenolik bileşiklerin serbest radikaller üzerinde güçlü süpürücü etkileri birçok raporda sunulmuştur (Komali vd., 1999; Moller vd., 1999; Vardar-Ünlü., 2002; sökmen vd., 2004). Çalışmamızda, uygun koşullarda kurutulan ve toz haline getirilen fidelerin, metanol ile muamele edilmesiyle özütleri elde edilmiştir. Bu metanol özütleri hem polar hem de apolar tabiatlı fenolik bileşikleri ihtiva etmektedir. Hatta bazı çalışmalarda elde edilen bu metanol özütleri, kloroform (apolar faz) ve su (polar faz) olmak üzere fraksiyonlanmıştır. Polar özütlerin göstermiş olduğu yüksek radikal süpürücü etkinin yanında, lipid oksidasyonunu önlemede özellikle apolar özütlere (Hekzan özütleri gibi) göre daha etkisiz oldukları bildirilmiştir (Bektaş, 2010; Hatipoğlu vd., 2013).

Robby ve arkadaşları (2013), *T. vulgaris* metanol özütlerinin yüksek DPPH radikal süpürücü etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Bunu da HPLC analizleri ile belirlenen, metanol özütlerinin içerdiği sinamik asit, ferulik asit, rozmarinik asit ve metil rozmarenat varlığına bağlamıştır. Bu hidroksi-fenolik bileşiklerin sahip oldukları hidrojen atomlarını DPPH radikaline verdikleri ve böylece serbest radikallerin temizlenmesini sağladıkları bildirilmiştir (Lu ve Foo, 2001). Bu tezde, HPLC ile tanımlanan fenolik bileşikler ile antioksidan aktivite arasında herhangi bir ilişki kurulamamıştır. Tanımlanan bileşiklerden herhangi birinin varlığı ya da yokluğu ve varsa miktarının fazla ya da az olması, hem DPPH hem de β - karoten yönteminden elde edilen aktivite sonuçlarına olumlu ya da olumsuz etki göstermemiştir. Antioksidan aktivite testlerinden alınan farklı sonuçlara, HPLC analizlerinde kullanılan 14 standart bileşiğin dışında kalan ve elde edilen metanol özütlerinde yüksek ihtimalle bulunan diğer fenolik bileşiklerin neden olduğu düşünülmektedir. 0,5 mg/L KIN içeren ortamlardan elde edilen özütlerde, yapılan HPLC analizleri sonucunda test edilen standart bileşiklerin bulunmaması, fakat toplam fenolik miktarı tayininde fenolik maddelerin var olduğunun belirlenmesi ve ayrıca antioksidan aktivite testlerinde de orta derecede aktivite göstermesi, bu düşüncenin ispatı niteliğindedir. Ayrıca, Robby ve arkadaşlarının (2013) bildirdiğine göre bizim çalışmamızda tespit edilemeyen fakat özütler içerisinde olması muhtemel sinamik asit, rozmarinik asit ve metil rozmarenat'ın da bu aktiviteye neden olabileceği de akla gelmektedir.

Yapılan bu tez çalışmasıyla, *T. pseudopulegioides* türünün fenolik madde içeriğinin ve büyüme koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha önceki literatür bilgileri incelendiğinde, bu türe ait doku kültürü çalışmalarına, hem doğal hem de *in vitro* ortamda yetişen bitkilerin fenolik içeriklerinin ve miktarlarının belirlenmesine dair herhangi bir kayıt mevcut değildir. Bu bakımdan, bu tez kapsamında yapılan çalışmalar bir ilk ve elde edilen veri ve sonuçlar özgün değer taşımaktadır.

5. SONUÇLAR

1- Çamaşır suyu ile yapılan sterilizasyon sonrası canlılık tohumların canlılık yüzdeleri %59,7, kontaminasyon sıklığı %90 olarak belirlendi. H₂O₂ ile yapılan sterilizasyonda ise canlılık oranının çamaşır suyuna göre daha yüksek (%62,8), kontaminasyon oluşumunun ise daha düşük seviyede olduğu belirlendi. Bu sonuçlara göre, *T. pseudopulegioides* tohumların yüzey sterilizasyonları için H₂O₂ ile yapılan sterilizasyonun daha uygun olduğuna karar verildi.

2- *T. pseudopulegioides*'in tohumları kullanılarak denenilen 5 farklı besi ortamından elde edilen çimlenme verilerine göre, en iyi çimlenme ortamı MS (Murashige & Skoog) %92,57 ve en düşük çimlenme ise %60,91 ile SH (Schenk&Hildebrant)' dır. Dolayısı ile bu aşamadan sonra yapılan tüm çalışmalarda MS tercih edilmiştir.

3- Yapılan doğrudan organogenez çalışmalarında en uzun sürgün boyu 2,0 mg/L KIN ortamında (49,13), en fazla yapraklanma sayısı 0,5 mg/L TDZ ve 0,25 mg/L KIN (sırasıyla 14,90 ve 14,91) ortamlarında, en iyi kardeşlenme sayısı 2,0 mg/L TDZ ortamında (4,3) ve en yüksek % kuru ağırlık ise 0,25 mg/L 6-BA ortamında (%23,88) tespit edildi. Ayrıca yapılan çalışmalar neticesinde KIN, TDZ ve 6-BA'nın 0,25 mg/L derişimlerinden elde edilen % kuru ağırlık miktarları ön plana çıkmaktadır.

4- Metanol özütleri ile hazırlanan *T. pseudopulegioides* özütlerinin toplam fenolik miktarları 24,01 mg ile 1083,74 mg arasında, toplam flavonoid madde miktarları ise 22,48 mg ile 92,08 mg arasında tespit edildi. En yüksek toplam fenolik içeriği 1,0 mg/L KIN içeren ortamda, en yüksek flavonoid içeriği ise 0,5 mg/L 6-BA ortamında yetişen fidelerde sırasıyla 1083,74 ve 92,08 mg/100g olarak belirlendi.

5- HPLC analizleri sonucunda, genel olarak farklı ortamlardan elde edilen özütlerde 6 adet fenolik bileşik kalitatif ve kantitatif olarak tespit edildi (Protokateşin, Epikateşin, Kafeik asit, Rutin, Ferulik asit ve *o*-kumarik asit). Protokateşin 4,68-41,53, Kafeik asit 2,33-16,15, Epikateşin 16,30-17,22, Rutin 0,70-50,74, Ferulik asit 1,48-13,16 ve *o*-kumarik asit 0,33-2,36 arasında değerlere sahip olduğu görülmüştür.

6- HPLC analizler sonucunda, KIN'in bütün derişimlerinde ve kontrol grubunda *o*-kumarik asit sentezlenmediği, TDZ ve 6-BA'nın tüm derişimlerinde de epikateşin bileşiği sentezlenmediği tespit edildi.

7- Örneklerin β -karoten testinden elde edilen lipid oksidasyonunu engelleme derecelerinde en yüksek aktiviteyi 0,5 mg/L 6-BA ortamında gelişen fidelerin özütleri (%BAA: %100) ve en düşük aktivitede 0,25 mg/L KIN ortamında gelişen fidelerin özütlerinden (IC_{50} : 45,74) elde edildi. Yapılan DPPH testinde ise en yüksek radikal süpürücü etkiye sahip olan özüt 2,0 mg/L KIN ortamda gelişen fidelerden elde edilirken en düşük radikal süpürücü etki ise 0,5 mg/L KIN ortamında gerçekleşmiştir (IC_{50} : 4,77 mg/mL, IC_{50} : 45,44 mg/mL).

6. ÖNERİLER

Thymus pseudopulegioides bitkisinden başlatılan doku kültürleri ve bu bitkinin fidelerinden bazı fenolik bileşiklerin tespiti ve *in vitro* koşullarda yetiştirilen fidelerin antioksidan aktivitelerinin belirlendiği bu çalışma, bu bitki özelinde yapılan ilk çalışmadır.

Tez kapsamında çalışılan türün ve diğer tıbbi ve aromatik bitkilerin, daha verimli mikroçoğaltım protokollerinin oluşturulması, doğadan toplamanın ve sebep olduğu ekolojik tahribatın önüne geçecektir. Bu bağlamda, farklı sitokin grubu bitki büyüme düzenleyicisinin denendiği bu tez çalışmasına ek olarak, diğer sitokin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinin ve oksin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı derişimleri ve kombinasyonları denenerek, *T. pseudopulegioides*'in hem büyüme ve gelişme hem de ihtiva ettikleri sekonder bileşiklerinin optimizasyonu için uygun protokoller belirlenebilir.

Diğer *Thymus* türleriyle ilgili literatürde yer alan raporlar incelendiğinde, genellikle doğal ortamlardan toplanan bitkisel örneklerin içerikleri belirlenmiştir. Bu tez çalışmasından elde edilen veriler ve uygulanan protokoleler ışığında, diğer *Thymus* türlerinin de *in vitro* ortamlarda üretimi yapılabilir.

Araştırmamızda HPLC analizlerinde kısıtlı sayıda standart fenolik bileşik kullanılmıştır. Bu standart bileşiklerin sayısının artırılması, tıbbi açıdan önemli diğer metabolitlerin de tanımlanmasını sağlayacaktır. Tanımlanan yeni bileşiklerden hangisi ya da hangilerinin antioksidan aktiviteden sorumlu olduğu tespit edilebilir.

Doğrudan organogenez çalışmalarıyla elde edilen fidelerin yanı sıra bu türün çeşitli kısımlarından alınan eksplantlardan kallus kültürleri başlatılabilir. Bu kallus kültürleri üzerinden hücre süspansiyon kültürlerde oluşturulabilir. Böylelikle kitlesel üretim gerçekleştirilebilir ve elde edilmek istenen sekonder metabolitin daha fazla miktarda üretimi sağlanabilir.

Kallus kültürlerinin ya da hücre süspansiyon kültürlerinin biyoreaktörler gibi büyük sistemlerde uygulanabilir hale getirilmesi, üretilmek istenen bileşiğin kitlesel üretimini kolaylaştıracaktır ve mevsimsel ve iklimsel koşullara bağlı kalmaksızın, yılın her döneminde üretim gerçekleştirilebilecektir.

7. KAYNAKLAR

- Acartürk, R., 1997. Şifalı Bitkiler Flora ve Sağlığımız, Reprovizyon Ltd. Sti., Ankara, 2s.
- Adzet T., Vila R. ve Canigüeral S., 1988. Chromatographic analysis of polyphenols some Iberian *Thymus*. Journal of Ethnopharmacology,; 24: 147-154.
- Adzet, T., ve Martínez, F., 1981. Flavonoids in the leaves of *Thymus*: a chemotaxonomic survey, Biochem. Syst. Ecol., 9, 293–295.
- 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.
- Alan R., 1989. The effect of nitrogen nutrition on growth, chemical composition and response of cucumbers (*Cucumis sativus* L.) to nitrogen forms in solution culture. Journal of Horticultural Science. 64, 467–474.
- Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schroder, G. ve Lindequist, U., 2010. *In vitro* Antimicrobial, Cytotoxic and Radical Scavenging Activities and Chemical Constituents of the Endemic *Thymus laevigatus* (Vahl). Records of Natural Products, 4, 1, 49-63.
- Altan, Y., Ugurlu, E. ve Gücel., S., 1999. “Senkaya (Erzurum) ve çevresinin etnobotanik özellikleri”, I. International Symposium on Protection of Natural Environment and Ehlami Karaçam, Kütahya.
- Amarowicz, R., Zegarska, Z., Rafalowski, R., vd., 2009. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of ethanolic extracts of thyme, oregano, and marjoram. European Journal of Lipid Science And Technology, 111, 11, 1111-1117.
- Babaoglu, M., Yorgancılar, M. ve Akbudak, M., A., 2001. Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri, Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları, Babaoglu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (eds.) S. Ü. Vakfı Yayınları, ISBN 975-6652-04-7, Konya, s. 262-281.
- Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S., 2002. Bitki Biyoteknolojisi, Cilt I. Sel-Ünv. yayınları, 374 s, Konya.
- Başer, K.H.C., 2004. Fonksiyonel Gıdalar Ve Nutrasötikler, 14.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir, Eds. K.H.C.Başer ve N.Kırimer Web’de yayın tarihi: Haziran ISBN 975-94077-2-8.
- Bayramoğlu, M. M., Toksoy M. ve Şen, G., 2009. Türkiye’de Tıbbi Bitki Ticareti, II. Ormancılıkta Sosyo-Ekonomik Sorunlar Kongresi Şubat, SDÜ, Isparta Bildiriler Kitabı 90-98.

- Baytop T., 1984. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. Sanal Matbaacılık. İstanbul Üniversitesi Yayınları No: 3255, 282-283.
- Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmiste ve Bugün), 2. Baskı Nobel Kitap Evi, İstanbul.
- Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. Nobel Tıp Kitapevleri, 480 s, Ankara.
- Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 3.
- Bektaş, E., 2010. Doğu Karadeniz Bölgesinde Doğal Olarak Yetişen Üç *Thymus* Türünün Özüt ve Uçucu Yağlarının Antioksidan, Antimikrobiyal ve Antiviral Aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Beltrán J. L., Sanli N. and Fonrodona G., 2003, Spectrophotometric, Potentiometric and Chromatographic pKa Values of Polyphenolic Acids in Water and Acetonitrile-water Media, Analytica Chimica Acta 484, 253-264.
- Bhojwani, S., S. ve Razdan, M.K., 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Pratic. Amsterdam, Elsevier.
- Briskin, D. P., 2000. Medicinal plants and phytomedicines. LinKING plant biochemistry and physiology to human health. Plant Physiology, 124, 507.514
- Brown DCW. ve Thorpe TA. 1995. Crop improvement through tissue culture. World J. Microb. Biotech., 11, 409-415.
- Burits, M. ve Bucar, F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil, Phytotherapy Research, 14, 323-328,
- Burits M., Asres K. ve Bucar F., 2001. The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*, Phytother Research, 15, 103-108.
- Burt, S., 2004. “Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review”, International Journal of Food Microbiology, 94, 223.
- Chung, S.K., Osawa, T. ve Kawakishi, S., 1997. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). Biosci. Biotech. Bioch., 61, 118–123.
- Cimpan, G. ve Gocan, S., 2002. Analysis of medicinal plants by HPLC: recent approaches, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 25, 2225 - 2292.
- Coelho N, Goncalves S, Gonzalez-Benito ME. ve Romano A., 2012. Establishment of an in vitro propagation protocol for *Thymus lotocephalus*, a rare aromatic species of the Algarve (Portugal). Plant Growth Regulation. 66(1):69–74.

- Collin H. A., Edwards H.S., 1998. "Plant Cell Culture", BIOS scientific Publisher, sayfa 158.
- 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 by red wine-Red Wines confer extra benefit when it comes to preventing coronary heart disease. Nature, 414,863-864.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O. and Dyatmiko, W., 1997. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*. HCA, 80, 1144-1152.
- Çakırlar, H., Tıprıdamaz, R., Özkum, D. ve Çiçek, N., 2000. *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.
- Çubukçu, B., Meriçli, A. H., Mat, A., Sarıyer, G., Sütlüpnar, N.ve Meriçli, F., 2002. Fitoterapi, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmokognozi Anabilim Dalı, İstanbul, 1.
- Davis PH., 1982. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh, UK: Edinburgh University Pres. 7, 349-382.
- Deans, S.G. ve Ritchie, G., 1987. "Antibacterial properties of plant essential oils", International Journal of Food Microbiology, 5, 165.
- 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.
- Dohling S, Kumaria S, ve Tandon P., 2008. Optimization of nutrient requirements for asymbiotic seed germination of *Dendrobium longicornu* and *D. formosum*. Proceedings of the Indian National Science Academy.74,167-171.
- Dorman, H.J.D. ve Deans, S.G., 2000. "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils", Journal of Applied Microbiology, 88, 308.
- Evans WC., 1989. Trease and Evans' Pharmacognosy, 13th ed. Oxford, The Alden Pres., 217.
- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A. ve Boskou, D., 2002. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory, J. Agric. Food. Chem., 50, 5294-5299.
- Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M. S., 2013. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Antimikrobiyal, Antioksidan Aktiviteleri ve Kullanım Olanakları, Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6,2.

- Frankel, N., E., Huang, S., Aeschbach, R. ve Prior, E., 1996. Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1, 131-135.
- 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.
- Giri, A. ve Narasu M. L., 2000. Transgenic Hairy Roots: Recent Trends and Applications, *Biotechnology Advances*, 18, 1– 22.
- Gürsoy, O. V. ve Gürsoy, U. K., 2004. Anadolu’da diş ve dişeti ile ilgili hastalıkların tedavisinde halk arasında yaygın olarak kullanılan birkiler, kullanım şekilleri ve bitkisel özellikleri, *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 7, 1.
- Hammer, K. A., Carson, C. F. ve Riley, T. V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.
- Harborne, J., B., 1967. Comparative Biochemistry of the Flavonoids, *Academic Press*, New York, NY.
- Harborne, J. B., Marby, T. J. ve Marby H., 1975. The Flavonoids, *Chapman and Hall*, London.
- Harborne, J. B. and Marby, T. J., 1982. The Flavonoids: Advances in Research, *Chapman and Hall*, London.
- Harborne, J., B., 1994. The Flavonoids Advances in Research Since 1986, *Chapman & Hall/CRC*, USA, 638.
- Harborne, J., B. ve Williams, C. A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55, 481 - 504.
- Hartmann, H.T. and Kester, 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.
- Hatipoğlu, G., Sökmen, M., Bektaş, E., Deferera, D. ve Sökmen, A., 2013. Automated and standard extraction of antioxidant phenolic compounds of *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius*, *Industrial Crops and Products*, 43,427-433.
- Hempel, M., 1985. The influence of micropropagation on progeny plants, *Acta Hort.*, 226,2, 615-630.

- Hertog, M., G., L., Hollman, P., C., H. ve Katan, M., B., 1992b. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits 286 commonly consumed in the Netherlands, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 2379 - 2383.
- Hirata, K., Yamanaka, A., Kurano, N., Miyamoto, K. ve Miura, Y., 1987. Production of indol alkaloids in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Agri. Biol. Chem., 51,1311-1317.
- Ho, C.T., Huang, M.T., Lou, Y.R., Ma, W., Shao, Y., Wei, G.J., Wang, M. ve Chin, C.K., 2000. Antioxidant and antitumor activity of rosemary leaves. Phytochemicals and Phytopharmaceuticals, 296-307.
- Hu, C., Y. and P., J., Wang, 1983. In: Handbook of Plant Cell Culture, Crop Species, vol. 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.
- Huetteman C. A. ve Preece J. E., 1993. Thidiazuron: a potent cytoKINin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tissue Organ Cult. 33,105–119. doi:10.1007/BF01983223.
- Juglal, S., Govinden R. ve Odhav B., 2002. Spice oils for the control of cooccurring mycotoxin producing fungi. J. Food Protection. 65, 683-687.
- Kandemir A. ve Beyazoğlu O., 2002. Köse Dağları'nın (Gümüşhane) Tıbbi ve Ekonomik Bitkileri. S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6-3, 148-157.
- Karamanoglu, K., 1977. Farmasötik Botanik Ders Kitabı, Ankara üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara Üniversitesi Basım Evi, Ankara 44.
- Kırbağ, S. ve Bağcı E., 2000. *Picea abies* (L.) Karst. ve *Picea orientalis* (L.) Link Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Bir Araştırma, Journal of Qafqaz University, III (I), 183-190.
- Kirby, A.J. and Schmith, R.J., 1997. The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs-I. J. Ethnopharmacol. 56, 103-108.
- Komali, A. S., Zheng, Z. ve Shetty, K. A., 1999. Mathematical model for the growth KINetics and synthesis of phenolics in oregano (*Origanum Vulgare*) shoot cultures inoculated with *Pseudomonas* species. Process Biochem, 35, 227-235.
- Kramer PJ. ve Kozlowski TT., 1979. Physiology of woody plants. New York: Academic Press.
- Krishna, P., S., J. ve Reddy G., P., 2005. Agricultural Biotechnology in Developing Countries: Nature and 'Code' in Meeting The Needs of Resource Poor, Asian Biotechnology and Development Review, 7, 3, 37- 53.

- Kulevanova S., Stafilov T., Anastasova F., Ristic M. ve Brkić D., 1997. Isolation and Identification of flavonoid aglycones from some taxa of Sect. Marginati of genus *Thymus*. Pharmazei, 52,886-887.
- Kulevanova S., Stefova M. ve Stafilov T., 1998. HPLC analyses of the flavonoids in taxa and genus *Thymus* L. *T. tosevii*, *T. longidens* var. *lanicaulis* and *T. jankae* var. *jankae* var. *pantotrichus* and var. *patentipilus*. Anal. Lab. 7, 103-108. Ref. CA: 144244h 130,1999.
- Kurkin VA., Braslavskii VB., Krivenchuk PE ve Plaksina IT., 1988. Compounds in the aerial part of *Thymus bashkiriensis*. Khim. Prir. Soedin. 758. Ref. CA. 111765n 110-127, 1989.
- Ledbetter DI. ve Preece JE 2004. Thidiazuron stimulates adventitious shoot production from *Hydrangea quercifolia* leaf explants. Sci. Hort. 101, 121-126.
- Linsmaier, E., M., Skoog, F., 1965. Organic growth requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 18, 100-127.
- Lu, Y. R. ve Foo, L. Y., 2001. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). Food Chem. 75, 197-202.
- Macheix J-J., Fleuriet A. and Billot J., 1990. Fruit Phenolics, USA: CRC Press.
- Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Chinou, I. And Haroutounian, S. A., 2002. "Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek *Achillea species*", Z.Naturforsch., 57, 287.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. ve Jime' nez, 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, s. 262-281.
- Mariska, I., Gati, E. ve Sukmadjaja, D., 1991. In vitro clonal propagation of gerbera, Plant Breeding Abst., 61, 4, 499.
- Mastelic, J. ve Jerkovic, I., 2003. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L. Food Chemistry, 80, 135-140.
- Matkowski, A., 2008. "Plant in vitro culture for the production of antioxidants – A review", Biotechnology Advances, vol. 26, 548-560.

- Merken, H., M., ve Beecher, G., 2000. Measurement of food flavonoids by highperformance liquid chromatography: A review, J. Agric. Food Chem., 48, 3, 577-599.
- Moller, J. K. S., Madsen, H. L., Altonen, T. ve Skibsted, L. H., 1999. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. Food Chem., 64, 215-219.
- Mouhajir F., Pedersen JA., Rejdali M. ve Towers GHN., 2001. Phenolics in Moroccan medicinal plant species as studied by electron spin resonance spectroscopy. Pharmaceutical Biology, 39, 391-398.
- 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 22-25 February 2006 - Sanremo, Italy. p 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 (*Begoniatuberhybrida* Voss.), Sci. Hort., 79 ,3-4, 245-251.
- Nongrum I., Kumaria S. ve Tandon P., 2007. Influence of in vitro media on asymbiotic germination, plantlet development and ex vitro establishment of *Coelogyne ovalis* and *Coelogyne nitida*. Proceedings of the Indian National Science Academy. 73,205– 207.
- Nordine, A., Bousta, D., Khanchoufi, A. ve Meskaoui, A., 2013. An efficient and rapid in vitro propagation system of thymus *hyemalis lange*, a wild medicinal and aromatic plant of mediterranean region, Int. J. Pharm. Biosci. Technol.,1,3, 118-129.
- Ozudogru EA., Kaya E., Kirdok E. ve Issever- Ozturk S., 2011. *In vitro* propagation from young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* and *T. longicaulis*) resulting in genetically stable shoots. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 47,2,309–320.
- Özgüven, M., Sekin, S., Gürbüz, B., Şekeroğlu, N., Ayanoğlu, F. ve Erken, S., 2005. Tütün, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretimi ve Ticareti. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, 3-7 Ocak 2005, Ankara.
- Özkum, D., 2006. Kekik (*Origanum minutiflorum*) ve adaçayı (*Sideritis stricta*)'nın doku kültürü yoluyla çoğaltımı üzerinde araştırmalar, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Öztürk, M. S.,1986. Ekonomik Botanik, Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları, Erzurum, 40.

- Palombo, E.A. ve Semple, S.J., 2001. "Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants", Journal of Ethnopharmacology, 77, 151.
- Pasqualetto, P. L., 1992. Vitrification in plant tissue culture, Plant Breed. Abst., 62,5,477.
- Patil ve Malavika, 1968. Tetrazolium test for seed viability and vigour, Handbook of seed testing, 209.
- Pelkonen, V.P. ve Kauppi, A., 1999. The effect of light and auxins on the regeneration of lily (*Lilium regale* Wil.) cells by somatic embryogenesis and organogenesis, Int. J. Plant Sci., 160 ,3, 483-490.
- Persley, J.G. and N.J. Siedow, 1999. Applications of biotechnology to crops: benefits and risks.
- Pierik, R.L.M., 1993. Mikropropagation: Technology and opportunities. In: Prakash J., Pierik, R.L.M. (eds.), Plant Biotechnology. p. 9, Intercept Ltd. UK.
- Preece, J. E. and Imel, M. R., 1991. Plant regeneration from leaf explants of Rhododendron, PJM hybr ids. Sci. Hort., 48,159 – 170.
- Preece, J., E. ve Sutter, E., G., 1993. Acclimatization of micropropogated plants to the green house and field. Micropropagation Thecnology and Application, Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 71-95.
- Price, K., R., Bacon, J., R. ve Rhodes, M., J., C., 1997. Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*Allium cepa*), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 938-942.
- Raghavan V. ve Torrey JG., 1964. Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid Cattleya. American Journal of Botany. 51,264–274.
- Rasooli, I. ve MirMostafa, S.A., 2002, "Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils", Fitoterapia, 18, 244.
- Robbins, R., J., 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical Methodology, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 2866 - 2887.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H. ve Khalel, K. I., 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts, Industrial Crops and Products, 43, 827-831.
- Saez F., Sknchez P. ve Piqueras A., 1994. Micropropagation of *Thymus piperella*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 39,3,269-272.

- Sakuta M. and Komamine A. 1987. Cell growth and accumulation of secondary metabolites. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 4 (Constabel F. and Vasil I. K., eds.). Academic Press, San Diego, pp. 97 – 114.
- Sayar, A., Güvensan, A., Özdemir, F. ve Öztürk, M., 1995. “Mugla (Türkiye) ilindeki bazı türlerin etnobotanik özellikleri”, The Herb Journal Of Systematic Botany, 2, 1, 151.
- Schenk, R., U., ve Hildebrandt, A., C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, Can. J. Bot. 50,199-204.
- Schicher, H., 1993. “The significance of phytotherapy in Europe”, Zeitschrift für Phytotherapie, 14, 132.
- 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.
- Schuster B. and Herrmann K., 1985. Hydroxybenzoic and Hydroxycinnamic Acid Derivatives in Soft Fruits, Phytochemical, 24, 2761-2764.
- Schwenkel HG, Grunewaldt J. 1988. In vitro propagation of *Cyclamen persicum* Mill. Acta Horticulture, 226, 659-662
- Shabnum, S. ve Wagay, M. G., 2011. Micropropagation of Different Species of *Thymus*, Journal of Research & Development, 11, 71-80.
- Shahidi F and Wanasundara PKJPD., 1992. Phenolic antioxidants, Food Sci Nutr, 32, 67-103.
- Shahidi, F. and Naczk, M., 1995. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications, pp. 281-319.—Technomic Publishing Company Inc., Lancaster (Pennsylvania).
- Skocbušić, M., Bezić, N. ve Dunkić, V., 2006. “Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis.growing in Croatia”, Food Chemistry, 96, 20.
- Smith D. A. ve Banks, S. W., 1986. Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure Activity Relationship, 113-124.
- Sökmen, A. ve Gürel, E., 2001. Sekonder metabolit üretimi, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya, s.211-261.
- Sökmen, A., Güllüce, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sokmen, M. ve Sahin, F., 2004. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. Food Control, 15, 627–634.

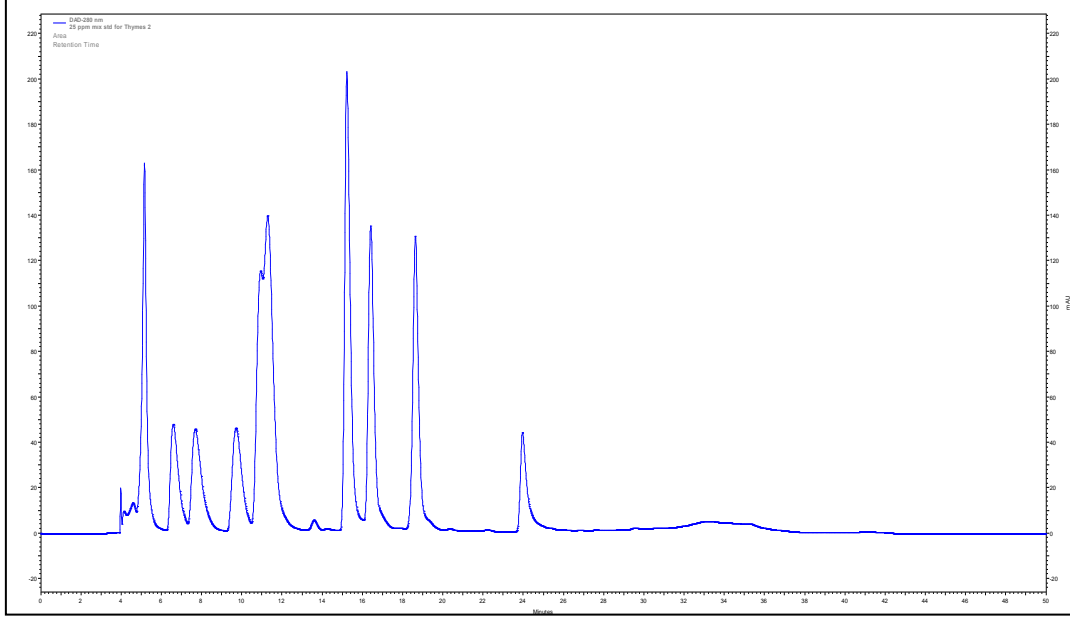
- Spacil Z., Novakov L. and Solich P., 2008. Analysis of Phenolic Compounds by High Performance Liquid Chromatography and Ultra Performance Liquid Chromatography, *Talanta*, 76,189-199.
- Srivastava, N., Kamal, B., , Sharma, V., Negi, Y. K., Dobriyal, A.K., Gupta, S. ve Jadon, V. S., 2010. Standardization of Sterilization Protocol for Micropropagation of *Aconitum heterophyllum*- An Endangered Medicinal Herb, *Academic Arena*, 2,6,, 62-66.
- Swain, T., 1975. The Flavonoids, Chapman and Hall., (Eds.Harborne, J. B., Marby, T. J., Marby, M.) 109.
- Taiz, L. ve Zeiger, E. 2002. Plant. Physiology., Third Edition Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts. p.690.
- Takeucki H., Lu ZG. ve Fujita T., 2004. New monoterpene glucoside from the aerial parts of thyme (*Thymus vulgaris* L.). Biosci. Biotechnol. Biochem. 68,1131-1134.
- Tanrıver, S., *Origanum minutiflorum*' un (sütçüler kekiği) mikroçoğaltımı ve in vitro koşullarda üretilen fidelerin fenolik bileşiklerinin analizi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Tranzon, 2013.
- Tatari Vernosefadrani M ARN. ve Nosrati SZ., 2009. Optimization of in vitro culture for Gerbera cv. Tropic Blend. *J Sapling Seed* 2,25,389-401.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, M., Polissio, M., ve Sokmen, A., 2004a. In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils and Various Extracts of *Thymus eigii* M. Zohary et P.H. Davis. J. Agric. Food Chem. 52, 1132-1137.
- Tepe, B., Sökmen, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Polissiou, M ve Sökmen,A., 2004b. Antioxidative Activity of the Essential Oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* ve *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. Journal of Food Engineering, 66, 447-454.
- Tıpırdamaz, R., 2003. Rooting and acclimatization of *in vitro* micropropagated snowdrop (*Galanthus ikariae* Baker.) bulblets, Akdeniz Üniv. Ziraat Fak. Dergisi, 16,2, 121-126.
- Tıpırdamaz, R., Ellialtıoğlu, S. ve Çakırlar, H., 1999. Kardelenin (*Galanthus ikariae* Baker.) doku kültürü yoluyla çoğaltımı; eksplant tipi, ortam pH'sı ve karbonhidrat kaynağının soğancık oluşumuna etkisi, Tr. J. Agr. For., 23, 823-830.
- Turhan H., 1997. Salinity Studies in Potato (*Solanum tuberosum* L.). PhD Dissertation, The University of Reading. UK.

- Tümen, G., Yildiz, B., Kirimer N., Kürkcüoğlu, M. ve Baser, K.H.C., 1999. Composition of the essential oil of *Thymus fallax* Fisch. et Mey. from Turkey. J. Essent. Oil Res., 11, 489–490.
- Ultee, A., Bennink, M.H.J. ve Moezelaar, R., 2002. “The phenolic hydroxyl group of carvacrol is the essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*”, Applied and Environmental Microbiology, 68,4, 1561.
- Ulukapı, K., Demiral, S., Naci Onus, A. ve Ülger, S., 2008. Bazı *Origanum* türlerinde dışarıdan GA3 uygulamalarının in vivo ve in vitro koşullarda çimlenme üzerine etkilerinin araştırılması, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 21,1, 123–129.
- URL-1, <http://molbiol.ru/forums/lofiversion/index.php/t496927.html>, 16 Şubat 2014.
- URL-2, tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=8008, 16 Şubat 2014.
- Vardar-Ünlü, G., Candan, F., Sökmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, M., Dönmez, E. ve Tepe, B., 2003. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae). J. Agric. Food Chem, 51,63-67.
- Viuda-Martos, M., Navajas, Y.R., Zapata, E.S., Fernandez-Lopez, J. ve Perez-Alvarez, J.A., 2010. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet., Flavour And Fragrance Journal , 25, 1, 13-19.
- Warren, G., 1991. The regeneration of plants from cultured cells and tissues. In: Stafford A, Warren G (eds), *Plant cell and tissue Culture*, pp 83-100, Open University Pres, Milton Keynes.
- Werbrouck, S., P., O. ve Debergh, P.C., 1994. Applied aspects of plant regeneration (micropropagation), *Plant Cell Culture – A Practical Approach*, Dixon, R.A and Gonzales, R.A. (eds.) Oxford Uni. Press., New York, pp. 127-135.
- World Health Organization monographs on selected medicinal plants, World Health Organization, Geneva, 1, 1999, 1.
- Wrolstad, R. E., Durst, R. W., & Lee, J. 2005. TracKING color and pigment changes in.
- Zarzuelo, A. ve Crespo, E., 2002. The medicinal and non-medicinal uses of thyme. In: *Thyme The genus Thymus* (EdS. Stahl-Biskup, E. ve Saez, F.). Taylor & Francis, ISBN 0-203-27289-7. p. 256-305.
- Zeybek, U. ve Zeybek, N., 2002. Farmasötik Botanik Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematigi ve Önemli Maddeleri, 3 (Degistirilmis 3. baskı) Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornova-Mzmir, 378.

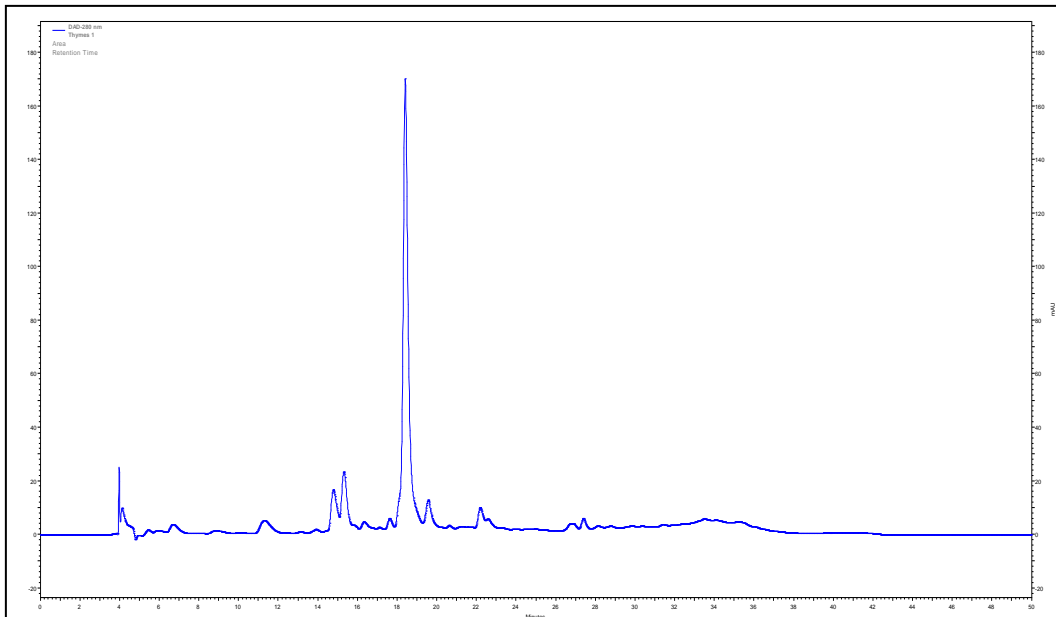
- Zgórka G. ve Gowniak K., 2001. Variation of free phenolics acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 26, 79-87.
- Zheng, W. ve Wang, S. Y., 2001. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs, J. Agric. Food Chem., 49 ,11, pp 5165–5170.
- Ziaková A. ve Brandšteterová E., 2003. Validation of HPLC determination of phenolic acids present in some Lamiaceae family plants. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies , 26, 443-453.
- Zuzarte, M.R.& Dinis, A.M.& Cavaleiro, C.& Salgueiro, L.R.& Canhoto, J.M., 2010, "Trichomes, essential oils and in vitro propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae)", Industrial Crops and Products, vol. 32, p.580-587.

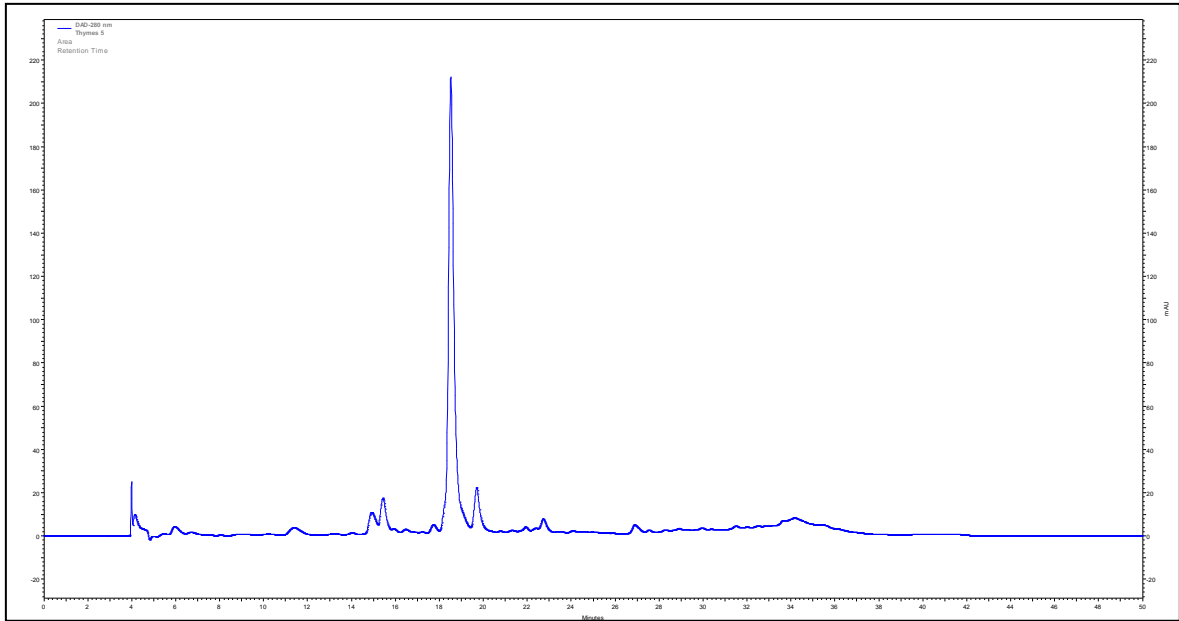
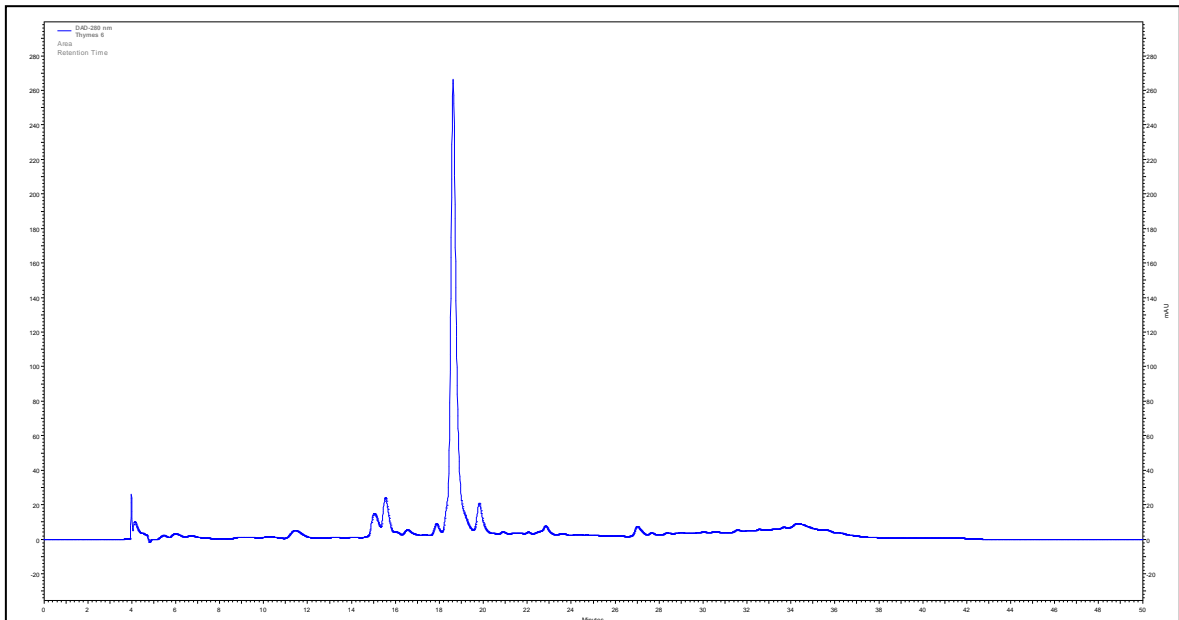
8. EKLER

Ek 1. 500 mikromolarlık standart karışımının 280 nm' deki kromatogramı

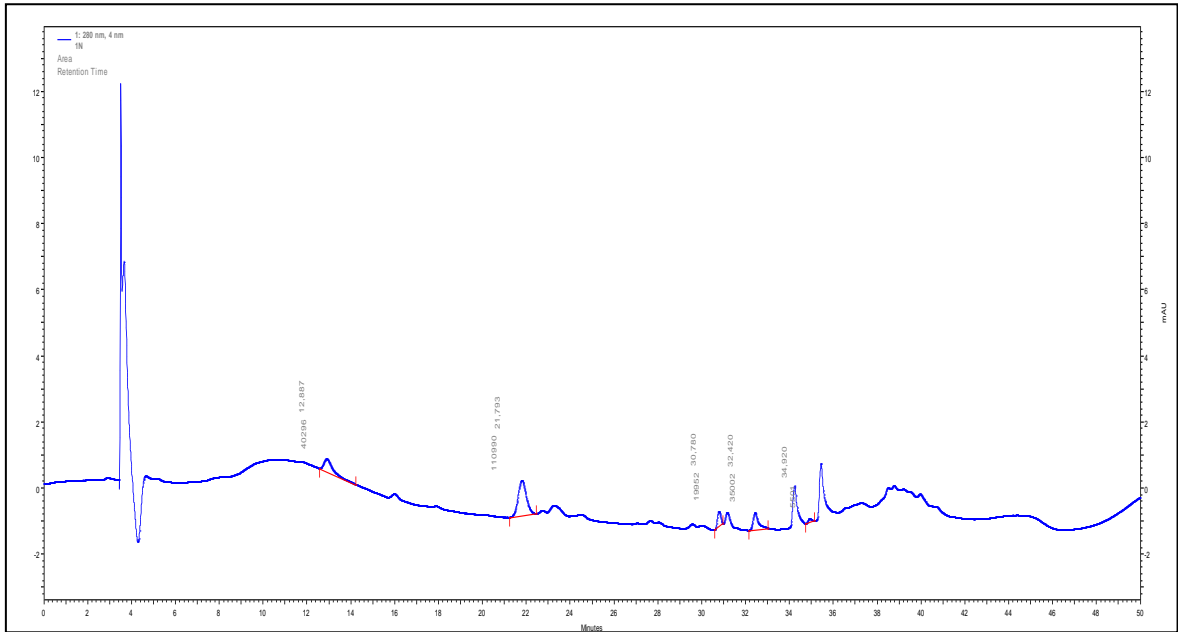


Ek 2. *T. pseudopulegioides*'in doğal ortamdan alınan özütünün 280 nm' deki kromatogramı

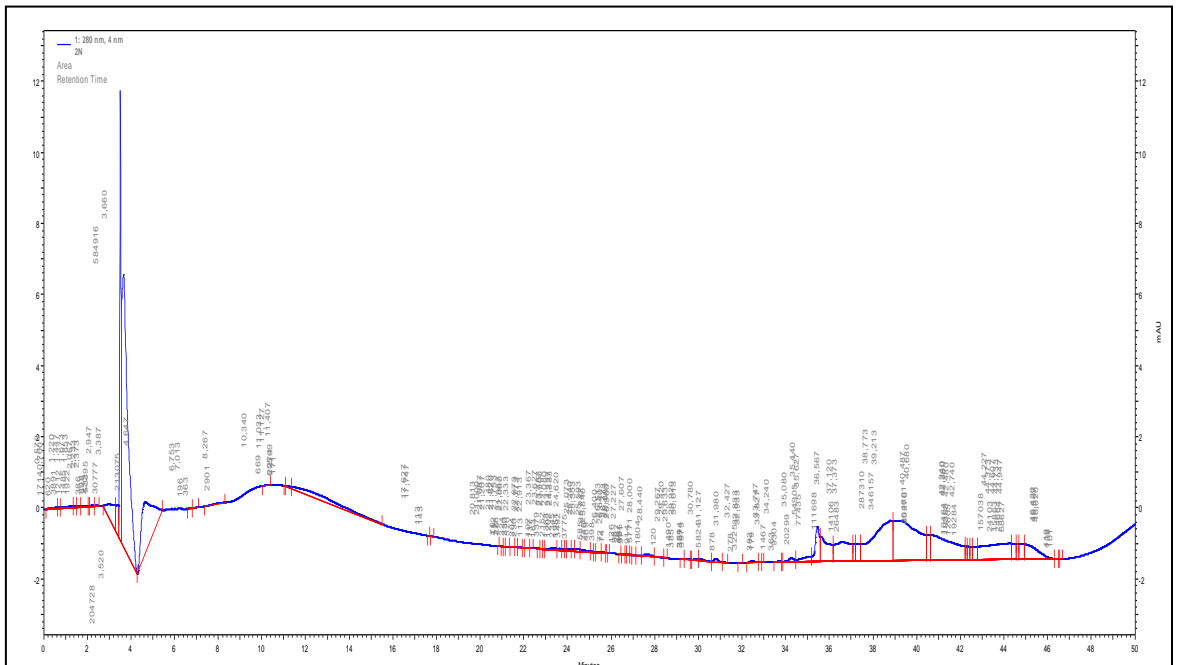


Ek 5. 1.0 mg/L KIN'in 280 nm' deki kromatogramı**Ek 6.** 2.0 mg/L KIN'in 280 nm' deki kromatogramı

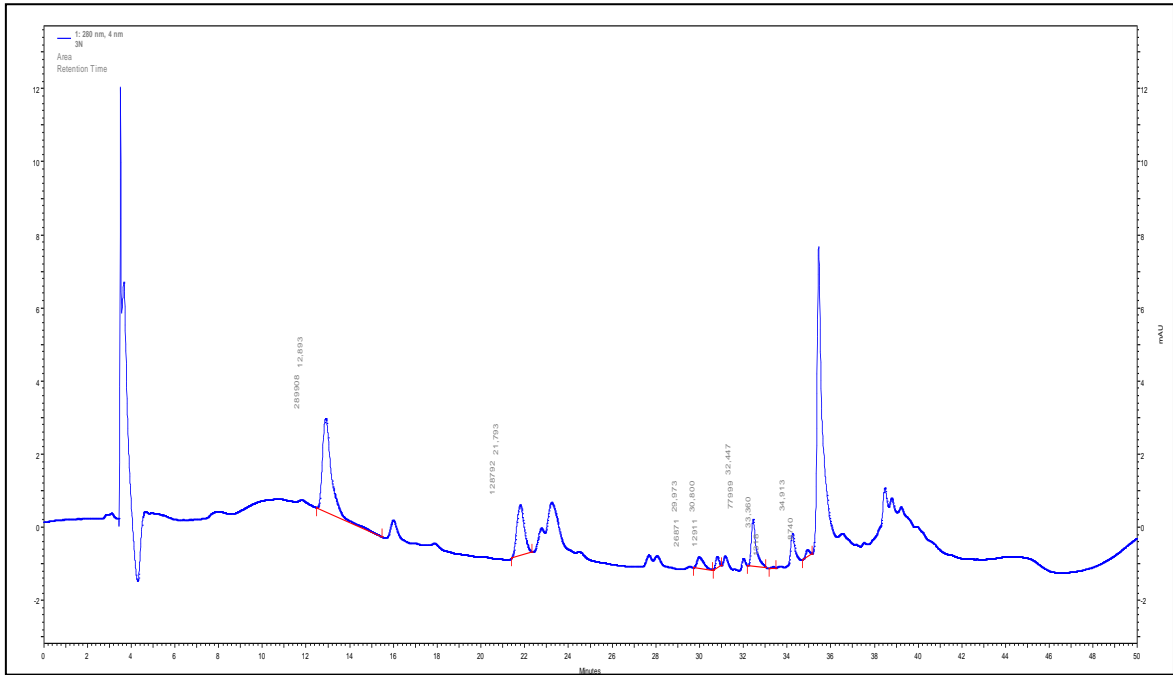
Ek 7. 0.25 mg/L TDZ'nin 280 nm' deki kromatogramı



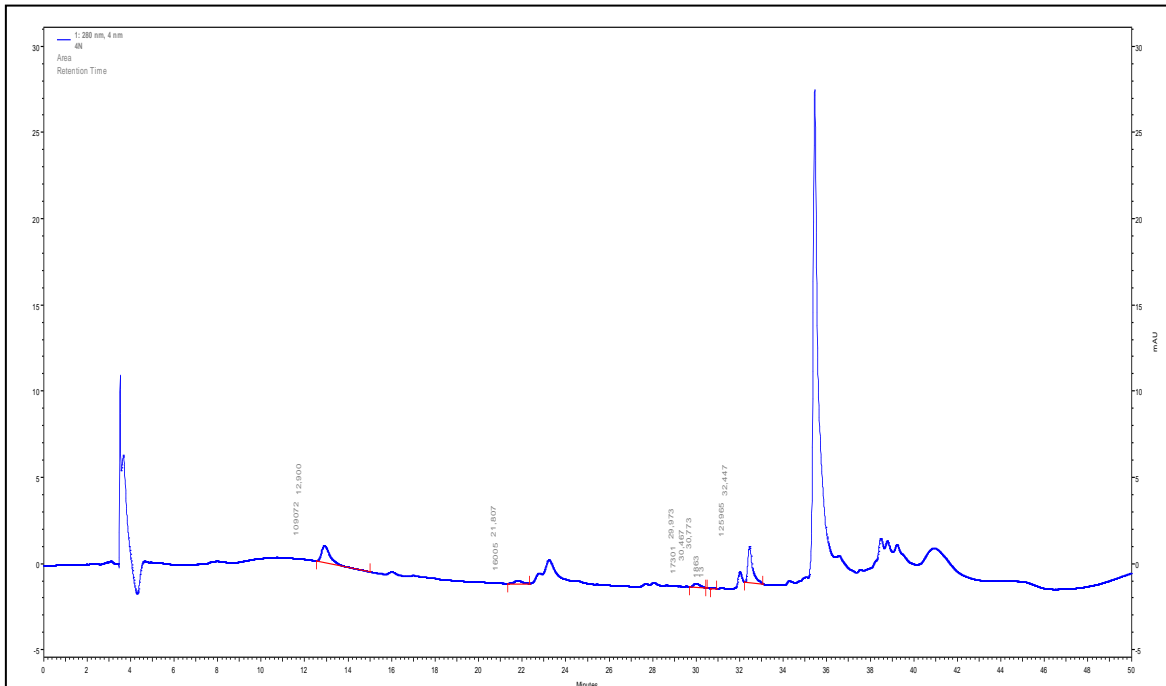
Ek 8. 0.5 mg/L TDZ'nin 280 nm' deki kromatogramı



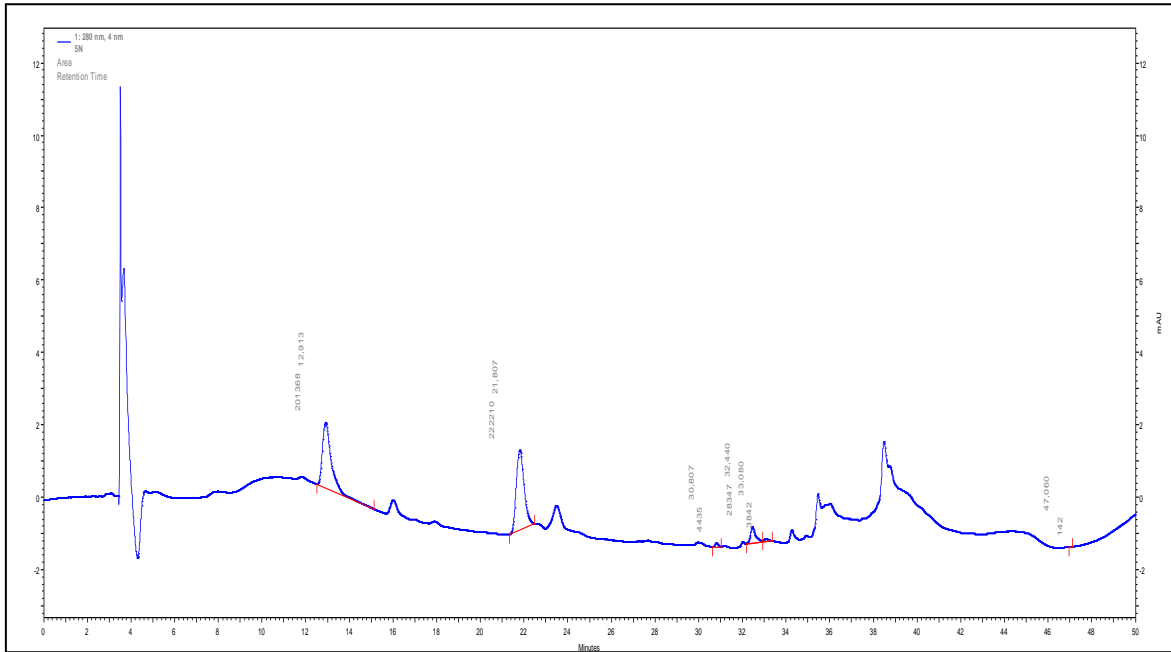
Ek 9. 1.0 mg/L TDZ'nin 280 nm' deki kromatogramı



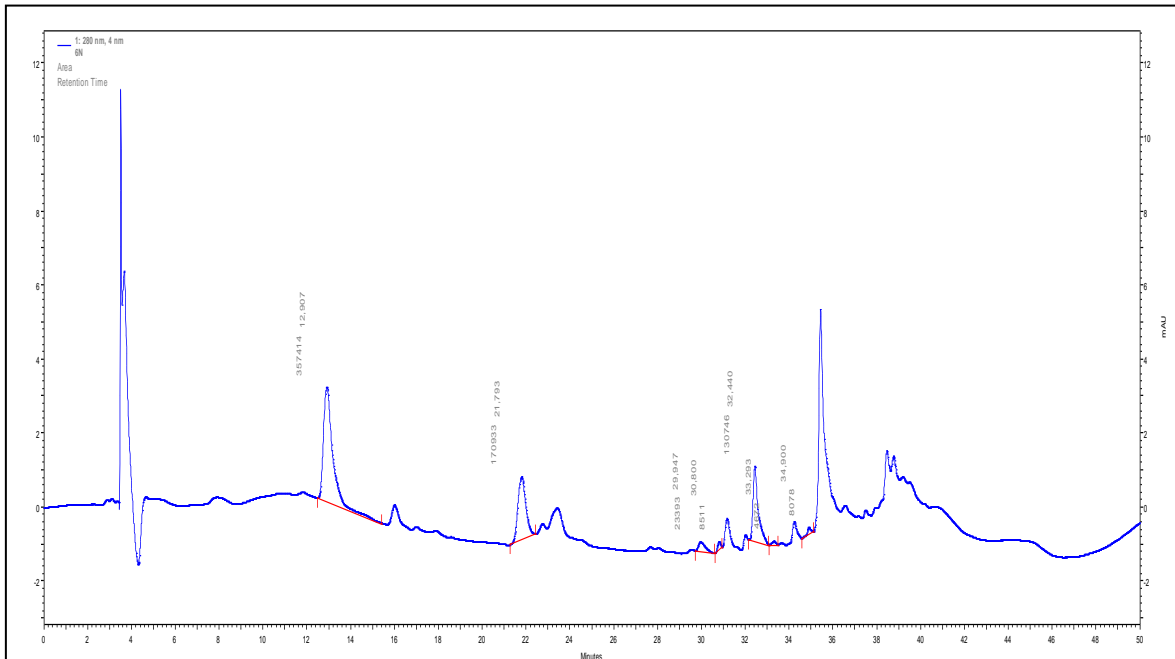
Ek 10. 2.0 mg/L TDZ'nin 280 nm' deki kromatogramı

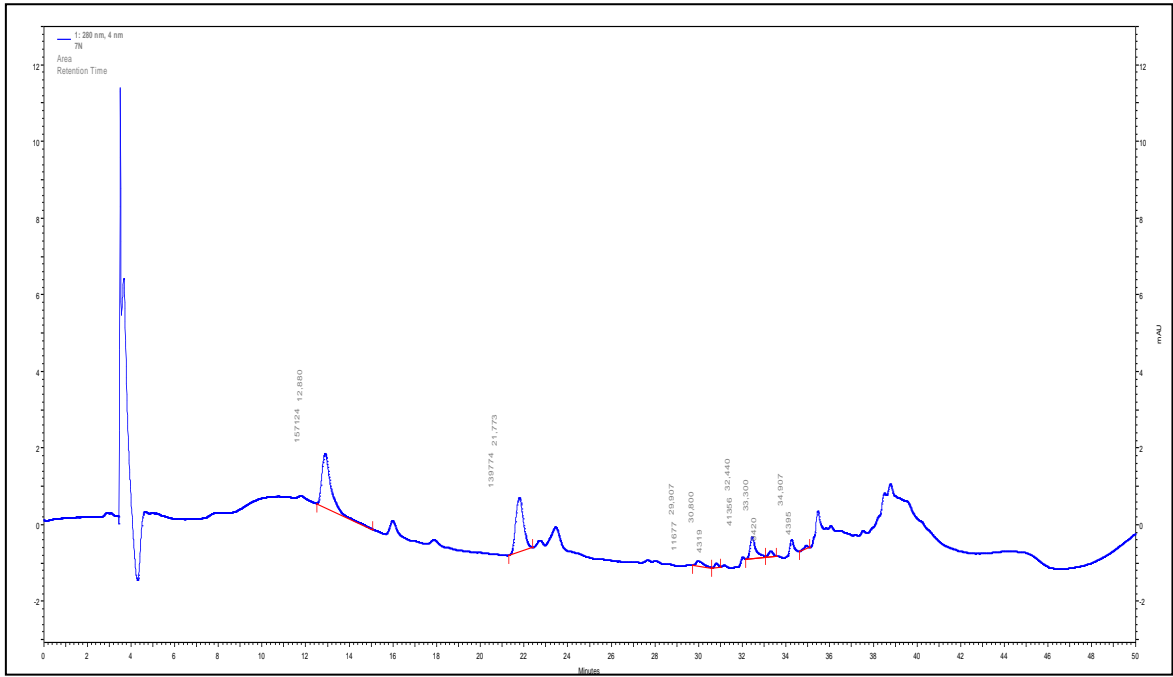
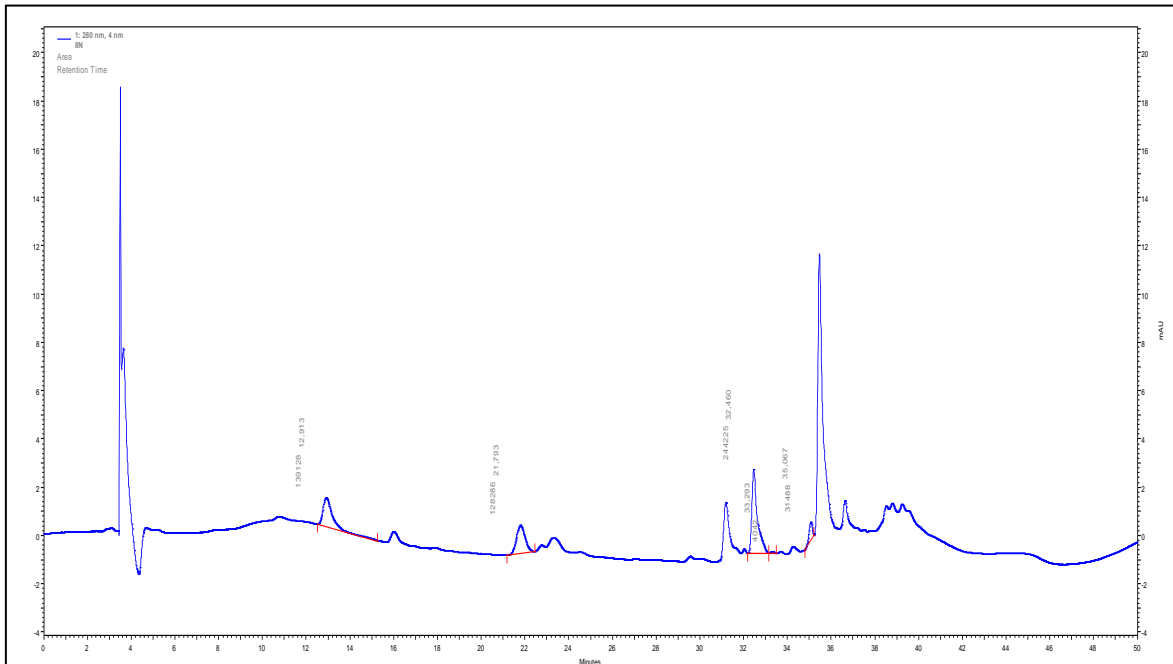


Ek 11. 0.25 mg/L 6-BA'nın 280 nm'deki kromatogramı



Ek 12. 0.5 mg/L 6-BA'nın 280 nm'deki kromatogramı



Ek 13. 1.0 mg/L 6-BA'nın 280 nm'deki kromatogramı**Ek 14.** 2.0 mg/L 6-BA'nın 280 nm'deki kromatogramı

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Trabzon'un Tonya ilçesinde doğdu. İlköğretimini Melikşah Köyü İlköğretim Okulunda tamamladı. Orta öğretimini Tonya Atatürk Çok Programlı Lisesin'de tamamladı. 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Rize Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı ve 2009 yılında mezun oldu. 2011 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Botanik Bilim Dalında Tezli Yüksek Lisans eğitime başladı. 2012 yılında Gümüşhane Üniversitesinde, İş Sağlığı ve Güvenliği eğitime başladı. İş Sağlığı ve Güvenliği ve İlk Yardım uzmanı olmakla birlikte halen Tezli Yüksek Lisans ve İş Sağlığı ve Güvenliği eğitime devam etmektedir.