

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**THYMUS LEUCOTRICHUS HAL. (LAMIACEAE) MİKROÇOĞALTIMI,
ROZMARİNİK ASİT VE UÇUCU YAĞ İÇERİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Tuba BEKİRCAN

HAZİRAN 2017
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

Trabzon

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Biyoloji Anabilim Dalında
Tuba BEKİRCAN Tarafından Hazırlanan**

**THYMUS LEUCOTRICHUS HAL. (LAMIACEAE) MİKROÇOĞALTIMI,
ROZMARİNİK ASİT VE UÇUCU YAĞ İÇERİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 31 /05/2017 gün ve 1704 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ekrem GÜREL

Üye : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN

Üye : Prof. Dr. Faik Ahmet AYAZ

Üye : Prof. Dr. Ali Ömer ÜÇLER

Üye : Prof. Dr. Gökhan ABAY

The image shows four handwritten signatures in blue ink, each written over a horizontal dotted line. The signatures are cursive and appear to be the names of the jury members listed on the left: Ekrem Gürel, Atalay Sökmen, Faik Ahmet Ayaz, and Ali Ömer Üçler.

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ.
Enstitü Müdürü**

ÖNSÖZ

“*Thymus leucotrichus* HAL.(Lamiaceae)’ın mikroçoğaltımı, rozmarinik asit ve uçucu yağ içeriğinin araştırılması” adlı bu araştırma Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda ‘Doktora Tezi’ olarak hazırlanmıştır.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmanın her aşamasında yardımlarını ve ilgisini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Atalay SÖKMEN’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezin hazırlanması ve verilerin değerlendirilmesi noktasında bilgi ve birikimlerini esirgemeyen, tez izleme çalışmalarımı titizlikle takip eden sayın hocam Prof. Dr. Ahmet Faik AYAZ ve sayın hocam Prof Dr. Ali Ömer ÜÇLER’e teşekkürlerimi sunarım.

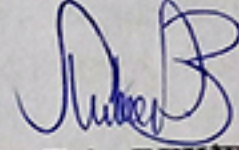
Örneklerin teşhisi noktasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Mutlu GÜLTEPE’ ye, tüm öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen annem Çağlayan YAPAR, babam İbrahim YAPAR ve ablam Zeynep YAPAR ÇETİN ’e, tezin her aşamasında benim kadar emeği olan, her türlü deneyim ve tecrübesini benimle paylaşan canım arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Mustafa CÜCE ’ye, ve özellikle birlikte her türlü zorluğa göğüs gerdiğim yol arkadaşım, eşim Çağrı BEKİRCAN’a ve hayatımın renkleri kızım Azra BEKİRCAN ve oğlum Alp BEKİRCAN ‘a teşekkür ederim.

Tuba BEKİRCAN

Trabzon 2017

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum "*Thymus leucotrichus* HAL.(Lamiaceae)'in mikroçoğaltımı, rozmarinik asit ve uçucu yağ içeriğinin araştırılması" başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Atalay SÖKMEN 'in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırıldığımı, 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. 19/06/2017



Tuba BEKİRCAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ	X
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Thymus Cinsine Ait Türler ile Yapılan Mikroçoğaltım Çalışmaları.....	10
1.3. Thymus Cinsinin Genel Özellikleri.....	11
1.3.1. <i>Thymus leucotrichus</i> HAL'ın Sistematikteki Yeri	11
1.4. Çalışmanın Amacı	13
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	14
2.1. Materyal ve Kullanılan Ekipman.....	14
2.1.1. Bitki Materyali.....	14
2.2. Besi Ortamlarının Hazırlanması	15
2.3. Başlangıç Kültürlerinin Belirlenmesi	15
2.4. Sürgün Çoğaltımı İçin Uygun Sitokinin Derişiminin Belirlenmesi	16
2.5. Kök Gelişimi İçin Uygun Oksin Derişiminin Belirlenmesi	17
2.6. Fenilalanin, Tirozin ve N-asetilsistein Derişimlerinin Sürgün Gelişimine Etkisi	17
2.7. Sukroz Derişiminin Sürgün Gelişimine Etkisi	17
2.8. Rozmarinik Asit Miktarının Belirlenmesi	18
2.9. Uçucu Yağ İçeriğinin ve Miktarının Belirlenmesi	18
2.10. İstatistiksel Analizler	19
3. BULGULAR.....	20
3.1. Temel Besi Ortamlarının Çimlenme ve Büyümeye Etkisi	20
3.2. Uygun Yüzey Sterilizasyon Süresinin Belirlenmesi.....	22
3.3. Sürgün Çoğaltımı İçin Uygun Sitokinin Derişiminin Belirlenmesi	23

3.3.1.	BAP Derişimlerinin Sürgün Çoğaltımı Üzerine Etkisi	23
3.3.2.	2iP Derişimlerinin Sürgün Çoğaltımı Üzerine Etkisi.....	25
3.3.3.	Kinetin Derişimlerinin Sürgün Çoğaltımı Üzerine Etkisi	27
3.3.4.	TDZ Derişimlerinin Sürgün Çoğaltımı Üzerine Etkisi.....	28
3.4.	Oksin Uygulamalarının Kök Oluşumuna Etkisi.....	30
3.4.1.	IBA Derişimlerinin Kök Oluşumuna Etkisi	30
3.4.2.	IAA Derişimlerinin Kök Oluşumuna Etkisi	31
3.4.3.	NAA Derişimlerinin Kök Oluşumuna Etkisi	32
3.5.	Fenilalanin, Tirozin ve N-asetil sisteinin Büyüme ve Gelişme Üzerindeki Etkileri	35
3.5.1	Fenilalanin Derişiminin Sürgün Oluşumuna Etkileri	36
3.5.2.	Tirozin Derişiminin Sürgün Oluşumuna Etkileri.	36
3.5.3.	N-asetilsistein Derişiminin Sürgün Oluşumuna Etkileri	37
3.6.	Sukroz Derişiminin Sürgün Oluşumuna Etkileri.....	38
3.7.	Rozmarinik Asit Miktarları.....	40
3.7.1.	BBD'lerin Rozmarinik Asit Miktarına Etkileri	40
3.7.2.	Fenilalanin, Tirozin ve N-asetil Sisteinin Rozmarinik Asit Miktarına Etkileri	41
3.7.3.	Sukroz Derişimlerinin Rozmarinik Asit Miktarına Etkileri	42
3.8.	Uçucu Yağ İçeriğine Etki	43
3.8.1.	BBD'lerin Uçucu Yağ İçeriğine Etkisi.....	43
3.8.1.1.	Sitokininlerin Uçucu Yağ İçeriğine Etkisi.....	43
3.8.1.2.	Oksinlerin Uçucu Yağ İçeriğine Etkisi.....	43
3.8.1.3.	Fenilalanin, Tirozin ve N-asetil Sisteinin Uçucu Yağ İçeriğine Etkileri.....	46
3.8.1.4.	Sukroz Derişimlerinin Uçucu Yağ İçeriğine Etkisi	48
4.	TARTIŞMA.....	49
5.	SONUÇLAR.....	57
6.	ÖNERİLER.....	60
7.	KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ		

Doktora Tezi
ÖZET

Thymus leucotrichus HAL. (Lamiaceae) MİKROÇOĞALTIMI, ROZMARİNİK ASİT VE
UÇUCU YAĞ İÇERİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Tuba BEKİRCAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Atalay SÖKMEN
2017, 71 Sayfa

Bu çalışmanın amacı, *in vitro* yetiştirilen *Thymus leucotrichus* Hal. in farklı derişimlerde bitki büyüme düzenleyicileri, fenilalanin, tirozin ve N-asetilsistein ve sukroz uygulamaları ile büyüme/gelişme, rosmarinik asit ve uçucu yağ içeriğine etkisini incelemektir. Bu amaca uygun olarak, başlangıçta tohumlar, 4 farklı besi ortamına ekilmiş ve en etkin besi ortamının MS ortamı (%56,66) olduğu saptanmıştır. Yapılan BBD çalışmalarında, en etkin sitokinler 1 mg/L kinetin ve 2 mg/L 2iP olarak belirlenirken, 0,5 mg/L IBA en etkili oksin olarak saptanmıştır. BBD gruplarında yetiştirilen fidelerdeki en yüksek rosmarinik asit içeriği 16,18 mg/g kuru ağırlık değeri ile 0,1mg/L NAA içeren uygulama grubunda gözlenmiştir. BBD uygulamalarının sonucunda en yüksek timol içeriği 0,1 mg/L IAA denemesinde % 69,26 ile, en yüksek karvakrol içeriği ise 0,1 mg/L TDZ grubunda % 12,53 değerle gözlenmiştir. Doğal fidelerin aksine, BBD uygulaması ile timokinon varlığı saptanmamıştır. Bu değerli kimyasal madde, 2 mg /L NAA uygulamasında % 26,9'a kadar yükselmiştir. Çalışmanın ikinci basamağında ise, belirlenen kontrol ortamına ayrı ayrı 10, 50, 100 mg/L derişimlerinde fenil alanin, tirozin ve N-asetilsistein ilave edilmiş ve büyüme/gelişme, rosmarinik asit ve uçucu yağ içeriğine etkileri gözlenmiştir. En yüksek sürgün uzunluğu 40,13 mm değeri ile 10 mg/L fenilalanin uygulamasında gözlenirken, 10 mg/L NAC denemesinin yaş (212 mg) ve kuru (25,3 mg) ağırlık parametrelerinde en etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bu deneyler arasından, rosmarinik asit üretiminde en etkili uygulama 10 mg/L NAC (16,28 mg/g kuru ağırlık) olmuştur. Sukroz denemesinde ise büyümeyi en çok teşvik eden derişim %3 olurken, rosmarinik asit üretimini en çok arttıran uygulama 19,10 mg/g kuru ağırlık değeri ile %4 derişim grubu olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Mikroçoğaltım, *Thymus leucotrichus*, Kinetin, 2iP, Fenil alanin, N-asetilsistein, Tirozin

PhD. Thesis

SUMMARY

AN INVESTIGATION ON MICROPROPAGATION, ROSMARINIC ACID AND
ESSENTIAL OIL CONTENT OF *Thymus leucotrichus*
HAL. (LAMIACEAE)

Tuba BEKİRCAN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Atalay SÖKMEN
2017, 71 Pages,

The aim of this study was to examine the effect of different concentrations of plant growth regulators, phenylalanine, tyrosine and N-acetylcystein, sucrose on growth, rosmarinic acid and essential oil contents *in vitro* grown *Thymus leucotrichus* Hal. Seeds were planted in 4 different media and that the MS medium ($56.66 \pm 6.67\%$) was the most effective. In the BBD studies performed, IBA (0,5mg /L) was identified as the most effective auxine when the most effective cytokinins were identified as 1 mg/L KIN and 2 mg/L 2iP. The highest content of rosmarinic acid in the seedlings grown in the BBD treatment was observed at 0.1 mg/L NAA group with value of 16.18 ± 1.2 mg/g a dry weight. As a result of BBD applications, the highest thymol content was observed at 0.1 mg / L IAA applications with 69.26%, the highest carvacrol content was found in the 0.1 mg/L TDZ group with 12.53% value. In the second step of the study, phenyl alanine, tyrosine and N-acetylcysteine were added at concentrations of 10, 50 and 100 mg/L separately to the control medium and effects on growth/development, rosmarinic acid and essential oil amounts were observed. It was determined that 10 mg/L NAC application was the most effective at fresh (212 mg) and dry (25.3 mg) weight parameters, while the highest shoot length was observed at 10 mg/L phenylalanine application (40.13 mm). Furthermore, among these experiments, the most effective application for rosmarinic acid production was 10 mg/L NAC (16.28 mg/g dry weight). In the sucrose experiment % 3 sucrose was the most effective application to grow, while the most rosmarinic acid content was observed in 4% sucrose assay.

Key Words: Micropropagation, *Thymus leucotrichus*, Kinetin, 2iP, Phenyl alanine, N-acetylcysteine, Tyrosine

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

- Şekil 1. Rozmarinik asitin Biyosentez Yolu..... 6
- Şekil 2. Ülkemizde *Thymus leucotrichus* HAL'ın Yayılış Gösterdiği İller (Adana, Adıyaman, Amasya, Erzincan, Erzurum, Giresun, Gümüşhane, Malatya, Kahramanmaraş ve Tokat) 12
- Şekil 3. Farklı Sitokinin Uygulamalarında 4 Hafta Büyütülen *T. leucotrichus* Fideleri. A: BAP, Bar: 15 mm / B: 2iP, Bar: 20 mm / C:KİN, Bar: 29 mm / D:TDZ, Bar: 19 mm. (1;0,1mg/L, 2; 0,5 mg/L ,3;1 mg/L, 4; 2 mg/L). 35
- Şekil 4. Fenilalanin, Tirozin ve N-asetilsistein Uygulamalarında 4 Hafta Büyütülen *T. leucotrichus* Fideleri. A: Fenilalanin. Bar: 36 mm. (1; 10 mg/L, 2; 25 mg/L, 3; 50 mg/L, 4; 100mg/L) B: Tirozin, Bar: 30 mm / C: NAC, Bar: 32 mm (1; 10mg/L, 2; 50 mg/L ,3;100 mg/L)..... 38
- Şekil 5. Farklı Sukroz Derişimlerinde 4 Hafta Büyütülen *T. leucotrichus* Fideleri. (1; 10 g/L, 2; 20 g/L ,3;30 g/L, 4; 40 g/L, Bar: 27 mm) 39

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.	2004-2014 yılları arasındaki kekik üretimi/hasadı ve ithalat/ ihracat değerleri.....	4
Tablo 2.	Türkiye florasındaki bazı <i>Thymus</i> türlerinin uçucu yağlarında bulunan ana bileşenler.....	9
Tablo 3.	<i>Thymus leucotrichus</i> HAL'ın sistematikteki yeri.....	12
Tablo 4.	Çalışma kapsamında kullanılan temel besi ortamları ve içerikleri.....	16
Tablo 5.	<i>Thymus leucotrichus</i> tohumlarının dört farklı besi ortamlarındaki çimlenme yüzdeleri ve sürgün boyu değerleri	21
Tablo 6.	<i>Thymus leucotrichus</i> tohumların iki farklı besi ortamlarındaki çimlenme yüzdeleri ve sürgün boyu değerleri	22
Tablo 7.	<i>Thymus leucotrichus</i> tohumlarının beş farklı sterilizasyon süresindeki çimlenme yüzdeleri, sürgün boyu, kararma ve kontaminasyon değerleri.	23
Tablo 8.	Farklı BAP derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un sürgün sayısı, sürgün boyu, boğum sayısı, yaş ve kuru ağırlık değerleri.....	24
Tablo 9.	Farklı BAP derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un sürgün verim değerlerinin korelasyon analizi sonuçları.	24
Tablo 10.	Farklı 2iP derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un sürgün sayısı, sürgün boyu, boğum sayısı, yaş ve kuru ağırlık değerleri.....	25
Tablo 11.	Farklı 2iP derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un sürgün verim değerlerinin korelasyon analizi sonuçları	26
Tablo 12.	Farklı Kinetin derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un sürgün sayısı, sürgün boyu, boğum sayısı, yaş ve kuru ağırlık değerleri.....	27
Tablo 13.	Farklı Kinetin derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un sürgün verim değerlerinin korelasyon analizi sonuçları	28
Tablo 14.	Farklı TDZ derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un sürgün sayısı, sürgün boyu, boğum sayısı, yaş ve kuru ağırlık değerleri.....	29
Tablo 15.	Farklı TDZ derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un sürgün verim değerlerinin korelasyon analizi sonuçları	30
Tablo 16.	<i>Thymus leucotrichus</i> 'un farklı IBA derişimlerindeki köklenme yüzdesi, kök sayısı, kök uzunluğu ve lateral kök sayısı değerleri.....	31
Tablo 17.	<i>Thymus leucotrichus</i> 'un farklı IAA derişimlerindeki köklenme yüzdesi, kök sayısı, kök uzunluğu ve lateral kök sayısı değerleri.....	31
Tablo 18.	<i>Thymus leucotrichus</i> 'un farklı NAA derişimlerindeki köklenme yüzdesi, kök sayısı, kök uzunluğu ve lateral kök sayısı değerleri.....	32

Tablo 19.	<i>Thymus leucotrichus</i> 'un farklı IBA, IAA, NAA derişimlerindeki kök sayısı, kök uzunluğu ve sekonder kök sayısı değerlerinin korelasyon analizi sonuçları.....	33
Tablo 20.	<i>Thymus leucotrichus</i> 'un 2mg/L 2iP ve 1 mg/L kinetine ait sürgün verim değerleri ve rozmarinik asit miktarları.....	34
Tablo 21.	Farklı fenil alanin derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un sürgün verimi değerleri	36
Tablo 22.	Farklı Tirozin derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un sürgün verimi değerleri	37
Tablo 23.	Farklı N-asetilsistein derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un sürgün verimi değerleri	37
Tablo 24.	Farklı Sukroz derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un sürgün verimi değerleri	39
Tablo 25.	Farklı BBD uygulamaları ile mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un rozmarinik asit miktarları (mg/g kuru ağırlık).....	41
Tablo 26.	Fenilalanin, Tirozin ve N-asetilsistein uygulamaları ile mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un Rozmarinik Asit Miktarları.....	42
Tablo 27.	Farklı sukroz derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un Rozmarinik Asit Miktarları(mg/g kuru ağırlık)	42
Tablo 28.	Farklı sitokinin derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un uçucu yağ içerikleri..	44
Tablo 29.	Farklı oksin derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un uçucu yağ içerikleri	45
Tablo 30.	Fenilalanin, tirozin ve N-asetilsisteinin farklı derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un uçucu yağ içerikleri	47
Tablo 31.	Farklı sukroz derişimlerinde mikroçoğaltılan <i>Thymus leucotrichus</i> 'un uçucu yağ içerikleri	48

KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

%	Yüzde
µm	Mikrometre
*NO ²	Nitrik oksit
*OH	Hidroksil radikali
2iP	N6-[2-isopentenil]adenin
B5	Gamborg B5
BAP	Benzilaminopürin
BBD	Bitki Büyüme Düzenleyicisi
DCM	Diklorometan
EtOH	Etanol
g	Gram
GS-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	High pressure liquid chromatography
IAA	İndol-3-Asetik Asit
IBA	İndol-3-Bütirik Asit
IU	Uluslararası birim
KIN	Kinetin
LS	Linsmaer ve Skoog
mg	Miligram
mm	Milimetre
MS	Murashige ve Skoog besi ortamı
NAA	Naftalenasetik asit
NAC	N-asetilsistein
NaOH	Sodyum hidroksit
NIST	National Institute of Standards and Technology
OSİB	Orman ve Su işleri Bakanlığı
RA	Rozmarinik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SB	Sürgün Boyu
SH	Schenk ve Hildebrandt

SPSS	Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi
TDZ	Thidiazuron
UV	Ultra viole
vd.	ve diğerleri

1.GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Doğadaki tüm hayvanlar, bitkiler ve insanlar bir dengenin ürünüdürler. İnsanlar varoluşlarından itibaren bitkilerle ilişki içindedirler (Gezgin, 2006). İlk çağlardan kalan arkeolojik bulgulara göre insanlar, besin elde etmek ve sağlık sorunlarını gidermek için öncelikle bitkilerden faydalanmışlardır (Koçyiğit, 2005). Dünyada ticareti yapılan tıbbi ve aromatik bitkilerin % 50'si gıda, % 25'i kozmetik ve % 25'i de ilaç sanayinde kullanılmaktadır (Bağdat, 2006). Tıbbi ve aromatik bitkiler eski zamanlardan bu yana, hemen hemen tüm toplumlarda ilaç kaynağı olarak kullanılmıştır (Kumar, 2004; Patwardhan vd., 2004). Bitkisel uygulamalar, geleneksel tıbbın en yaygın kullanım şeklidir. Uluslararası marketlerde bitkisel ürünler yüksek kar getirmekte, birçok gelişmiş ülkede nüfusun %70-80'i alternatif ya da tamamlayıcı tıptan faydalanmaktadır. 2003-2004 yıllarında Batı Avrupa'da yıllık kazanç 5 milyon dolara ulaşmıştır. Çin'de 2005 'de toplam satış 14 milyon dolar, Brezilya'da 2007 bitkisel ilaç geliri ise 160 milyon dolar olmuştur. Dünya sağlık örgütü, 2050 yılında tıbbi bitkilere olan talebin 5 trilyon dolara ulaşacağını öngörmüştür (WHO, 2008). Tıbbi ve aromatik bitkilerde üretim, tüketim ve uluslararası ticaret her geçen gün daha da büyüme göstermektedir. Talepte görülen yoğun artışı karşılamak, bitkisel ilaç ve ilaçların yeni bitki kaynaklarını ortaya çıkarmak, ayrıca daha iyi ürün ve kalite için yeni stratejiler geliştirmek için araştırmalar yapılmaktadır. Bitkisel kökenli preparatlardaki tıbbi içerik ve kalite değişkenlik göstermektedir. Bu durumun genellikle kültür periyodu ve toplanma mevsiminden kaynaklandığı düşünülmektedir (Abdin vd., 2003). Ayrıca birçok bitkinin doğada büyümesi, ürün kalitesini tehlikeye atabilen patojenler ile böceklerin istilasına ve kirleticilerin kontaminasyonuna yol açar durumdadır (Bacila, 2010). Hali hazırda tıbbi bitki türlerinin sadece %10'u kültürü yapılabilmekte, geri kalan %90'ı doğadan toplanmaktadır (Julsing vd., 2007). Bitkilerin devamlı olarak doğadan toplanmaları, yıllar geçtikçe bitki türlerinin soylarının tükenmesine yönelik önemli bir tehdidi de beraberinde getirmektedir.

Günümüzde yeni bitkisel kaynaklı kimyasal maddeler için araştırma yapmak öncelikli olmalı ve biyoçeşitliliğin sürdürülebilirliğinin korunması hedef alınmalıdır. Ayrıca, tüketici ve sanayici taleplerine cevap veren kaliteli ve standart ürün için ıslah edilmiş çeşitlerin geliştirilmesi, uygun ekolojik koşulların belirlenmesi, bitkilerin doğaya

zarar vermeden zamanında toplanması, hasat sonrası işlemler ve işleme teknolojisinin belirlenmesi tıbbi ve aromatik bitkilerde üretim ve pazar olanaklarını arttıracaktır (Bayram vd., 2010).

Bitkisel drog endüstrisi tarafından karşılaşılan problemlere en verimli ve en uygun alternatif çözüm, tıbbi bitkiler ve ekstraktlarının üretimi için *in vitro* sistemlerin geliştirilmesidir (Rafique vd., 2010). Bitki doku kültürleri bu amaçlar için geliştirilmiş alternatif bir üretim tekniği olarak günümüzde yerini almıştır. Doku kültürü, bitkiden izole edilen doku (eksplant) parçasını yapay besi ortamında süresiz yaşatma tekniğidir. Hücre ve dokular bölünerek kök, yaprak, sürgün, embriyo veya tam bitki geliştirirler. Bugün, bitki doku kültürü; bitkilerin iyileştirilmesi, ıslahı ve vejetatif olarak çoğaltılan bitkilerden virüsten ari bitki üretimini de içeren dört farklı alanda ticari olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, bitki doku kültürü gelişmiş ülkelerde bitkilerin yoğun üretimine ilave olarak laboratuvarında sentezlenemeyen sekonder metabolitlerin ve doğal kaynaklardan tıbbi bileşenlerin üretiminde de kullanılmaktadır (Winkelmann vd., 2006).

Bitki doku kültürü ile bitkisel kökenli ilaç ham maddelerinin üretimi birçok avantaj sunar:

- Bitkinin kendisinin elde edilebilirliğinden bağımsız ürün tedarikinin kontrolü,
- İklim ve coğrafik bölgeden bağımsızlık,
- Mikrobiyal sistemler için kullanılan benzer programlar ile nesil (soy) ıslahı,
- Kontrollü ve optimize şartlar altında kültüre edilme,
- Zararlı herbisit ve pestisitlerin kullanımının gerekmemesi,
- Doğal substratlara benzer bileşiklerin ilavesi ile normalde bitkide sentezlenmeyen yeni bileşiklerin sentezlenmesi olasılığı (Biswas vd., 2002).

Bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak sekonder metabolitlerin üretimi son zamanlarda önemli ölçüde hız kazanmıştır. Bitki sekonder metabolitleri, “Hücre büyümesi ve çoğalmasındaki primer biyokimyasal yollarda yer almayan ancak özellikle bitkinin çevresine adaptasyonunda rol oynayan kimyasallar” olarak tanımlanmaktadır (Makkar vd., 2007). Bitkilerde sekonder metabolitlerin dağılımı, primer metabolitlere göre çok daha kısıtlıdır yani bir bileşik çoğu durumda sadece birkaç türde ya da bir tür içinde yalnız birkaç varyetede var olabilmektedir. Sekonder metabolitlerin bitki metabolizmasındaki işlevleri açık olmamasına rağmen, onların yırtıcı hayvanlara karşı savunma mekanizmasında ya da böceklerle tozlaşma için cezbedici olarak ekolojik bir role sahip olabileceği bildirilmektedir (Aydın ve Mamnadov, 2017). Ayrıca bu bileşikler, patojenlere

karşı bitkiyi korumak için antibakteriyel, antiviral ve antifungal (fitoaleksinler), öteki bitkiler için toksik ya da anti-germinatif (allelpati) olarak (Bourgoud vd., 2001) ve ışığın zararlı etkilerine karşı yaprakları korumak için UV absorblayıcılığı gibi çok önemli görevlere sahiptirler (Lin vd., 1993). Bitkinin kendisine sağladığı bu yararların yanı sıra, sekonder metabolitler insanlar için de son derece önemlidir. Son zamanlarda bitkilerden ekstrakte edilen biyoaktif bileşikler, farmasötik, tarım kimyasalları, tat ve güzel koku bileşenleri, yiyecek katkı maddesi ve pestisit olarak da kullanılmaktadırlar (Vijaya vd., 2010).

Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, kök, sürgün vb.) yapay besin ortamlarında ve mikroorganizmalardan arındırılmış şartlar altında genetik olarak birbirine benzeyen çok sayıda bitkiyi hızlı çoğaltma amacıyla kullanılan bir doku kültürü tekniğidir.

Mikroçoğaltım bitki yetiştiriciliği ve genetiği yönünden önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu avantajlar ;

- Hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal elde edilmesi
- Kitlesele üretimde üretilen bitkilerde fenotipik ve genotipik benzerlik olması
- Alışılmış yöntemlerden daha kısa kültür süresine ihtiyaç duyması
- Zor üretilen türlerin kolayca üretilmesi
- Seçilen belirli üstün genotiplerin hızlı üretimi
- Üretimde daha az verici (donör) kullanılması
- Kısa sürede daha fazla bitki eldesi (Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Türkiye sahip olduğu coğrafi konumundan, fiziki ve jeolojik anlamda bir geçit bölgesinde bulunmasından dolayı oldukça zengin bir bitkisel çeşitliliğe sahiptir. Türkiye'nin sahip olduğu bu biyolojik zenginlik kendisine küçük bir kıta özelliği katmaktadır. Türkiye florasında 174 familyaya ait 1251 cins ve 12.000'den fazla tür ve türaltı taksonu (alt tür ve varyete) bulunmaktadır. Ayrıca birçok bitkininde gen merkezi konumundadır (Kendir ve Güvenç, 2010). Ülkemiz biyoçeşitlilik açısından bu denli zengin bir içeriğe sahip olmasına karşın, doğal kaynakların biyoteknolojik yöntemlerle üretilip, daha yüksek oranda verim elde edilmesine yönelik çalışmalar açısından istediği noktaya henüz ulaşamamıştır. Doğal yetiştirme potansiyeline sahip ve ekonomik açıdan değer taşıyan

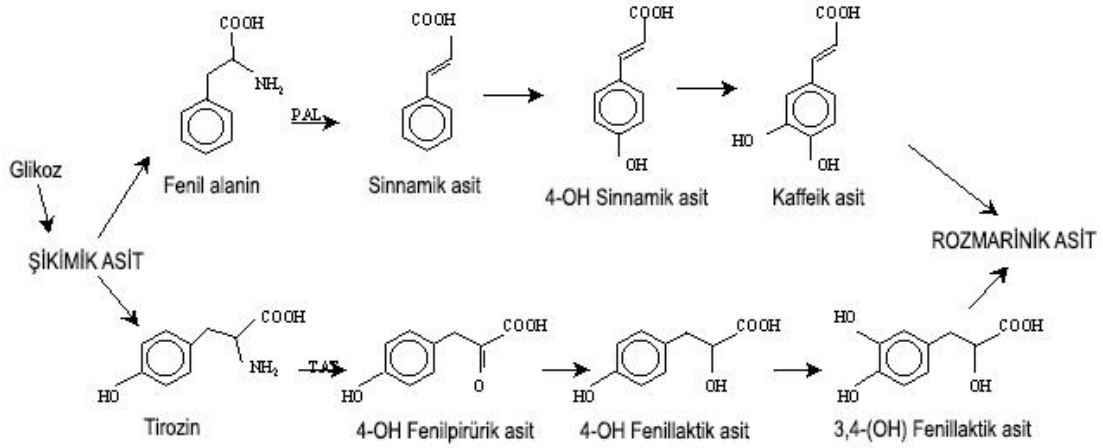
pek çok bitkisel kaynağın yurt dışında üretilen ve daha yüksek verim potansiyeline sahip kaynaklardan karşılanması ülkemizde yapılacak biyoteknolojik araştırmaları zorunlu kılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ülkemiz bitkisel kaynaklarının bilim dünyasına kazandırılması bağlamında çok önemli yaklaşım olmanın ötesinde, bu kaynakların verimli ve akılcı değerlendirilmesi yönünden de çok önemlidir. Türkiye florası tıbbi ve aromatik bitkilerce zengin Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyası için önemli bir gen merkezidir. Bu familya, Türkiye’de toplam 731 takson, 546 tür ve 45 cins ile temsil edilmektedir. Familyadaki endemizm oranı %44,2’dir. Bu veriler ülkemizin aromatik bitkilerinin ihracatında neden ön sıralarda yer aldığını da açıklar niteliktedir. Örneğin, kekik dünyada üretim ve tüketimi sınırlı olan bir bitkidir ve dış ticaret hacmi 10 bin ton civarındadır. Türkiye, dünyada en fazla kekik ihraç eden ülke olup, dünya yıllık kekik talebinin 6-7 bin tonunu tek başına karşılamaktadır. Orman ve Su İşleri Bakanlığı denetiminde olan alanlarda kekik toplanma kapasitesinin alan ve miktar olarak, 97.468 ha ve 3.800 ton olduğu tahmin edilmektedir (OSİB, 2015). Mevcut verilerde tarlada üretilen ve doğadan toplanan kekiğin ancak ihraç edilen miktar kadar olması, hatta bazı yıllar ihraç edilen miktarın da altında görülmesi, istatistiklerin üretimi tam olarak yansıtmadığını göstermektedir. Yurt içi tüketim ve uçucu yağ üretiminde kullanılan miktar da göz önüne alındığında Türkiye kekik üretiminin 20 bin ton civarına ulaştığı tahmin edilmektedir.

Tablo 1. 2004-2014 yılları arasındaki kekik üretimi/hasadı ve ithalat/ihracat değerleri

Yıl	İhracat				İthalat	
	Tarladan Hasat (Ton)	Doğadan Toplama (Ton)	Miktar (Ton)	Değer (1000\$)	Miktar (Ton)	Değer (1000\$)
2004	7.000	1.225	9.776,99	16.733,27	45,1	86,23
2005	6.400	0.974	10.424,51	17.882,55	67,85	159,02
2006	7.979	0.892	12.201,96	22.608,24	320,06	497,16
2007	5.350	3.863	11.308,3	39.493,28	2.340,82	4.455,7
2008	10.082	2.050	9.682,73	42.877,56	850,74	2.485,83
2009	12.329	1.176	11.474,66	28.662,42	460,37	1.198,23
2010	11.190	1.412	12.957,01	28.137,77	985,41	2.148,41
2011	10.953	0.971	13.158,51	29.854,12	911,74	1.851,86
2012	11.598	1.786	13.964,41	39.916,64	1.687,97	3.341,97
2013	13.658	1.875	14.813,27	56.315,88	1.695,37	4.303,7
2014	11.752	2.493	15.583,14	60.050,88	1.360,19	3.654,24

Türkiye’de halk arasında *Origanum*, *Thymus* ve *Satureja* cinsi türleri kekik olarak bilinmekte ve isimlendirilmektedir (Başer vd., 1994). Günümüzde kurutulmuş ya da uçucu yağı elde edilerek baharat, çay, deterjan, kozmetik sanayi, aromaterapi, tat ve koku verici, gıdalarda bozulmaya karşı doğal koruyucu madde (antimikrobiyal ve antioksidan) olarak birçok alanda sıkça kullanılan bu türlerin antropojenik etkilerden etkilenmemesi de kaçınılmaz bir sonuçtur (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011). Kültürü yapılan aromatik bitkiler üzerinde iklimsel ve çevresel etkenler (zararlılar, herbivorlar, antropojenik), üründe nitel ve nicel değişimlere yol açması standart üretim üzerine en büyük engeli teşkil etmektedir. Aynı durum doğal olarak yetişen bitkiler için de geçerlidir. Buna ilaveten bu bitkilerin aşırı toplanması popülasyonlarında ciddi erozyonlara sebep olmaktadır (Uçar ve Turgut, 2009). Oysa güncel teknolojilerden yararlanılarak bu handikapların üstesinden gelinebilir. Bu bağlamda bitki doku ve hücre kültürü teknikleri kullanılarak bu bitkilerin mikroçoğaltımı gerçekleştirilebilir, değerli bileşikleri biyoteknolojik olarak üretilebilir veya bu değerli bileşiklerin miktarlarında bitki biyoteknolojisi yöntemleriyle önemli derecede iyileştirme yapılabilir (Mary, 2005). Aromatik bitkilerin doku ve hücre kültürlerinin başlatılması, mikroçoğaltımı ve sekonder metabolitlerinin *in vitro* üretimi ve bu ürünlerin miktarlarında artış sağlanması ile ilgili çalışmalar noktasında çok fazla boşluk olduğu açıktır (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2005).

Sekonder metabolitler pek çok alanda olduğu gibi tıbbi olarak da çok fazla kullanım potansiyeline sahiptir ki bu anlamda önemli sekonder metabolitlerden biri de yüksek antioksidan ve yangı giderici etkiye sahip olan rozmarinik asittir (RA). Aromatik amino asitlerden fenilalanin ve tirozin öncülüğünde sentezlenen rozmarinik asit, kaffeik asit ve 3,4-dihidroksifenillaktik asitten türevlenir.



Şekil 1. Rozmarinik asitin Biyosentez Yolu.

RA sahip olduğu özelliklerinden dolayı kozmetikten gıda sanayisine kadar çok geniş kullanım alanına sahiptir (Peterson vd., 2003). RA'in antioksidan kapasitesinin E vitamini (Lin vd., 2002) ve trolokstan daha fazla olduğu gösterilmiştir (Lu, 2002). RA ile yapılan *in vitro* biyolojik aktivite çalışmalarında, antibakteriyel, antialerjik, antioksidan, antikarsinojenik ve anti-HIV1 gibi antiviral etkileri ortaya konulmuştur (Huang ve Zheng, 2006, Swarup vd., 2007). Bazı *in vivo* çalışmalarda ise RA'in antialerjik, antitrombotik ve antikarsinojenik özellikleri gösterilmiştir (Sanbongi vd., 2004, Osakabe vd., 2004, Lee vd., 2007). Rosmarinik asidin esas kaynak bitkisi biberiye (*Rosmarinus officinalis*) olmasına rağmen, bu bileşiğe karşı artan talebi karşılamak amaçlı çalışmalar, Lamiaceae familyasına ait pek çok bitki ile devam etmektedir. (Shekarchi vd., 2012). Pek çok çalışmanın amacı bitkilerin sahip olduğu RA miktarlarının artırılmasıdır. Bu sebep ile çeşitli öncüller veya kimyasallar besi ortamına eklenerek RA miktarına etkileri incelenmiştir. Örneğin 2012 yılında Tortosa ve arkadaşları, *Thymus membranaceus* 'un *in vitro* kültürlerinde fideciklere salisilik asit uygulayarak RA'ı arttırmayı hedeflemiştir (Pérez-Tortosa vd., 2012). Bir diğer araştırmada ise *Nepeta cataria* bitkisinin kök kültürlerine oksin ve poliamin muamelesinin büyüme ve RA üretimine etkisi araştırılmıştır (Yang vd., 2010). Tepe ve Sökmen'nin 2007 yılında yaptıkları araştırmada *Satureja hortensis* kallus kültürlerinde RA üretimi ve optimizasyonu hedeflenmiştir (Tepe ve Sokmen, 2007).

Bu tez çalışmasında da *T. leucotrichus*'un *in vitro* üretimi ve ayrıca farklı uygulamalardan elde edilen bitkilerin RA üretim potansiyellerini belirlemek amacı ile farklı denemeler kurulmuştur. Çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri, farklı sukroz derişimleri, besi ortamına ilave edilen fenil alanin, tirozin ve N-asetil sistein kimyasalları

ve bunların farklı derişimleri Murashige ve Skoog temel besi ortamında denemeye tabi tutulmuştur. Denemelerde kullanılan fenilalanin ve tirozin RA biyosentezinin başlangıç bileşikleridir. N-asetilsistein (NAC) ise mukolitik ve antioksidan özellikleri için kullanılan bir kimyasaldır. NAC azot atomuna bağılı bir asetil grubuna sahip bir sistein türevidir ve $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{NO}^2$ and CO_3^- gibi aşırı oksitleyici radikallerle kolayca reaksiyona girer, ayrıca redoks-aktif metal iyonlarını da bağlayabilir (Samuni vd., 2013). NAC 'ın, reaktif oksijen türlerini temizleme ve hücreseel GSH seviyesini yükseltme gibi özellikleri üzerinde çalışmalar mevcuttur (Aruoma vd., 1989, Hoffer vd., 1996). Yapılan çalışmalar ile NAC proteinlerinin bitkilerde doğal olarak bulunduğunu ve savunma sistemlerinin kilit bir parçası olduğı kanıtlanmıştır (Wang vd., 2016). NAC proteinleri, biyotik (patojen saldırısı) ve abiyotik (tuz, sıcaklık, kuraklık) stres koşullarında strese cevap sürecine dahil olurlar. Ayrıca hücre bölünmesi (Kim vd., 2006), embroyo gelişimi (Duval vd., 2002), yaprak senesensi (Breeze vd., 2011) vasküler damarlanma (Yamaguchi vd., 2010), tohum gelişimi (Sperotto vd., 2009), sekonder kök gelişimi (Xie vd., 2000) ve sürgün apikal meritem oluşumu (Kim vd., 2008) gibi gelişimsel süreçlerde de etkinlik gösterdiği kanıtlanmıştır.

Doku kültürleri ile üretimi hedeflenen bir diğere bileşen grubu ise uçucu yağlardır. Kullanım alanlarının başında kozmetik, ilaç, gıda sanayi, aromaterapi ve fitoterapi gelmektedir (Silva vd., 2003). Uçucu yağlar eski çağlardan günümüze kadar pek çok tedavide kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadırlar. Halk tıbbında kullanılma amaçları esas alınarak bu ilaçlar üzerinde yapılan farmakolojik araştırmalar sonucunda bazı biyolojik etkileri bilimsel olarak da açıklanmıştır (Perry vd., 2003). Uçucu yağlar zencefilde kök-rizom, tarçında gövde ve kabuk, nane ve defnede yaprak, gül ve yaseminde çiçek, limon ve portakalda meyve kabuğı kısmında, lavanta ve kekikte bitkinin tüm kısımlarında olmak üzere bitkilerin farklı kısımlarında bulunabilirler.

Bugüne kadar uçucu yağlarda 3000'den fazla kimyasal bileşenlerin bulunduğı gösterilmiştir ki, bunların en önemlileri terpenler, fenilpropanlar vs. dir (Bakkali vd., 2008). Ayrıca su buharında uçucu olan çok sayıda azot ve kükürt içeren bileşiklerin varlığı da görülmüştür. Bu maddeler fizyolojik etkileri nedeni ile bazen tek tek veya bazen de karışım şeklinde terapide kullanılmaktadırlar. Belirtilen bu yağların antibakteriyel (Başer vd.,2006), antiviral (Duschatzky vd., 2005), antifungal (Soylu vd., 2006), antienflamatuvar, antiseptik, antioksidan, sindirim uyarıcı, antiparazitik (Pessoa vd., 2002), insektisidal (Cheng vd., 2007) özellikleri bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar, bu

bileşiklerin antibiyotiklere karşı direnç kazanmış mikroorganizmaların elimine edilmesinde kullanılabilirliği üzerine yoğunlaşmıştır (Essawi ve Srour, 2000).

Thymus türünün uçucu yağ içeriği çalışılmış ve dolayısı ile çok sayıda makale literatürde yer almıştır. 2002 yılı sonuna kadar uçucu yağ profilleri ortaya çıkarılmış 270 *Thymus* türünden bahsedilmektedir (Stahl-Biskup, 2002). Bu derlemeye göre, *Thymus* türlerinin elde edilen uçucu yağlarda saptanan terpenoid uçucu bileşikler büyük ölçüde monoterpenlerdir. Seskiterpenler de uçucu yağlarda genellikle mevcut olmakla beraber, miktarları %10'u geçmemektedir. Timol ve karvakrol hem değeri hem de miktarı bakımından en çarpıcı fenolik terpenlerdir (Stahl-Biskup, 2002). Bazı Lamiaceae türlerinin (*Origanum*, *Satureja* türleri) uçucu yağlarında da timol ve karvakrol bulunmasına rağmen *Thymus* türlerinin bu bileşikler bakımından kaynak bitki olduğu söylenebilir. Yine uçucu yağlarda iki monoterpen hidrokarbon; para simen (*p*-simen) ve gama-terpinen (γ -terpinen) timol ve karvakrolden ayrı düşünülmemektedir. Zira γ -terpinen aromatik monoterpenlerin başlangıç materyalidir ve sonrasında anahtar ara ürün *p*-simen oluşur. Timol ise bu yolda son üründür. Özetle bu dört monoterpenin biyogenetik yollarda birbirleriyle ilişkili olduğu ve *Thymus* uçucu yağlarının ana bileşenleri olduğu söylenebilir (Kokkini, vd., 1997). Ancak bu genellemeye uymayan uçucu yağlar da görülebilir (Tablo 2). Türkiye florasında yabani olarak yetişen bazı *Thymus* türlerinin uçucu yağlarında bulunan ana bileşenler Tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 2. Türkiye florasındaki bazı *Thymus* türlerinin uçucu yağlarında bulunan ana bileşenler

Kaynak Bitki	Uçucu Yağın Ana Bileşenleri	Kaynak
<i>T. argaeus</i> Boiss. ve Bal.	linalool %26,6, linalil asetat %19,5, borneol %15,0, geraniol, nerol	Sezik ve Basaran, 1986
<i>T. aznavourii</i> Velen.	germakren D %22,8, (E)- β -farnesen %16,1, α -pinen %11,1, β -karyofillen, limonen	Tümen vd., 1998
<i>T. canoviridis</i> Jalas	karvakrol %29,5, geraniol %13,3, timol, β -karyofillen, geranil asetat	Baser vd., 1998
<i>T. fallax</i> Fisch. ve Mey.	karvakrol %68,1, timol, p -simen, β -karyofillen, γ -terpinen	Tümen vd., 1999
<i>T. eigii</i> M. Zohary ve P.H. Davis	timol %30,6, karvakrol %26,1 ve p -simen %13,0	Tepe vd., 2004
<i>Thymus sipyleus</i> subsp. <i>sipyleus</i> var. <i>sipyleus</i>	borneol %11,2, α -muurolol %9,2, β -karyofillen %7,6, geranial %7,3 ve neral %5,4.	Tepe vd., 2005
<i>Thymus sipyleus</i> subsp. <i>sipyleus</i> var. <i>rosulans</i>	karvakrol %58,1, timol %20,5 p -simen %4,1 ve γ -terpinen %4,4	Tepe vd., 2005
<i>Thymus pectinatus</i> Fisch. ve Mey. var. <i>pectinatus</i>	timol %49,8, γ -terpinen %16,1, p -simen %14,8, karvakrol %3,7	Vardar-Ünlü vd., 2003
<i>Thymus spathulifolius</i>	timol %36,5, karvakrol %29,8, p -simen %10,0 ve c -terpinen %6,3	Sökmen vd., 2004
<i>T. praecox</i> Opiz subsp. <i>grossheimii</i> (Ronn.) Jalas var. <i>grossheimii</i>	timol %26,6, p -simen %24,9, α -pinen, α -terpinil asetat, β -karyofillen	Baser vd., 1996
<i>Thymus praecox</i> subsp. <i>caucasicus</i> var. <i>caucasicus</i>	timol %47,45, γ -terpinen %8,7, p -simen %8,30, terpinil asetat %4,88 ve karvakrol %4,60	Sekeroğlu vd., 2007
<i>T. pseudopulegioides</i> Klokov et Des.-Shost.	timol %50,1, karvakrol %10,7, p -simen %10,7, γ -terpinen, karvakrol ve linalool %21,6, α -terpinil asetat %16,7, geraniol %11,2	Baser vd., 1999
<i>T. transcaucasicus</i> Ronn.	timol %36,6, p -simen %15,7, karvakrol, γ -terpinen, borneol	Kasumov ve Gavrenkova, 1985

Yapılan çeşitli araştırmalar, bitkilerin uçucu yağ profillerinin ve miktarlarının, *in vitro* çalışmalarla doğal kaynak bitkiden farklılık gösterdiği yönündedir. Örneğin 2015 yılında, endemik bir bitki olan *Thymus moroderi* *in vitro* ortamda büyütülmüş ve doğalıyla

kıyaslanmıştır. Çalışma sonuçları incelendiğinde, doğada yetişen bitkilerde gözlenmez iken *in vitro* büyütülen fidelerde karvakrol saptanmıştır (Marco-Medina ve Casas, 2015). Başka bir örnek ise, *in vitro* ortamda büyütülen *Salvia stenophylla* fideciklerinde β -karyofilen ve cis- α -bisabolen üretilirken, doğal olan numunelerde bu bileşikler gözlenmemiştir (Musarurwa vd., 2010).

1.2. *Thymus* Cinsine Ait Türler ile Yapılan Mikroçoğaltım Çalışmaları

Thymus cinsine ait bitkiler çok yıllık aromatik bitki türleridir ve dünya genelinde çeşni olarak kullanımının yanı sıra süs bitkisi olarak da değerlendirilir. Bu cinse ait türlerin sahip olduğu flavonlar, rozmarinik asit, karbohidratlar ve özellikle uçucu yağ gibi değerli bileşenler araştırmacıların dikkatini çekmektedir (Stahl-Biskup vd., 2009). Çalışma alanlarından biri de mikroçoğaltım yolu ile *Thymus* türlerinin hızlı ve etkin bir biçimde üretimi ve sahip oldukları değerli kimyasalların arttırılmasına yöneliktir. Örneğin 2013 yılında *Thymus hyemalis* ile yapılan araştırmada, BBD'lerin çeşit ve miktarlarının, karbon kaynağının, genotip ve çevresel faktörlerin bu türün mikroçoğaltımına etkisi araştırılmıştır (Aicha vd., 2013). *T. lotocephalus* ile yapılan başka bir araştırmada ise tohumlar çeşitli oranlardaki MS besi ortamına ekilmiş ve sürgün ve kök oluşumu hedeflenmiştir (Coelho vd., 2012). Aynı türün mikroçoğaltımla elde edilen fideleri ile doğal olanları serbest radikal temizleme ve Fe^{+2} şelatlama alanlarında kıyaslanmış ve ikiside aynı etkinliği göstermiştir. Ancak *in vitro* ile üretilen fidelerin rozmarinik asit içeriğinin doğal olanlardan daha fazla olduğu saptanmıştır (Costa vd., 2012). Çeşitli yöntemlerle mikroçoğaltım yolu ile elde edilen sürgünlerin uçucu yağ içerikleri ile aynı türlerin doğal olanları ile kıyaslandığı çalışmalar da mevcuttur. Örneğin *T. caespitius* mikro çoğaltımı yapılmış ve uçucu yağ içerikleri doğal fidelerle karşılaştırıldığında pek bir farklılık gözlenmemiştir (Mendez vd., 2013). Fakat *T. moroderi* ile yapılan çalışmada ise *in vitro* yetişen fidelerin uçucu yağ içerik ve miktarları doğal olanlardan çeşitli farklılıklar göstermiştir (Marco-Medina ve Casas, 2015).

Bu çalışmada hedef alınan *Thymus leucotrichus* HAL.'ın *in vitro* çoğaltımı ve bileşenlerinin incelenmesi bakımından benzerlik gösteren herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Sadece doğal ortamdaki toplanan *T. leucotrichus* fidelerinden elde edilmiş uçucu yağların antimikrobiyal, antioksidan (Sarıboğa ve Korkmaz, 2009, Ulukanlı vd.,

2011) ve antifidant (Bekircan vd., 2014) aktivitelerini incelemek amaçlı birkaç çalışma mevcuttur.

1.3. *Thymus* Cinsinin Genel Özellikleri

Thymus, yaklaşık 220 cinsi barındıran *Lamiaceae* familyası içinde tür sayıları göz önüne alındığında en önemli 8 cinsten biridir. Ancak bu sayı taksonomik bakış açısına göre değişebilir. Dünya genelinde bir kaynağa göre 300' den fazla (Könemann, 1999), diğer bir kaynağa göre ise 215 tür (Morales, 2002) *Thymus* cinsi altında sınıflandırılmıştır. *Thymus* türleri bu familyanın tipik özelliklerini yansıtır, kozmopolitler ve tipik Akdeniz elemanlarıdır (Seçmen vd., 2000). Uçucu yağ içerikleri bakımından zengin önemli türler ihtiva etmekle beraber, tüm türlerin kayda değer uçucu yağ içerdikleri söylenemez. Her dem yeşil, otsu ve/veya çalimsı formdadırlar ve Güney Akdeniz ve Asya'nın tipik bitkileridir. Ayrıca Kuzey Afrika'da da yayılış gösterirler (Könemann, 1999). Küçük çalılar, yastiksı 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 leucotrichus* HAL'ın Sistematikteki Yeri

Ülkemizde, Adana, Adıyaman, Amasya, Erzincan, Erzurum, Giresun, Gümüşhane, Malatya, Kahramanmaraş ve Tokat illeri civarında yayılış gösteren (Şekil 2) *T. leucotrichus* HAL. *Lamiaceae* familyasına ait bir bitki türüdür (Tablo 3). Dağ stepleri ve kayalık yamaçlarda yayılıma sahip bu tür çok yıllık ve çalı formunda bir bitkidir. (URL 1). Yetiştigi bölgelerde yöre halkı tarafından dağ kekiği olarak adlandırılan bu bitki, özellikle kış aylarında çay olarak tüketilir.

Tablo 3. *Thymus leucotrichus* HAL'ın sistematikteki yeri

Alem	: Plantae
Alt Alem	: Tracheobionta
Bölüm	: Magnoliophyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Alt Sınıf	: Asteridae
Takım	: Lamiales
Familya	: Lamiaceae
Cins	: <i>Thymus</i>
Tür	: <i>Thymus leucotrichus</i> HAL



Şekil 2. Ülkemizde *Thymus leucotrichus* HAL'ın Yayılış Gösterdiği İller (Adana, Adıyaman, Amasya, Erzincan, Erzurum, Giresun, Gümüşhane, Malatya, Kahramanmaraş ve Tokat (URL 1.)

1.4. Amaç

Tez çalışması kapsamında, çeşitli sitokininler, sitokinin benzeri thidiazuron ve oksinler ile desteklenmiş temel besi ortamlarında *T. leucotrichus* HAL.'ın mikroçoğaltımı, *in vitro* koşullarda oluşturulan fideler ile doğal ortamlardan toplanan bitkilerin rozmarinik asit içeriğinin, uçucu yağ bileşenlerinin ve miktarlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca fenilalanin, tirozin, N-asetilsistein ve sukroz denemeleri için farklı konsantrasyon grupları oluşturulmuş ve bu koşullarda *in vitro* büyütülen fidelerin de büyüme ve gelişme parametreleri, rozmarinik asit miktarı ve uçucu yağ profilleri doğal ortamlardan elde edilen fidelerle karşılaştırılmıştır. *Thymus leucotrichus* HAL. bitkisinin *in vitro* doku kültürleri ile çoğaltımı ve rozmarinik asit içeriği ve uçucu yağ profilinin incelendiği detaylı bir çalışma hakkında literatür bilgisi bulunmamaktadır.

Bu amaç doğrultusunda sürgün boyu, sürgün sayısı, boğum sayısı, kök sayısı, kök uzunluğu, sekonder kök sayısı, köklenme yüzdesi, yaş ve kuru ağırlık bazında biyokütle parametreleri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Rozmarinik asit miktarları HPLC yöntemi ile belirlenirken, uçucu yağ bileşenleri ve miktarları GS-MS analiziyle aydınlatılmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal ve Kullanılan Ekipman

Bu araştırmada, *T.leucotrichus* 'un doku kültürü yöntemleri ile üretimi (mikroçoğaltım), değerlendirilmesi, rozmarinik asit miktarının araştırılması ve uçucu yağ profillerinin ortaya konulması üzerine çalışmalar yapılmıştır. Deneysel tasarımda, *Thymus* türlerinin doku kültürleri ile çoğaltımı hususunda yapılan ve literatürde varolan çalışmalardan yararlanılmıştır. Doku kültürü ile üretim çalışmaları, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi ve Biyokimyası Laboratuvarı II'de yapılmıştır. Bu çalışmada, besi ortamlarının pH'sını ayarlama MettlerToledo MP 220 marka pH metre, tartım işlemlerinde OHAUS marka hassas terazi, çözeltilerin karıştırılmasında Heidolph 1400 (Hotplate&Stirrer) marka ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, kurutma işlemlerinde Nüve FN 120 marka etüv, saf su üretilmesinde GFL 2104 marka saf su cihazı, sterilizasyon işlemlerinde Ticisan (75 litre) marka otoklav, materyallerin kültüre alınma işleminde ESCO marka laminar akışlı steril kabin, kültürlerin büyütülmesinde Sanyo marka iklim dolabı, sürgün boyu ve kök uzunluklarının ölçülmesinde BIS marka dijital kumpas kullanılmıştır. Ayrıca rozmarinik asit miktarının ve uçucu yağ profillerinin belirlenmesi amacıyla yapılan analizler Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

2.1.1. Bitki Materyali

T. leucotrichus türüne ait bitkiciklere ait lokalite çalışmaları yapılmıştır. Tohumlar 2014 yılı Ağustos-Ekim ayları arasında türe ait bitkiciklerin dağılım gösterdiği Giresun'un Şebinkarahisar ilçesi Toplukonak Köyü Dikmetaş (40° 24' 173" N, 38° 34' 945" E; 1915 m) mevkinden toplanmıştır.

Çalışma konusunu oluşturan *T. leucotrichus* bitkisi Giresun Üniversitesi Dereli Meslek Yüksek Okulu Öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mutlu GÜLTEPE tarafından teşhis edilmiştir.

2.2. Besi Ortamlarının Hazırlanması

B5, LS, MS ve SH besi ortamları, öngörülen prosedür doğrultusunda hazırlanmıştır. Karbon kaynağı olarak % 2 sukroz ve katılaştırıcı % 0,8 phytoagar ilave edilmiştir. Gerekli olanlara bitki büyüme düzenleyicisi ya da düzenleyicileri de eklenerek, çözeltilerin pH'ları 1 molar NaOH ve 1 normal HCl kullanılarak 5,5-5,6 aralığına Mettler Toledo MP 220 marka pH metre kullanılarak ayarlanmıştır. Sonrasında besi ortamları otoklavda (Ticisan) 1 atm basınçta 121°C'de 125 dakika süre ile steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besi ortamları hafifçe çalkalanarak agarın homojen olarak dağılması sağlanmış ve soğumaya bırakılmıştır. Yüksek sıcaklıkta etkisini kaybeden bitki büyüme düzenleyicileri 0,22µm çapındaki filtrelerle sterilize edilmiş ve otoklavdan sonra besi ortamı soğumadan ortama eklenmiştir. 40°C civarına kadar soğutulan besi ortamları, ESCO marka laminar akışlı steril kabin içerisinde kültür kaplarına aktarılmıştır.

T. leucotrichus tohumları ön muamele olarak 30 dk musluk suyunda yıkanmış ve akabinde 30 sn %70'lik etanol (EtOH) çözeltisi ile muamele edilmiştir. Son olarak en uygun yüzey sterilizasyon süresini belirlemek amacıyla 10, 15, 20, 25 ve 30 dk % 2'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisi ile muamele edilmiştir. Steril edilen tohumlar uygun besi ortamı çalışmalarından en iyi sonuçları veren MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Veriler 4 hafta sonunda sürgün verim oranı, sürgün boyu, kararma ve kontaminasyon parametreleri açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

2.3. Başlangıç Kültürlerinin Belirlenmesi

In vitro çalışmalarda kullanılan besi ortamları bitki türlerine göre spesifiklik göstermektedir ve çalışılması planlanan bitki türlerinden alınan eksplantların kültür ortamlarına hızlı ve sağlıklı bir şekilde aktarılması da büyük önem arz etmektedir. Yürütülen tez çalışması kapsamında *T. leucotrichus* türüne ait tohumlar en uygun besi ortamını belirlemek amacıyla Murashige ve Skoog (MS) (Murashige ve Skoog, 1962), Gamborg (B5) (Gamborg vd., 1968), Linsmaer ve Skoog (LS) (Linsmaier ve Skoog, 1965) ve Schenk ve Hildebrandt (SH) (Schenk ve Hildebrandt, 1972) besi ortamlarında herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisinin uygulanmadığı temel besi ortamlarında 30 gün süre ile kültüre alınmıştır (Tablo 4). Çalışmada kullanılan ve kültüre alma işlemi tamamlanan eksplantlar için inkübasyon ortamı olarak 24 ± 2 °C sıcaklık, 8000 lüks ışık şiddeti

($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$), 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık koşulu ile % 80 neme ayarlı iklim dolabı kullanılmıştır. 4 hafta sonunda veriler sürgün verim oranları (çimlenme yüzdesi) ve boy uzunluğu parametreleri açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4. Çalışma kapsamında kullanılan temel besi ortamları ve içerikleri

Makro Elementler (mg/L)	mg/L			
	B5	LS	MS	SH
	0,025	0,025	0,025	0,10
	0,025	0,025	0,025	0,20
	36,70	36,70	36,70	19,80
	3,00	6,20	6,20	5,00
	0,75	0,83	0,83	1,00
	10,00	16,90		10,00
	0,25	0,25	0,25	0,10
	2,00	8,60	8,60	1,00
	-	-	-	-
	-	-	-	-
	-	-	-	-
Mikro Elementler (mg/L)				
CaCl ₂	113,23	332,02	332,02	151,00
KNO ₃	2500,00	1900,00	1900,00	2500,00
MgSO ₄	121,56	180,54	180,54	195,05
NaH ₂ PO ₄	130,44	-	-	-
(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	-	-	-	-
(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	-

2.4. Sürgün Çoğaltımı İçin Uygun Sitokin Derişiminin Belirlenmesi

Bitki türleri *in vitro* çalışmalarda uygulanan sitokin çeşidine göre farklı büyüme değerleri ve farklı biyolojik olarak aktif bileşen (sekonder bileşikler) içerik değerleri vermektedirler. Bu yüzden sürgün çoğaltım aşamasında doğru sitokin çeşidinin ve derişiminin belirlenmesi zorunludur. Bu çalışmada BAP, kinetin, 2iP ve TDZ 'nin 0,1, 0,5, 1, ve 2 mg/L derişimleri denenmiş ve sürgün çoğaltımı üzerine etkisi gözlenmiştir.

2.5. Kök Gelişimi İçin Uygun Oksin Derişiminin Belirlenmesi

Kök gelişimini gözlemek amaçlı üç farklı oksin grubu denenmiştir. Başlangıç kültürlerinden alınan *T. leucotrichus*'a ait eksplantlar 0,1, 0,5, 1 ve 2 mg/L IAA, IBA ve NAA derişimlerini içeren MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Veriler 8. haftanın sonunda kök uzunluğu, kök sayısı, sekonder kök sayısı ve köklenme yüzdesi parametreleri açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

2.6. Fenilalanin, Tirozin ve N-asetilsistein Derişimlerinin Sürgün Gelişimine Etkisi

In vitro çalışmalarda uygulanan çeşitli kimyasallar bitkinin büyüme ve gelişmesine olumlu veya olumsuz katkılar sağlar. Bu süreci inceleme amaçlı, önceki çalışmalar sonucu belirlenen kontrol ortamına (2mg/L 2ip + 0,1mg/L NAA içeren MS besi ortamı), fenilalanin, tirozin ve N-asetilsisteinin 10, 50 ve 100 mg/L derişimleri eklenmiştir. Elde bulunan *T. leucotrichus* eksplantları bu derişim gruplarında ayrı ayrı alt kültür yapılarak 4 hafta sonunda sürgün boyu, sürgün sayısı, BOĞUM sayısı, yaş ve kuru ağırlık parametreleri ile büyüme ve gelişime etkileri belirlenmiştir.

2.7. Sukroz Derişiminin Sürgün Gelişimine Etkisi

Sukroz, bitki doku kültürleri için önemli bir parametredir. Her bitkinin tercih ettiği derişim aralığı farklı olabilir. Bu nedenle 10, 20, 30 ve 40 mg/L sukroz derişimlerin içeren ve önceki çalışmalar neticesinde kontrol grubu olarak seçilen 2mg/L 2ip + 0,1 mg/L NAA içeren MS besi ortamında, 4 hafta boyunca *T. leucotrichus* fideleri büyütülmüştür. Bu sürecin sonunda büyüme ve gelişme parametreleri (sürgün boyu, sürgün sayısı, BOĞUM sayısı, yaş ve kuru ağırlık) incelenmiştir.

2.8. Rozmarinik Asit Miktarının Belirlenmesi

Oda sıcaklığında ve karanlıkta kurutulan *T. leucotrichus* eksplantlarının her grubundan 0,2 g numune alınıp sırası ile hekzan, DCM ve metanol (MeOH) ile 10 dakika özütlenmiştir. Sonrasında MeOH özütü 0,45µ'luk filtrelerden geçirilerek, HPLC analizine hazır hale getirilmiştir. Ardından HPLC için 0,45µ'luk filtrelerden geçirilmiştir. HPLC cihazı (Shimadzu, Kyoto, Japan) CBM-20A iletişim modülü, LC-20AT pompa, DGU-20A5 online degazör, SIL-20A otosampler, CTO-10ASVP kolon fırını ve SPDMS20A diode dizi dedektöründen oluşmaktadır. Hareketli faz (solventA) 20 mM fosfat tamponu, pH:2,5 ve asetonitril (solventB) den oluşup akış hızı 1,5mL min⁻¹dir. Uygulanan akış programı aşağıdaki gibidir:

- 0-11 dakikalar arası %5 'ten % 8 'e
- 11-15 dakikalar arası %8'den %20 ' ye
- 15-25 dakikalar arası %20'den %80 ' e kadar artan solvent B akışı sağlanmıştır.

Enjeksiyonlar arası 10 dakika sütun dengeleme süresi uygulanmıştır. Kolon fırın ısısı 40°C'de iken 20µl örnek kolona enjekte edilmiştir. Rozmarinik asitin saptanması ve ölçümü 280 nm'de gerçekleşmiştir.

2.9. Uçucu Yağ İçeriğinin ve Miktarının Belirlenmesi

Tüm uygulama gruplarında *in vitro* büyütülen *T. leucotrichus* 'dan 1'er gr kuru örnek alınıp Headspace GC-MS analizine tabi tutulmuş ve uçucu yağ profilleri çıkarılıp % miktarları belirlenmiştir. Uçucu yağların GC-MS analizi için PAL AOC-5000 plus oto örnekleyici ve Shimadzu 2010 plus FID den oluşan Shimadzu QP2010 ultra GS-MS70 cihazı ve Shimadzu Class-5000 Chromatography Workstation programı kullanılmıştır. Kolon olarak non-polar Rtx-5MS kapiller kolon kullanılmıştır (boyutlar; 30 m x 0.25 mm, film kalınlığı; 0.25 µm). Kolon sıcaklığı dakikada 5 °C artan bir otomatik programı ile 60 °C den 240 °C ye çıkarılmıştır. Enjektör ve detektör hattı sıcaklıkları sırasıyla 250 °C ve 230°C' ye ayarlandı. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmıştır. İyonlaştırma voltajı 70 eV olarak ayarlanmıştır.

Örneklerin deneysel olarak adlandırılmaları için göreceli alikonma endeskleri ve kütle spektrumları ile GC-MS sisteminde bulunan NIST, Wiley kütüphane verileri ve ayrıca daha önce yayınlanmış literatür verileri karşılaştırılmıştır. Örneklerin göreceli yüzde oranları elektronik olarak alan yüzde verilerinden hesaplanmıştır.

2.10. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada sürgün oluşturma çalışmalarından elde edilen veriler eksplant başına sürgün verim yüzdesi, sürgün boyu, kararma ve kontaminasyon parametreleri açısından kendi aralarında ayrı ayrı analize tabi tutulmuştur. Sürgün geliştirme çalışmalarında ise yine eksplant başına sürgün verim yüzdesi, sayısı, boyu, BOĞUM sayısı, yaş ve kuru ağırlık parametrelerinde ayrı ayrı analize tabi tutulmuştur. Köklendirme çalışmalarında ise fide başına köklenme yüzdesi, sayısı, uzunluğu ve sekonder kök sayısı yüzdeleri kendi aralarında ayrı ayrı analiz edilmiştir. Ayrıca tüm deneme gruplarının rozmarinik asit içerikleri de analize tabi tutulmuştur. Tüm veriler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler (çoklu veriler) varyans analizi Statistical Package for Social Sciences (SPSS 21,0) paket programı içerisinde yer alan ANOVA'nın çok yönlü Duncan testine tabi tutulmuştur. Ölçümleri yapılan ortalama değerler arasındaki istatistiksel farklar ve benzerlikler ortaya konulmuştur ($P \leq 0,05$).

3. BULGULAR

3.1. Temel Besi Ortamlarının Çimlenme ve Büyümeye Etkisi

T. leucotrichus tohumları en uygun besi ortamını belirlemek amacıyla Murashige ve Skoog (MS), Gamborg (B5), Linsmaer ve Skoog (LS) ve Shake ve Hildebrandt (SH) besi ortamlarında herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi uygulanmadan ekilmiştir. 4 hafta sonunda veriler çimlenme yüzdesi ve boy uzunluğu parametreleri açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

En yüksek çimlenme yüzdesi %,56,66 ile MS besi ortamından elde edilirken bu değere en yakın değer %43,33 ile B5 besi ortamından elde edilmiştir. En düşük çimlenme yüzdesi ise %28,88 ile SH besi ortamından elde edilmiştir (Tablo 5). İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde en yüksek çimlenme oranı veren ortam ile en düşük çimlenme yüzdesine sahip ortam arasından istatistiksel açıdan önemli farklar gözlemlenmiştir ($P \leq 0,05$).

Çimlenme yüzdelerine paralel olarak en yüksek ve en düşük boy uzunluk değerleri sırası ile 12,70 mm ve 4,88 mm ile MS ve SH ortamlarından elde edilmiştir (Tablo 1). Yapılan istatistiksel analizler bu 4 farklı besi ortamı arasında istatistiki açıdan önemli farklar olduğunu ortaya koymuştur ($P \leq 0,05$).

Tablo 5. *Thymus leucotrichus* tohumlarının dört farklı besi ortamlarındaki çimlenme yüzdeleri ve sürgün boyu değerleri

BESİ ORTAMLARI (mg/L)	MS KONTROL	B5 KONTROL	LS KONTROL	SH KONTROL
ÇİMLENME YÜZDESİ (%)	56,66 ^a ± 6,67	43,33 ^b ± 5,77	36,66 ^{bc} ± 3,33	28,88 ^c ± 3,85
SÜRGÜN BOYU (mm)	12,70 ^a ± 0,49	8,19 ^b ± 0,37	6,44 ^c ± 0,27	4,88 ^d ± 0,19

± üç tekerrürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür sürecinin sonunda elde edilmiştir.

En uygun besi ortamının belirlenmesinden elde edilen sonuçlar LS ve SH besi ortamlarının *T. leucotrichus* tohumlarının çimlendirilmesi için uygun olmadığını göstermiştir. Bu nedenle yüksek çimlenme oranı ve boy uzunluğu değerlerini veren MS ve B5 ortamları bitki büyüme düzenleyicisi (BBD) uygulamalarında bu türün tohumlarının nasıl bir çimlenme tepkisi vereceğini belirlemek amacıyla temel besi ortamı olarak kullanılmıştır. Her iki besi ortamına 1 mg/L BAP uygulandı ve sonuçlar 30 günün sonunda çimlenme yüzdesi, sürgün boyu ve yaş ağırlık parametreleri açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

En yüksek çimlenme yüzdesi %83,27 ile MS besi ortamından elde edilmiş ve B5 ortamından elde edilen çimlenme yüzdesi ile aralarında önemli istatistiksel olarak fark oluşmuştur (Tablo 6).

Yine çimlenme yüzdesine paralel olarak en yüksek sürgün boyu değeri 15,40 ile MS ortamından elde edilmiş ve istatistiksel fark Tablo 6'de gösterilmiştir ($P \leq 0,05$). Ekonomik değer taşıyan bu tarz bitki türlerinin mikroçoğaltım çalışmalarından elde edilen madde miktarları (yaş ve kuru ağırlık miktarları) en önemli parametreler arasındadır. En uygun besi ortamını belirlemek için uygulanan BAP çalışmalarında en yüksek yaş ağırlık yine 30,7 mg ile MS ortamından elde edilmiştir (Tablo 6). Yapılan istatistiksel analizler BBD uygulamalarında yine bu iki farklı besi ortamı arasında istatistiki açıdan önemli farklar olduğunu ortaya koymuştur ($P \leq 0,05$).

Tablo 6. *Thymus leucotrichus* tohumlarının iki farklı besi ortamlarındaki çimlenme yüzdesi, sürgün boyu ve yaş ağırlık değerleri

BESİ ORTAMLARI (mg/L)	MS (1 mg/L BAP)	B5 (1 mg/L BAP)
ÇİMLENME YÜZDESİ (%)	83,27 ^a ± 7,77	60,00 ^b ± 3,34
SÜRGÜN BOYU (mm)	15,40 ^a ± 0,84	12,56 ^b ± 0,86
YAŞ AĞIRLIK (mg)	30,7 ^a ± 2,5	23,7 ^b ± 0,5

± üç tekerrürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı sütunda aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür sürecinin sonunda elde edilmiştir.

3.2. Uygun Yüzey Sterilizasyon Süresinin Belirlenmesi

T. leucotrichus tohumları uygun sterilizasyon süresinin belirlenmesi amacı ile önceden bahsedilen metodlarla muamele edilmiş ve ekimi standart MS besiyerine yapılmıştır. 4. hafta sonunda en yüksek çimlenme yüzdesi % 81,11 ile 15. dk'dan, en düşük çimlenme yüzdesi ise % 51,11 ile 30. dk'dan elde edilmiştir. Bu iki uygulama arasında % 30 oranında bir çimlenme yüzde farkı çıkarken istatistiksel fark Tablo 3'de gösterilmiştir ($P \leq 0,05$). En yüksek sürgün boyu değeri 14,63 mm ile 15. dk'dan elde edilmiştir. En düşük kontaminasyon yüzdesi % 6,66 ile 30. dk'dan elde edilirken 10 dk uygulaması hariç diğer sterilizasyon süresi uygulamaları ile aralarında istatistiksel bir fark gözlemlenmemiştir (Tablo 7). Kontaminasyon oranının bu uygulamada en düşük değeri vermesine karşın kararma oranının % 42,22 ile en yüksek değeri vermesi bu sterilizasyon süresinin bu türün tohumlarının sterilizasyonunda uygun olmadığını göstermiştir. En düşük kararma oranının % 4,44 ile 10. dk uygulamasında elde edilmesine karşın ise kontaminasyon oranının bu sterilizasyon süresinde % 26,66 ile en yüksek değeri vermesi bu sürenin de bu türün tohumlarının yüzey sterilizasyonunda uygun olmadığını göstermiştir. Elde edilen tüm bu değerler 15. dk uygulamasının bu türün tohumlarının yüzey sterilizasyonunda en etkili sterilizasyon süresi olduğunu göstermiştir (Tablo 7).

Tablo 7. *Thymus leucotrichus* tohumlarının beş farklı sterilizasyon süresindeki çimlenme yüzdeleri, sürgün boyu, kararma ve kontaminasyon değerleri.

	ÇİMLENME YÜZDESİ (%)	SÜRGÜN BOYU (mm)	KARARMA ORANI (%)	KONTAMİNASYON ORANI (%)
10 dk	68,87 ^b ± 1,93	14,21 ^{ab} ± 1,50	4,44 ^c ± 1,92	26,66 ^a ± 3,34
15 dk	81,11 ^a ± 1,92	14,63 ^a ± 1,46	8,89 ^c ± 1,93	10,00 ^b ± 0,00
20 dk	69,99 ^b ± 3,34	14,30 ^{ab} ± 1,34	21,11 ^b ± 5,09	8,87 ^b ± 1,93
25 dk	64,44 ^b ± 3,86	13,91 ^{ab} ± 1,65	26,66 ^b ± 3,34	8,87 ^b ± 1,93
30 dk	51,11 ^c ± 5,09	13,65 ^b ± 1,53	42,22 ^a ± 5,09	6,66 ^b ± 3,34

± üç tekerrürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı sütunda aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür sürecinin sonunda elde edilmiştir.

3.3. Sürgün Çoğaltımı İçin Uygun Sitokin Derişiminin Belirlenmesi

İn vitro çalışmalarda uygulanan sitokinlerin miktar ve çeşidine göre, bitkiler farklı büyüme değerleri gösterirler. Bu durum içerdikleri sekonder bileşik miktarını da etkilemektedir. Bu yüzden sürgün çoğaltım aşamasında doğru sitokin çeşidinin ve derişiminin belirlenmesi zorunludur.

3.3.1. BAP Derişimlerinin Sürgün Çoğaltımı Üzerine Etkisi

Tüm parametreler açısından tek bir BAP uygulaması en yüksek değeri vermezken parametre değerleri uygulanan derişimlerde farklılıklar göstermiştir. En yüksek sürgün sayısı ve yaş ağırlık değerleri 1 mg/L uygulamasından elde edilirken bu değerler sırası ile 3,30 adet ve 115 mg olarak hesaplanmıştır. En yüksek sürgün boyu, boğum sayısı ve kuru ağırlık değerleri ise 0,1 mg/L uygulamasından elde edilmiş ve bu değerlerde sırası ile 26,52 mm , 4,07 adet ve 19,3 mg olarak hesaplanmıştır (Tablo 8). En düşük sürgün sayısı, sürgün boyu ve boğum sayısı değerleri 2 mg/L uygulamasından, en düşük yaş ağırlık kontrol uygulamasından, en düşük kuru ağırlık değeri ise 0,5 mg/L uygulamasından elde edilmiş ve istatistiksel farklar Tablo 8’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 8. Farklı BAP derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus* 'un sürgün sayısı, sürgün boyu, boğum sayısı, yaş ve kuru ağırlık değerleri.

BAP (mg/L)	SÜRGÜN SAYISI (Adet)	SÜRGÜN BOYU (mm)	BOĞUM SAYISI (Adet)	YAŞ AĞIRLIK (mg)	KURU AĞIRLIK (mg)
0,0	2,93 ^b ± 0,69	20,51 ^b ± 1,78	3,47 ^b ± 0,51	90,6 ^c ± 6	17,8 ^b ± 2,8
0,1	2,77 ^{bc} ± 0,67	26,52 ^a ± 1,94	4,07 ^a ± 0,69	113,1 ^{ab} ± 15	19,3 ^a ± 4,9
0,5	2,47 ^c ± 0,97	19,30 ^c ± 1,61	3,07 ^b ± 0,69	103,4 ^b ± 20	11,2 ^d ± 1,8
1,0	3,30 ^a ± 0,59	19,48 ^c ± 1,84	2,97 ^b ± 0,57	115,0 ^a ± 24	17,5 ^{bc} ± 3,1
2,0	2,43 ^c ± 0,54	14,43 ^d ± 1,34	2,50 ^c ± 0,57	108,9 ^{ab} ± 20	15,9 ^c ± 3,0

± üç tekerrürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı sütunda aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür sürecinin sonunda elde edilmiştir.

Tablo 9. Farklı BAP derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus* 'un sürgün verim değerlerinin korelasyon analizi sonuçları.

		BAP				
		SS	SB	BS	YA	KA
0,1 mg/L	BAP	-0,024	-0,873**	-0,622**	-0,006	-0,307**
	SS	-	0,208	-0,113	-0,136	-0,277
	SB	0,208	-	0,284	0,208	-0,358
	NS	-0,113	0,284	-	0,284	0,004
	YA	-0,136	0,208	0,284	-	0,184
	KA	-0,277	-0,358	0,004	0,184	-
0,5mg/L	SS	-	0,126	0,106	0,187	0,450*
	SB	0,126	-	0,104	-0,226	0,145
	NS	0,106	0,104	-	0,078	0,085
	YA	0,187	-0,226	0,078	-	0,623**
	KA	0,450*	0,145	0,085	0,623**	-
	SS	-	-0,297	-0,234	-0,239	-0,023
1,0 mg/L	SB	-0,297	-	0,145	0,357	0,008
	NS	-0,234	0,145	-	0,033	-0,326
	YA	-0,239	0,357	0,033	-	-0,125
	KA	-0,023	0,008	-0,326	-0,125	-
	SS	-	-0,193	0,179	0,016	-0,121
	SB	-0,193	-	0,001	0,160	0,071
2,0 mg/L	NS	0,179	0,001	-	-0,279	-0,251
	YA	0,016	0,160	-0,279	-	0,872**
	KA	-0,121	0,071	-0,251	0,872**	-

SS:Sürgün Sayısı, SB:Sürgün Boyu, BS: Boğum Sayısı, YA:Yaş Ağırlık, KA: Kuru Ağırlık
* = $P < 0,05$, ** = $P < 0,001$ önem düzeyi (Pearson Korelasyon Testi). Veriler 4 haftalık kültür sonucu elde edilmiştir.

Farklı BAP derişimlerinde sürgün verim değerlerinin korelasyon analizine bakıldığında, düşük BAP derişimleri, sürgün boyu ile negatif yönde güçlü ($r = -0,873$), boğum sayısı ile negatif yönde orta derecede bir korelasyon ($r = -0,622$) ortaya çıkarmıştır ($p < 0.001$). Aynı uygulamada kuru ağırlık değerlerinde ise yine negatif yönde zayıf bir korelasyon ($r = -0,307$) görülmüştür. Derişimler ile sürgün verimi arası korelasyon analiz değerleri Tablo 9 'da ayrıntılı olarak verilmiştir.

3.3.2. 2iP Derişimlerinin Sürgün Çoğaltımı Üzerine Etkisi

2iP derişimleri sürgün sayısı arttırmada olumlu etki yapmadığı gözlenmiş olmakla birlikte, diğer tüm parametrelerde artış sağlamıştır (Tablo 9).

En yüksek sürgün sayısı değerleri sırası ile 2,93 ve 2,73 adet ile kontrol ve 0,1 mg/L uygulamasından elde edildi ve bu iki uygulama arasında sürgün sayısı açısından herhangi bir istatistiksel fark gözlemlenmemiştir ($P \leq 0,05$). Artan 2iP derişimlerinin sürgün boyunu giderek artırdığı gözlemlenmiş ve en yüksek değer 26,9 mm ile 2 mg/L uygulamasından elde edilmiştir. Yaş ve kuru ağırlık parametreleri açısından yine 2 mg/L uygulaması en yüksek değerleri verirken en düşük yaş ağırlık 0,5 mg/L uygulamasından, en düşük kuru ağırlık ise 0,1 mg/L uygulamalarından elde edilmiştir. Tüm parametreler açısından yapılan istatistik analiz çalışmaları yüksek 2iP derişimlerinin bu türün mikroçoğaltım çalışmalarında daha etkili sonuçlar verdiğini göstermiştir (Tablo 10).

Tablo 10. Farklı 2iP derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus* 'un sürgün sayısı, sürgün boyu, boğum sayısı, yaş ve kuru ağırlık değerleri.

2iP (mg/L)	SÜRGÜN SAYISI (Adet)	SÜRGÜN BOYU (mm)	BOĞUM SAYISI (Adet)	YAŞ AĞIRLIK (mg)	KURU AĞIRLIK (mg)
0,0	2,93 ^{a*} ± 0,69	20,51 ^d ± 1,78	3,47 ^c ± 0,51	90,6 ^c ± 6,4	17,8 ^b ± 2,8
0,1	2,73 ^a ± 0,52	20,08 ^d ± 1,95	4,40 ^b ± 0,67	64,2 ^d ± 7,8	1,2 ^d ± 0,4
0,5	2,33 ^b ± 0,66	21,67 ^c ± 1,96	3,63 ^c ± 0,72	53,7 ^e ± 8,8	10,7 ^c ± 1,8
1,0	1,47 ^c ± 0,51	24,83 ^b ± 2,70	5,70 ^a ± 0,88	108,2 ^b ± 1,8	18,4 ^b ± 1,9
2,0	1,50 ^c ± 0,68	26,97 ^a ± 2,51	5,97 ^{a*} ± 0,72	127,4 ^{a*} ± 1,9	22,7 ^a ± 3,8

± üç tekerrürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı sütunda aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür sürecinin sonunda elde edilmiştir.

2iP derişimlerinden elde edilen değerlerin korelasyon analizleri sonucunda *T. leucotrichus*'un sürgün sayısı ($r = -0,637$) hariç tüm parametrelerde pozitif yönde güçlü bir korelasyon gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0,001$). 2iP özellikle sürgün boyu ($r = 0,759$) ile yüksek, kuru ağırlık bakımından ise çok güçlü korelasyon ($r = 0,950$) değerleri vermesi 2iP'nin bu türün çoğaltılmasında daha etkili olduğu sonucunu doğurmuştur. Uygulama derişimleri arasındaki anlamlı diğer korelasyon değerleri Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Farklı 2iP derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus* 'un sürgün verim değerlerinin korelasyon analizi sonuçları

		2iP				
		SS	SB	BS	YA	KA
0,1 mg/L	2iP	-0,637**	0,759**	0,628**	0,815**	0,950**
	SS	-	0,262	-0,177	-0,109	-0,313
	SB	0,262	-	0,0231	-0,497**	-0,105
	NS	-0,177	0,231	-	0,048	-0,577**
	YA	-0,109	-0,497**	0,048	-	-0,205
	KA	-0,313	-0,105	-0,577**	-0,205	-
0,5 mg/L	SS	-	0,091	-0,315	0,026	0,026
	SB	0,091	-	0,246	0,421*	0,421*
	NS	-0,315	0,246	-	0,147	0,147
	YA	0,026	0,421*	0,147	-	1,000**
	KA	0,026	0,421*	0,147	1,000**	-
1,0 mg/L	SS	-	0,255	0,093	0,025	-0,038
	SB	0,255	-	0,367*	0,257	0,382*
	NS	0,093	0,367*	-	0,005	-0,179
	YA	0,025	0,257	0,005	-	0,644**
	KA	-0,038	0,382*	-0,179	0,644**	-
2,0 mg/L	SS	-	-0,041	-0,457	-0,001	-0,016
	SB	-0,041	-	-0,051	-0,002	-0,103
	NS	-0,457	-0,051	-	,065	0,206
	YA	-0,001	-0,002	0,065	-	-0,101
	KA	-0,016	-0,103	0,206	-0,101	-

SS:Sürgün Sayısı, SB:Sürgün Boyu, BS: Boğum Sayısı, YA:Yaş Ağırlık, KA: Kuru Ağırlık

* = $P < 0,05$, ** = $P < 0,001$ önem düzeyi (Pearson Korelasyon Testi). Veriler 4 haftalık kültür sonucu elde edilmiştir.

3.3.3. Kinetin Derişimlerinin Sürgün Çoğaltımı Üzerine Etkisi

Sürgün sayısı açısından en etkili derişim 0,1 mg/L olur iken diğer tüm parametrelerde 0,5 mg/L derişiminin en yüksek değerleri verdiği gözlemlenmiştir. Sürgün sayısı açısından da yine düşük derişimlerin yüksek değerler verdiği belirlenmiştir. En yüksek sürgün boyu değeri $2,93 \pm 0,69$ adet ile kontrol ortamından elde edilse de 0,1 mg/L uygulamasından elde edilen sürgün boyu değeriyle istatistiksel anlamda bir fark içermemiştir ($P \leq 0,05$, Tablo 12). En yüksek sürgün boyu, boğum sayısı, yaş ve kuru ağırlık değerleri ise sırası ile 40,88 mm, 5,73 adet, 245,1 mg ve 39,2 mg olarak hesaplanmıştır (Tablo 12). Kinetin ortamlarının tüm parametreler açısından karşılaştırıldığında BAP ve 2iP ortamlarından daha etkili sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir.

Tablo 12. Farklı Kinetin derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus*'un sürgün sayısı, sürgün boyu, boğum sayısı, yaş ve kuru ağırlık değerleri.

KINETİN (mg/L)	SÜRGÜN SAYISI (Adet)	SÜRGÜN BOYU (mm)	BOĞUM SAYISI (Adet)	YAŞ AĞIRLIK (mg)	KURU AĞIRLIK (mg)
0,0	$2,93^{a*} \pm 0,69$	$20,51^d \pm 1,78$	$3,47^c \pm 0,51$	$90,6^c \pm 6,4$	$17,8^c \pm 2,8$
0,1	$2,83^a \pm 0,59$	$40,16^a \pm 3,81$	$5,33^b \pm 0,88$	$204,5^c \pm 29,8$	$26,9^c \pm 3,0$
0,5	$2,67^{ab} \pm 0,61$	$40,88^a \pm 3,53$	$5,73^a \pm 0,78$	$245,1^a \pm 24,5$	$39,2^a \pm 3,4$
1,0	$2,47^c \pm 0,61$	$29,38^c \pm 2,55$	$3,97^d \pm 0,56$	$178,3^d \pm 18,2$	$25,4^d \pm 2,4$
2,0	$2,63^{bc} \pm 0,73$	$36,00^b \pm 2,89$	$4,77^c \pm 0,68$	$234,8^b \pm 24,4$	$30,9^b \pm 3,2$

\pm üç tekerrürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı sütunda aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür sürecinin sonunda elde edilmiştir.

Kinetin uygulamalarından elde edilen korelasyon analizleri sonucunda bu BBD'nin *T. leucotrichus*'un doku kültürleri ile üretimi ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir.. Denemeye tabi tutulan parametreler arasından sürgün sayısı, sürgün boyu ve boğum sayısı değerlerinin negatif yönde zayıf bir korelasyon ($r = -0,246$, $r = -0,482$, $r = -0,395$) gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0,001$). Artan kinetin derişimlerinin bu parametrelerde azalmaya neden olması bu tür üzerine yapılacak doku kültürü çalışmalarında 2iP'nin daha etkili olacağı sonucunu doğurmuştur (Tablo 13).

Tablo 13. Farklı Kinetin derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus*'un sürgün verim değerlerinin korelasyon analizi sonuçları.

		KİN				
		SS	SB	BS	YA	KA
0,1 mg/L	KİN	-0,246**	-0,482**	-0,395**	0,063	-0,038
	SS	-	-,200	-0,088	-0,016	-0,052
	SB	-0,200	-	0,536**	-0,066	0,171
	NS	-0,088	0,536**	-	0,099	0,167
	YA	-0,016	-0,066	0,099	-	0,424*
	KA	-0,052	0,171	0,167	0,424*	-
0,5 mg/L	SS	-	0,100	0,241	0,053	-0,038
	SB	0,100	-	0,524**	0,408	0,283
	NS	0,241	0,524**	-	0,201	0,151
	YA	0,053	0,408*	0,201	-	0,916**
	KA	-0,038	0,283	0,151	0,916**	-
	SS	-	0,226	0,024	0,127	-0,150
1,0 mg/L	SB	0,226	-	0,365**	0,010	-0,050
	NS	0,024	0,365**	-	0,093	-0,057
	YA	0,127	0,010	0,093	-	0,401*
	KA	-0,150	-0,050	-0,057	0,401*	-
	SS	-	0,158	0,019	-0,001	-0,077
	SB	0,158	-	0,588**	0,086	0,065
2,0 mg/L	NS	0,019	0,588**	-	-0,153	0,033
	YA	-0,001	0,086	-0,153	-	0,289
	KA	-0,077	0,065	0,033	0,289	-

SS:Sürgün Sayısı, SB:Sürgün Boyu, BS: Boğum Sayısı, YA:Yaş Ağırlık, KA: Kuru Ağırlık

* = $P < 0.05$, ** = $P < 0.001$ önem düzeyi (Pearson Korelasyon Testi). Veriler 4 haftalık kültür sonucu elde edilmiştir.

3.3.4. TDZ Derişimlerinin Sürgün Çoğaltımı Üzerine Etkisi

Sürgün sayısı, sürgün boyu ve boğum sayısı parametreleri açısından artan TDZ derişimlerinin istatistiksel anlamda daha düşük değerler verdiği, yaş ve kuru ağırlık parametrelerinde ise daha yüksek değerler verdiği gözlemlenmiştir. En yüksek ve en düşük sürgün sayısı değerleri sırası ile sürgün başına 2,93 ve 1,97 adet ile kontrol ve 2 mg/L

uygulamalarından elde edilmiş ve istatistiksel fark Tablo 14’de gösterilmiştir. Sürgün boyu açısından sürgün başına 23,95 mm ile 0,1 mg/L uygulaması en yüksek değeri verirken en düşük değeri veren 2 mg/L uygulaması ile aralarındaki fark sürgün başına 11,44 mm olarak hesaplanmıştır. Bu da artan TDZ derişimlerinin bu türün sürgün boyu değerlerini düşürdüğü sonucunu ortaya çıkarmıştır. Yaş ve kuru ağırlık parametreleri açısından 1 mg/L uygulaması en yüksek değerleri verirken elde edilen bu değerlerin uygulamaya tabi tutulan diğer 3 sitokinininden elde edilen yaş ve kuru ağırlık değerlerinden daha yüksek olduğu sonucu elde edilmiştir. Ancak denemelerde gözlenen camlaşma doku kültürleri için istenmeyen bir durumdur (Şekil 3).

Tablo 14. Farklı TDZ derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus*’un sürgün sayısı, sürgün boyu, boğum sayısı, yaş ve kuru ağırlık değerleri.

TDZ (mg/L)	SÜRGÜN SAYISI (Adet)	SÜRGÜN BOYU (mm)	BOĞUM SAYISI (Adet)	YAŞ AĞIRLIK (mg)	KURU AĞIRLIK (mg)
0,0	2,93 ^a ± 0,69	20,51 ^c ± 1,78	3,47 ^{a*} ± 0,51	90,6 ^c ± 6,4	17,8 ^c ± 2,8
0,1	2,37 ^b ± 0,72	23,95 ^a ± 2,15	3,30 ^a ± 0,65	285,7 ^d ± 19,9	38,3 ^d ± 2,6
0,5	2,07 ^c ± 0,37	19,78 ^d ± 1,74	2,20 ^b ± 0,41	505,2 ^c ± 46,5	43,7 ^c ± 3,3
1,0	2,00 ^c ± 0,26	21,75 ^b ± 1,86	2,03 ^b ± 0,18	697,0 ^a ± 59,7	61,3 ^a ± 6,8
2,0	1,97 ^c ± 0,18	12,51 ^c ± 1,54	2,03 ^b ± 0,18	570,4 ^b ± 67,5	50,1 ^b ± 4,6

± üç tekerrürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı sütunda aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür sürecinin sonunda elde edilmiştir.

TDZ uygulamaları diğer sitokinin uygulamalarından farklı olarak sürgün sayısı, sürgün boyu ve boğum sayısı açısından negatif yönde güçlü bir korelasyon ($r = -0,767$, $r = -0,670$) gösterirken biyokütle üretiminin önemli olduğu doku kültürü çalışmaları için önemli olan yaş ve kuru ağırlık parametreleri açısından ise pozitif yönde güçlü bir korelasyon ($r = 0,743$, $r = 0,611$) göstermiştir ($p < 0,001$). Dozlar arasındaki diğer korelasyon verileri Tablo 15’te gösterilmiştir.

Tablo 15. Farklı TDZ derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus*'un sürgün verim değerlerinin korelasyon analizi sonuçları

		TDZ				
		SS	SB	BS	YA	KA
0,1 mg/L	TDZ	-0,312**	-0,767**	-0,670**	0,743**	0,611**
	SS	-	0,132	0,273	0,086	0,184
	SB	0,132	-	-0,298	-0,064	0,043
	NS	0,273	-0,298	-	0,288	0,002
	YA	0,086	-0,064	0,288	-	0,417**
	KA	0,184	0,043	0,002	0,417**	-
0,5 mg/L	SS	-	0,379	-0,325	-0,109	-0,288
	SB	0,379*	-	-0,327	0,103	0,150
	NS	-0,325	-0,327	-	0,042	0,320
	YA	-0,109	0,103	0,042	-	0,572**
	KA	-0,288	0,150	0,320	0,572**	-
	SS	-	0,001	0,000	0,021	0,027
1,0 mg/L	SB	0,001	-	-0,133	0,216	0,387
	NS	0,000	-0,133	-	0,144	0,151
	YA	0,021	0,216	0,144	-	0,898**
	KA	0,027	0,387	0,151	0,898**	-
	SS	-	0,158	0,034	0,300	-0,033
	SB	0,158	-	-0,042	0,166	0,126
2,0 mg/L	NS	0,034	-0,042	-	-0,026	0,002
	YA	0,300	0,166	-0,026	-	0,079
	KA	-0,033	0,126	0,002	0,079	-

SS:Sürgün Sayısı, SB:Sürgün Boyu, BS: Boğum Sayısı, YA:Yaş Ağırlık, KA: Kuru Ağırlık. * = P < 0.05, ** = P < 0.001 önem düzeyi (Pearson Korelasyon Testi). Veriler 4 haftalık kültür sonucu elde edilmiştir.

3.4. Oksin Uygulamalarının Kök Oluşumuna Etkileri

3.4.1. IBA Derişimlerinin Kök Oluşumuna Etkisi

4 hafta sonunda fidelerin köklenme yüzdeleri IBA'nın farklı derişimlerinde herhangi bir istatistikel farklılık göstermemiştir. 0,1 ve 0,5 mg/L derişimlerinde en fazla kök sayısı gözlenirken, lateral kök sayısı parametresinde en ideal derişim 0,5 mg/L olarak tespit

edilmiştir. En uzun kök ise 37,17 mm ile 1 mg/L derişiminde gözlenmiştir ve istatistiksel farklar Tablo 16’da ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 16. *Thymus leucotrichus*’un farklı IBA derişimlerindeki köklenme yüzdesi, kök sayısı, kök uzunluğu ve lateral kök sayısı değerleri

IBA (mg/L)	KÖKLENME YÜZDESİ (%)	KÖK SAYISI (Adet)	KÖK UZUNLUĞU (mm)	LATERAL KÖK SAYISI (Adet)
0,1	66,66 ^{a*} ± 2,6	3,2 ^a ± 0,6	22,50 ^d ± 2,1	2,4 ^b ± 0,7
0,5	63,30 ^a ± 3,3	3,0 ^a ± 0,5	33,73 ^b ± 2,9	2,9 ^a ± 0,5
1,0	60,00 ^a ± 4,0	2,2 ^b ± 0,3	37,17 ^a ± 2,2	1,3 ^c ± 0,5
2,0	64,70 ^a ± 5,9	2,4 ^b ± 0,8	26,12 ^c ± 2,2	0,8 ^d ± 0,6

± üç tekerrürlü ortalamının standart sapmasıdır. Aynı sütunda aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür sürecinin sonunda elde edilmiştir.

3.4.2. IAA Derişimlerinin Kök Oluşumuna Etkisi

Köklenme yüzdesi (% 65,23), kök sayısı (3,1 adet) ve lateral kök sayısı (2,4 adet) parametreleri açısından bakıldığında en iyi IAA derişiminin 0,5 mg/L olduğu gözlenmiştir. Söz konusu kök uzunluğu olduğunda ise 24,58 mm ile 0,1 mg/L derişiminin istatistiki açıdan diğer derişimlerden daha etkili olduğu gözlenmiştir (Tablo 17.).

Tablo 17. *Thymus leucotrichus*’un farklı IAA derişimlerindeki köklenme yüzdesi, kök sayısı, kök uzunluğu ve lateral kök sayısı değerleri

IAA (mg/L)	KÖKLENME YÜZDESİ (%)	KÖK SAYISI (Adet)	KÖK UZUNLUĞU (mm)	LATERAL KÖK SAYISI (Adet)
0,1	47,36 ^c ± 0,0	2,0 ^c ± 0,3	24,58 ^a ± 0,9	2,1 ^b ± 0,7
0,5	65,23 ^a ± 2,4	3,1 ^a ± 0,3	18,75 ^c ± 1,2	2,4 ^a ± 0,5
1,0	54,54 ^b ± 4,5	1,4 ^d ± 0,3	12,21 ^d ± 0,7	1,2 ^d ± 0,5
2,0	58,82 ^b ± 0,0	2,3 ^b ± 0,3	19,83 ^b ± 1,1	1,6 ^c ± 0,6

± üç tekerrürlü ortalamının standart sapmasıdır. Aynı sütunda aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür sürecinin sonunda elde edilmiştir.

3.4.3. NAA Derişimlerinin Kök Oluşumuna Etkisi

Tüm derişim aralıkları, kök sayısı parametresi bakımından istatistiki olarak benzer sonuç vermiştir. Lateral kök sayısı bakımından ise 2,8 adet ile 2 mg/L NAA derişiminin diğer derişimlerden bariz bir farkla en iyi sonucu verdiği gözlenmiştir. 0,1 mg/L NAA derişiminde 20,5 mm ile en yüksek kök uzunluğu gözlenmiştir. Köklenme yüzdesi % 63,72 ve % 64,7 değerleri ile 0,1 ve 0,5 mg/L derişimleri istatistiki olarak benzer oranda etki göstererek en yüksek yüzdeye sahip olmuşlardır (Tablo 18).

Tablo 18. *Thymus leucotrichus*'un farklı NAA derişimlerindeki köklenme yüzdesi, kök sayısı, kök uzunluğu ve lateral kök sayısı değerleri

NAA (mg/L)	KÖKLENME YÜZDESİ (%)	KÖK SAYISI (Adet)	KÖK UZUNLUĞU (mm)	LATERAL KÖK SAYISI (Adet)
0,1	63,72 ^a ± 1,7	1,9 ^a ± 0,6	20,5 ^a ± 1,1	2,1 ^b ± 0,5
0,5	64,7 ^a ± 2,9	2,0 ^{a*} ± 0,4	16,34 ^c ± 1,2	1,9 ^c ± 0,7
1,0	39,7 ^c ± 1,6	1,8 ^a ± 0,4	18,02 ^b ± 1,3	2,2 ^b ± 0,5
2,0	52,5 ^b ± 2,5	1,9 ^a ± 0,5	13,82 ^d ± 1,1	2,8 ^a ± 0,4

± üç tekerrürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı sütunda aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür sürecinin sonunda elde edilmiştir.

Artan IBA derişimleri ile kök uzunluğu arasında pozitif yönde zayıf bir korelasyon bulunurken ($r = 0,257$), kök sayısı ve sekonder kök sayısı bakımından negatif yönde orta dereceli bir korelasyon göstermiştir ($r = -0,495$, $r = -0,699$, $p < 0,001$). IAA ve NAA uygulamaları kök sayısı açısından karşılaştırıldığında NAA'nın IAA daha güçlü bir negatif yönde korelasyon gösterdiği belirlenmiştir ($r = -0,761$). Bu sonuçlar kök sayısı açısından IBA'nın en etkili BBD olduğunu göstermiştir. Uygulanan derişimler arasındaki ayrıntılı korelasyon değerleri Tablo 19'da verilmiştir.

Tablo 19. *Thymus leucotrichus*'un farklı IBA, IAA, NAA derişimlerindeki kök sayısı, kök uzunluğu ve sekonder kök sayısı değerlerinin korelasyon analizi sonuçları

		IBA			IAA			NAA		
		KU	KS	SKS	KU	KS	LKS	KU	KS	SKS
	IBA	0,257**	-0,495**	-0,699**						
	IAA				-0,523**	-0,096	-0,453**			
	NAA							-0,761**	0,044	-0,222*
0,1 mg/L	KU	-	-0,148	-0,004	-	-0,358	-0,398*	-	0,073	0,305
	KS	-0,148	-	-0,003	-0,358	-	0,539**	0,073	-	0,094
	SKS	-0,004	-0,003	-	-0,398*	0,539**	-	0,094	0,305	-
0,5 mg/L	KU	-	0,277	-0,245	-	-0,356	-0,371*	-	-0,259	0,006
	KS	0,277	-	0,410*	-0,356	-	,573**	-0,259	-	0,106
	SKS	-0,245	0,410*	-	-0,371*	0,573**	-	,006	0,106	-
1,0 mg/L	KU	0,041	0,041	0,041	-	-0,052	-,242	-	0,101	0,217
	KS	0,041	-	0,015	-0,052	-	,251	0,101	-	0,326
	SKS	-0,002	0,015	-	-0,242	0,251	-	0,217	0,326	-
2,0 mg/L	KU	-	-0,205	-0,816**	-	-0,443**	,164	-	0,502**	-0,198
	KS	-0,205	-	0,123	-0,443**	-	,134	0,502**	-	0,255
	SKS	-0,816**	0,123	-	0,164	0,134	-	-0,198	0,255	-

KU:Kök Uzunluğu, KS:Kök Sayısı, LKS: Lateral Kök Sayısı. * = P < 0.05, ** = P < 0.001 önem düzeyi (Pearson Korelasyon Testi). Veriler 4 haftalık kültür sonucu elde edilmiştir.

Sitokinin ve oksinlerin büyüme/gelişme ve rozmarinik asit miktarları göz önüne alınarak sonraki basamaklar için standart bir besiyeri ortamı belirlenmiştir. Bu ortam için seçilen 2 mg/L 2iP ve 0,1 NAA içeren MS besiyeri ortamı olmuştur. Bu seçim yapılırken sürgün boyu, boğum sayısı, yaş/kuru ağırlık ve rozmarinik asit miktarları belirleyici kriterler olmuştur. Tüm bu basamaklara bakıldığında sitokininlerden 1mg/L kinetin ve 2mg/L 2iP'in değerlerinin birbirine çok yakın olduğu gözlenmiştir (Tablo 20).

Tablo 20. *Thymus leucotrichus*'un 2mg/L 2iP ve 1 mg/L kinetine ait sürgün verim değerleri ve rozmarinik asit miktarları

	Sürgün Boyu (mm)	Boğum Sayısı (adet)	Yaş Ağırlık (mg)	Kuru Ağırlık (mg)	RAM (mg/g ka)
2mg/L 2iP	26,97 ± 2,51	5,97 ± 0,72	127,4 ± 1,9	22,7 ± 3,8	6.29 ± 0,15
1 mg/L KİN	29,38 ± 2,55	3,97 ± 0,56	178,3 ± 18,2	25,4 ± 2,4	6.35 ± 0,2

Veriler 4 haftalık kültür sonucu elde edilmiştir.

Bu iki sitokinin arasından 2 mg/L 2iP 'nin seçilmesinin bir başka nedeni, nitel özelliklerin yanı sıra fidelerin kültürde büyürken gösterdikleri nicel özelliklerdir. Şekil 3'de görüldüğü gibi 2 mg/L 2iP içeren MS ortamında büyüyen fidelerin, daha yeşil ve sağlıklı olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).

Oksin seçimi ise daha kolay olmuştur. 16,18 mg/g ka değeri ile 0,1mg/L NAA en fazla rozmarinik asit içeriğine sahiptir. Aynı zamanda % 63,72 köklenme yüzdesi ve 20,5 mm kök uzunluğuna sahip olması ile en etkili oksin grubu 0,1 mg/L NAA olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. Farklı Sitokin Uygulamalarında 4 Hafta Büyütülen *T. leucotrichus* Fideleri. A: BAP, Bar: 15 mm / B: 2iP, Bar: 20 mm / C:KİN, Bar C: 29 mm / D:TDZ, Bar: 19 mm. (1;0,1mg/L, 2; 0,5 mg/L ,3;1 mg/L, 4; 2 mg/L).

3.5. Fenilalanin, Tirozin ve N-asetil Sisteinin Büyüme ve Gelişme Üzerindeki Etkileri

In vitro çalışmalarda bitki primer ve sekonder metabolizmasını incelemek amaçlı çeşitli kimyasal maddelerin besi ortamına eklenmesi sıkça uygulanan bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında fenilalanin, tirozin ve N-asetilsistein'in 10, 50 ve 100 mg/L derişimleri besi ortamlarına (2 mg/L 2iP ve 0,1 mg/L NAA içeren MS besi ortamı) ilave edilmiş ve büyüme ve gelişme üzerine etkileri incelenmiştir. Sonrasında, rozmarinik asit üretimine ve uçucu yağ içeriğine etkileri ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

3.5.1. Fenilalanin Derişiminin Sürgün Oluşumuna Etkileri

40,13 mm sürgün boyu, 121,1 mg / 18,2 mg yaş/ kuru ağırlık değerleri ile en etkili derişimin 10 mg/L fenilalanin olduğu gözlenmiştir (Tablo 21). Bu parametrelerde derişim artışı ile değerlerde düşüş gözlenmiştir (Şekil 4). Tablo 21' e bakıldığında, boğum sayısı bakımından fenilalanin içermeyen kontrol grubu 6,27 adet değeri ile en etkili grup olmuştur.

Tablo 21. Farklı fenil alanin derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus*'un sürgün verimi değerleri.

FA (mg/L)	SÜRGÜN SAYISI (Adet)	SÜRGÜN BOYU (mm)	BOĞUM SAYISI (Adet)	YAŞ AĞIRLIK (mg)	KURU AĞIRLIK (mg)
0	4,00 ^a ± 0,45	32,80 ^c ± 1,86	6,27 ^a ± 0,45	95,4 ^b ± 8,3	10,3 ^d ± 1,0
10	3,80 ^a ± 0,55	40,13 ^a ± 3,38	5,37 ^b ± 0,67	121,1 ^a ± 5,3	18,2 ^a ± 1,9
50	2,73 ^b ± 0,52	35,90 ^b ± 2,99	5,43 ^b ± 0,73	88,6 ^c ± 8,3	17,3 ^b ± 1,6
100	2,47 ^b ± 0,50	35,43 ^b ± 2,05	4,77 ^c ± 0,63	72,9 ^d ± 5,8	15,8 ^c ± 1,3

± üç tekerrürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı sütunda aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür sürecinin sonunda elde edilmiştir.

3.5.2. Tirozin Derişiminin Sürgün Oluşumuna Etkileri

Tirozin uygulamasına bakıldığında tek bir derişimin, tüm parametrelerde üstün olmadığı saptanmıştır. Sürgün sayısında derişim artışı ile düşüş gözlenirken, sürgün boyunda 10 mg/L tirozinin 34,70 mm ile en etkili grup olduğu belirlenmiştir (Şekil 4). Yaş ağırlık bakımından kontrol grubu hariç diğer gruplar arası istatistiki bir fark gözlenmemiştir ($P \leq 0,05$). Kuru ağırlık ölçümlerine bakıldığında ise 10 ve 50 mg/L derişim uygulamaları arası istatistiki bir fark bulunmaksızın en etkin uygulamalar olduğu belirlenmiştir (Tablo 22).

Tablo 22. Farklı Tirozin derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus*'un sürgün verimi değerleri

TİROZİN (mg/L)	SÜRGÜN SAYISI (Adet)	SÜRGÜN BOYU (mm)	BOĞUM SAYISI (Adet)	YAŞ AĞIRLIK (mg)	KURU AĞIRLIK (mg)
0	4,00 ^a ± 0,45	32,80 ^b ± 1,86	6,27 ^a ± 0,45	95,4 ^b ± 8,3	10,3 ^c ± 1,0
10	3,47 ^b ± 0,51	34,70 ^a ± 2,56	5,73 ^b ± 0,58	105,0 ^a ± 11,1	19,7 ^a ± 1,6
50	3,43 ^b ± 0,50	31,83 ^{bc} ± 2,09	6,07 ^a ± 0,64	109,3 ^a ± 8,6	20,2 ^a ± 1,9
100	2,97 ^c ± 0,56	30,73 ^c ± 2,17	5,47 ^b ± 0,51	108,5 ^a ± 9,0	16,7 ^b ± 1,4

± üç tekerrürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı sütunda aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür sürecinin sonunda elde edilmiştir.

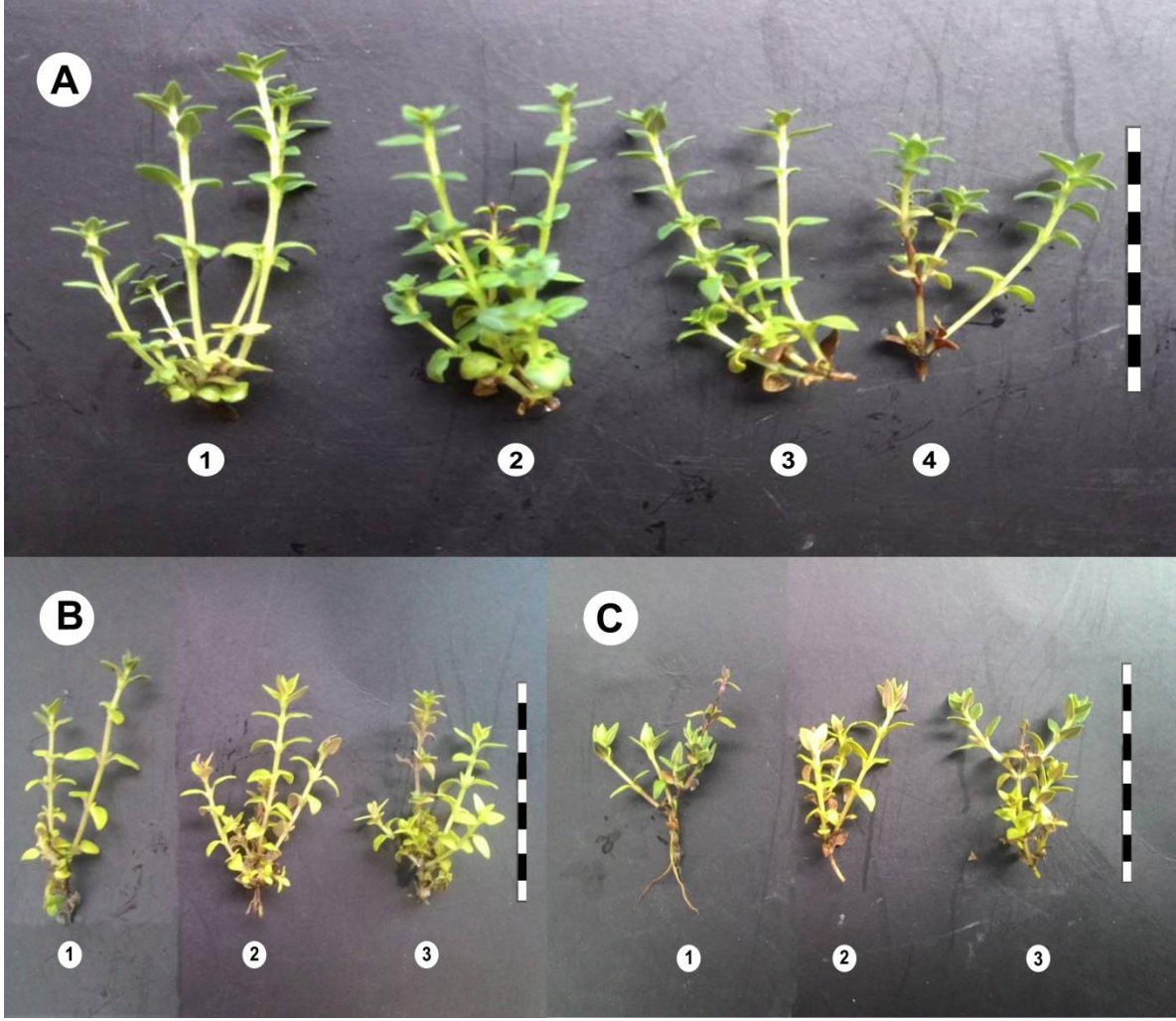
3.5.3. N-asetilsistein Derişiminin Sürgün Oluşumuna Etkileri

Sürgün sayısı (5,03) , sürgün boyu (33,87 mm), yaş ağırlık (212,0 mg) ve kuru ağırlık (25,3 mg) kriterlerine bakıldığında en etkili derişim grubu 10 mg/L olarak belirlenmiştir (Tablo 23). Boğum sayısına bakıldığında ise 6,27 adet değeri ile kontrol grubunun NAC uygulamalarından daha etkin bir sonuç verdiği gözlenmiştir. Derişim artışı genel olarak bakıldığında sürgün verimini olumsuz etkilemiştir (Şekil 4).

Tablo 23. Farklı N-asetilsistein derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus*'un sürgün verimi değerleri

NAC (mg/L)	SÜRGÜN SAYISI (Adet)	SÜRGÜN BOYU (mm)	BOĞUM SAYISI (Adet)	YAŞ AĞIRLIK (mg)	KURU AĞIRLIK (mg)
0	4,00 ^b ± 0,45	32,80 ^{ab} ± 1,86	6,27 ^a ± 0,45	95,4 ^d ± 8,3	10,3 ^d ± 1,0
10	5,03 ^a ± 0,49	33,87 ^a ± 2,56	5,60 ^b ± 0,62	212,0 ^a ± 20,3	25,3 ^a ± 2,4
50	3,00 ^c ± 0,53	31,90 ^b ± 2,33	4,67 ^c ± 0,61	132,0 ^b ± 11,5	18,4 ^b ± 1,4
100	3,03 ^c ± 0,49	31,77 ^b ± 2,65	4,53 ^c ± 0,57	104,6 ^c ± 9,9	16,8 ^c ± 1,4

± üç tekerrürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı sütunda aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür sürecinin sonunda elde edilmiştir.



Şekil 4. Fenilalanin, Tirozin ve N-asetilsistein Uygulamalarında 4 Hafta Büyütülen *T. leucotrichus* Fideleri. A: Fenilalanin, Bar: 36 mm. (1; 10 mg/L, 2; 25 mg/L, 3; 50 mg/L, 4; 100mg/L) B: Tirozin, Bar: 30 mm / C: NAC, Bar: 32 mm (1; 10mg/L, 2; 50 mg/L ,3;100 mg/L)

3.6. Sukroz Derişiminin Sürgün Oluşumuna Etkileri

Sürgün oluşumuna ve hedef metabolitlerin miktar ve çeşitine etkisini bakmak amacıyla 10, 20, 30 ve 40 g/L oranlarında sukroz içeren besi ortamlarına ekim yapılmıştır. 4 hafta sonunda sürgün sayısı, sürgün boyu, boğum sayısı, yaş ve kuru ağırlık değerleri ölçülmüştür (Şekil 5). Ayrıca sukrozun sekonder metabolizmaya etkisini anlamak için rozmarinik asit ve uçucu yağ profillerindeki miktar değişiklikleri incelenmiştir. 10 g/L sukroz içeren grup sürgün boyu (34,00 mm) ve boğum sayısı (6,47 adet) kriterlerinde en etkili uygulama olurken, 30 g/L sukroz derişimi 4,47 adet değeri ile en fazla sürgün sayısına sahip deneme grubu olmuştur (Tablo 24). Yaş ve kuru ağırlık parametrelerine

bakıldığında ise tahmin edileceği üzere en etkili grup 114,8 mg, 18,05 mg değerleri ile 40 g/L sukroz olmuştur.



Şekil 5. Farklı Sukroz Derişimlerinde 4 Hafta Büyütülen *T. leucotrichus* Fideleri. (1; 10 g/L, 2; 20 g/L, 3;30 g/L, 4; 40 g/L, Bar: 27 mm)

Tablo 24. Farklı Sukroz derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus*'un sürgün verimi değerleri

SUKROZ (g/L)	SÜRGÜN SAYISI (Adet)	SÜRGÜN BOYU (mm)	BOĞUM SAYISI (Adet)	YAŞ AĞIRLIK (mg)	KURU AĞIRLIK (mg)
10	4,03 ^b ± 0,56	34,00 ^a ± 2,83	6,47 ^a ± 0,68	92,7 ^c ± 9,2	10,13 ^c ± 0,9
20	4,0 ^b ± 0,45	32,80 ^b ± 1,86	6,27 ^a ± 0,45	95,4 ^c ± 8,3	10,34 ^c ± 1,0
30	4,47 ^a ± 0,51	29,67 ^c ± 1,21	5,47 ^b ± 0,68	103,2 ^b ± 9,6	14,94 ^b ± 1,5
40	3,73 ^c ± 0,52	27,17 ^d ± 1,15	4,70 ^c ± 0,65	114,8 ^a ± 11,2	18,05 ^a ± 1,6

± üç tekerrürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı sütunda aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür sürecinin sonunda elde edilmiştir.

3.7. Rozmarinik Asit Miktarları

Farklı derişimlerde bitki büyüme düzenleyicileri (BBD), öncül maddeler ve elisitör ile sukrozun *T.leucotrichus* mikroçoğaltımının yanı sıra ve bu sürecin sonunda üretilen fidelerde, sekonder metabolitlerin üretim/birikimini nasıl etkileyebileceği sorusuna da yanıt aranmıştır. Bu bağlamda farklı ortamlarda üretilen fidelerin gerek rozmarinik asit miktarı ve gerekse uçucu yağ profilleri araştırılmıştır.

3.7.1. BBD'lerin Rozmarinik Asit Miktarına Etkileri

Tez kapsamında araştırılan *T. leucotrichus* bitkisinin doğal ortamdan toplanan örneklerinde rozmarinik asit miktarı 6,78 mg/g ka olarak belirlenmiştir. RA miktarı, standart MS besi ortamında yetişen fideler ile doğal örnekler arası istatistiki bir fark oluşturmamıştır. En yüksek RA değeri, 16,18 mg/g ka değeri ile 0,1mg/L NAA içeren uygulama grubunda gözlenmiştir (Tablo 25). Genel olarak bakıldığında, oksin uygulamalarının sitokinin uygulamalarından daha çok rozmarinik asit üretimini desteklediği saptanmıştır. Özellikle NAA ve IAA 'nın düşük derişimlerinin rozmarinik asit üretimini önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir. Tablo 25 'e bakıldığında, en düşük rozmarinik asit miktarının 1,37 mg/g ka değeri ile 0,5 mg/L kinetin uygulamasına ait olduğu anlaşılır. Artan BAP derişiminin ise rozmarinik asit miktarını olumsuz etkilediği sonucu elde edilmiştir (Tablo 25).

Tablo 25. Farklı BBD uygulamaları ile mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus*'un rozmarinik asit miktarları (mg/g kuru ağırlık)

BBD (mg/L)	Rozmarinik Asit Miktarı (mg/g kuru ağırlık)						
	BAP	2iP	KİN	TDZ	IAA	IBA	NAA
0,0	6,85 ^{ijkl} ± 0,50	6,85 ^{ijkl} ± 0,50	6,85 ^{ijkl} ± 0,50	6,85 ^{ijkl} ± 0,50	6,85 ^{ijkl} ± 0,50	6,85 ^{ijkl} ± 0,50	6,85 ^{ijkl} ± 0,50
0,1	5,97 ^{lm} ± 0,30	9,43 ^{gh} ± 0,40	4,23 ^{opq} ± 0,16	9,25 ^{gh} ± 0,25	13,16 ^b ± 1,0	4,55 ^{op} ± 0,50	16,18 ^a ± 1,2
0,5	5,66 ^{mn} ± 0,20	10,15 ^{fg} ± 0,80	1,37 ^t ± 0,07	6,49 ^{klm} ± 0,30	11,33 ^{de} ± 0,60	4,95 ^{no} ± 0,61	11,76 ^{cd} ± 0,80
1	3,64 ^{ps} ± 0,15	7,55 ^{ij} ± 0,40	6,35 ^{klm} ± 0,20	2,95 ^s ± 0,10	10,44 ^{ef} ± 0,61	7,03 ^h ± 0,71	12,55 ^{bc} ± 0,90
2	3,29 ^{qs} ± 0,11	6,29 ^{klm} ± 0,15	4,74 ^{no} ± 0,15	4,55 ^{op} ± 0,20	9,21 ^{gh} ± 0,70	9,06 ^h ± 0,71	8,12 ⁱ ± 0,60
Doğal							6,78 ^{ijkl} ± 0,30

± üç tekerrürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür süreci sonunda elde edilmiştir.

3.7.2.Fenilalanin, Tirozin ve N-asetil Sisteinin Rozmarinik Asit Miktarına Etkileri

Tez çalışmasının bu aşamasında, hedef metabolitlerden olan biri rozmarinik asit miktarına etkisini incelemek amaçlı, daha önceden belirlenen 2 mg/L 2iP ve 0,1 mg/L NAA içeren MS besi ortamına, 10, 50 ve 100 mg/L fenilalanin, tirozin ve N-asetilsistein ilavesi yapılmıştır. 4 hafta *in vitro* koşullarda büyütülen fideler HPLC analizine tabii tutulmuştur. En yüksek rozmarinik asit içeriğine sahip uygulama 16,28 mg/g ka değeri ile 50 mg/L N-asetilsistein olmuştur (Tablo 26). Kontrol grubu olarak seçilen 2 mg/L 2iP ve 0,1 mg/L NAA içeren MS besi ortamında bu değer 8,74 mg/g ka iken, doğadan toplanan fidelerdeki rozmarinik asit miktarı 6,78 mg/g ka olarak ölçülmüştür. Derişim artışının, Tirozin grubundaki fidelerin rozmarinik asit miktarlarında ciddi bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Öte yandan Tablo 26'de de belirtildiği gibi, fenilalaninin tüm derişim basamaklarında, kontrol grubuna oranla daha az rozmarinik asit miktarı saptanmıştır. Bu beklenmeyen durumun araştırılması amaçlı fenilalanin denemesine bir derişim daha eklenmiş ve 25 mg/L fenilalanin içeren besi yerinde büyütülen fidelerin rozmarinik asit miktarı da incelenmiştir. Bu denemeye ait rozmarinik asit miktarının 10,88 mg/g kuru ağırlık olduğu saptanmıştır (Tablo 26).

Tablo 26. Fenilalanin, Tirozin ve N-asetilsistein uygulamaları ile mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus* 'un Rozmarinik Asit Miktarları

	Rozmarinik Asit Miktarı (mg/g kuru ağırlık)		
	Fenilalanin	Tirozin	N_asetilsistein
10 mg/L	7,05 ^c ± 0,60	12,03 ^b ± 1,0	5,63 ^f ± 0,30
50 mg/L	6,51 ^{ef} ± 0,40	13,14 ^b ± 0,90	16,28^a ± 1,0
100 mg/L	7,74 ^{de} ± 0,50	7,61 ^{de} ± 0,40	10,67 ^c ± 0,80
Doğal			6,78 ^{ef} ± 0,30
Kontrol			8,74 ^d ± 0,60

± üç tekerrürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür süreci sonunda elde edilmiştir.

3.7.3. Sukroz Derişiminin Rozmarinik Asit Miktarına Etkileri

Kontrol ortamı olarak seçilen 2 mg/L 2iP ve 0,1 mg/L NAA içeren MS besi ortamının sukroz oranları %1, %2, %3 ve %4 olacak şekilde değiştirilerek rozmarinik asit miktarına etkisi araştırılmıştır. Bu bağlamda kurulan deney gruplarında gözlenen en yüksek değer 19,10 mg/g ka ile %4 sukroz derişimi olmuştur. Sukroz derişimi arttıkça rozmarinik asit miktarının da istatistiki olarak önemli derecede arttığı belirlenmiştir (Tablo 27).

Tablo 27. Farklı sukroz derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus* 'un Rozmarinik Asit Miktarları(mg/g kuru ağırlık)

	SUKROZ (g/L)			
	10	20	30	40
	5,63 ^d ± 0,40	8,74 ^c ± 0,50	11,22 ^b ± 0,70	19,10^a ± 1,10
Doğal				6,78 ^c ± 0,30
Kontrol				8,74 ^c ± 0,60

± üç tekerrürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı harflerle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P \leq 0,05$), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). Veriler 4 haftalık kültür süreci sonunda elde edilmiştir.

3.8. Uçucu Yağ İçeriğine Etki

3.8.1. BBD'lerin Uçucu Yağ İçeriğine Etkisi

3.8.1.1. Sitokinlerin Uçucu Yağ İçeriğine Etkisi

Sitokin grubu büyüme düzenleyicilerin, *in vitro* büyütülen *T. leucotrichus* fidelerinin uçucu yağ içerikleri ve miktarları üzerine etkisine bakılmıştır. Yapılan GS-MS sonuçları Tablo 28' de gösterilmiştir. Bu değerlere bakıldığında doğadan toplanan örneklerde timol yüzdesi % 36,86 v/w iken, standart MS besiyeri ortamında büyütülen bireylerde bu değer % 37,91 olarak saptanmıştır. 1 mg/L kinetin uygulaması en yüksek timol derişimini (% 55,82 v/w) vermiştir. Doğal örneklerdeki karvakrol oranı % 3,31 iken 0,1 mg/L TDZ uygulamasıyla % 12,53 v/w değerine yükseltilmiştir. Değerli bir sekonder metabolit olan timokinon doğal bireylerden alınan örneklerde rastlanmamıştır. *In vitro* büyütülen fidelerde kontrol grubunda % 6,24 v/w oranında bulunurken, en yüksek değer 2 mg/L BAP uygulamasında % 14,87 v/w oranı ile olduğu belirlenmiştir (Tablo 28). Öte yandan doğal fideler % 1,55 v/w ökaliptol ve % 3,34 v/w limonen içerirken, *in vitro* büyütülen fidelerde bu iki kimyasala rastlanmamıştır.

3.8.1.2. Oksinlerin Uçucu Yağ İçeriğine Etkisi

Genel olarak oksinlerin timol üzerinde ciddi bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. En yüksek değer %69,26 v/w ile 0,1 mg/L IAA uygulamasında gözlenmiştir (Tablo 29). Karvakrol değerlerine bakıldığında ise kontrol grubunun (%7,60 v/w) ve 2 mg/L NAA uygulamasının (%7,7 v/w) en yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Timokinon varlığı oksin uygulamalarında da saptanmıştır. %26,9 v/w olarak belirlenen en yüksek timokinon oranı 2 mg/L NAA uygulamasında ortaya çıkmıştır. Doğal fidelerde gözlenen ökaliptol sadece 1 mg/L NAA uygulamasında % 1,32 v/w oranında belirlenmiştir. Limonen ise doğal bireyler dışında hiçbir grupta saptanmamıştır (Tablo 29).

Tablo 28. Farklı sitokinin derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus* 'un uçucu yağ içerikleri*

	DOĞAL	KONTROL	BAP (mg/L)				KİN (mg/L)				2iP (mg/L)				TDZ (mg/L)			
			0,1	0,5	1	2	0,1	0,5	1	2	0,1	0,5	1	2	0,1	0,5	1	2
Timol	36,86	37,91	37,16	49,19	27,5	28,88	2,45	35,07	55,82	36,6	27,79	25,04	40,13	34,29	50,19	55,54	5,91	7,96
Karvakrol	3,31	7,60	1,23	2,15	11,04	7,12	_	2,51	2,15	9,32	7,29	1,35	1,71	1,43	12,53	4,76	_	_
Timokinon	_	6,24	9,36	4,31	9,22	14,87	4,6	3,72	3,22	6,74	13,3	9,24	5,27	6,19	9,29	10,54	3,06	2,22
β-Karyofilen	2,11	0,46	3,84	2,82	4,93	1,37	9,59	3,99	2,71	4,4	4,52	4,58	3,47	4,28	2,43	3,09	6,64	5,98
β-Bisabolen	0,47	1,62	8,61	4,17	6,38	7,03	21,46	8,5	6,6	_	4,52	10,45	9,97	11,52	4,43	4,65	15,24	21,08
Bis(2-etilheksil) fitalat	_	0,64	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
Mirsen	4,33	_	4,32	4,26	4,53	4,61	2,53	5,38	3,54	1,38	3,92	5,35	1,55	5,05	1,9	1,87	6,29	6,79
Para-simen	20,85	_	11,29	9,31	10,75	6,72	7,13	8,82	6,09	9,09	1,12	15,01	1,56	9,93	6,39	7,38	19,06	14,01
γ-Terpinen	8,52	_	5,38	7,31	7,00	6,09	13,26	9,43	4,92	5,95	6,40	6,53	9,23	8,1	2,15	2,21	8,94	5,7
Germakren-D	_	_	1,42	1,61	1,55	_	6,78	3,05	_	_	1,41	3,64	2,58	3,54	_	_	12,07	14,05
Timol metil eter	_	_	3,04	_	_	_	5,86	_	1,82	2,66	_	_	_	_	_	_	4,93	4,4
3-Oktanon (CAS)	2,41	_	_	2,54	_	2,42	_	_	_	4,91	_	_	_	_	1,6	1,32	_	_
α-Pinen	1,02	_	_	_	2,32	_	_	2,26	_	_	_	2,61	_	_	_	_	_	_
α-Terpinen	1,78	_	_	_	_	8,53	_	_	1,35	_	13,58	_	4,63	1,87	0,78	0,82	_	_
Bisiklogermakren	_	_	_	_	_	_	11,94	_	_	_	_	_	_	_	_	_	2,03	2,31
Ökaliptol	1,55																	
Limonen	3,34																	
Bilinmeyen	13,45	45,53	14,35	12,33	14,78	12,36	14,4	17,27	11,78	18,95	16,15	16,2	19,9	13,8	8,31	7,82	15,83	15,46

*1 gram örnekteki yüzde miktarı. Veriler 4 haftalık kültür süreci sonunda elde edilmiştir.

Tablo 29. Farklı oksin derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus* 'un uçucu yağ içerikleri *

	DOĞAL	KONTROL	IAA (mg/L)				IBA (mg/L)				NAA (mg/L)			
			0,1	0,5	1	2	0,1	0,5	1	2	0,1	0,5	1	2
Timol	36,86	37,91	69,26	58,12	64,42	62,21	28,49	64,64	61,14	65,05	61,3	48,31	48,61	30,01
Karvakrol	3,31	7,60	4,94	4,17	4,25	2,74	2,59	4,57	–	4,84	5,35	3,43	3,87	7,7
Timokinon	–	6,24	15,81	18,57	16,06	19,33	22,72	19,19	18,09	10,1	19,7	9,58	7,28	26,9
β-Karyofilen	2,11	0,46	1,74	3,12	2,05	2,12	5,13	1,09	1,88	3,42	1,21	2,41	2,57	3,75
β-Bisabolen	0,47	1,62	1,57	2,32	2,04	1,22	1,15	1,78	2,39	3,04	1,5	3,37	3,58	–
Bis(2-etilhekzil) fitalat	–	0,64	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Mirsen	4,33	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2,87	2,74	1,68
Para-simen	20,85	–	1,21	5,58	1,96	4,31	–	1,84	3,44	6,66	3,09	8,4	11,55	9,54
γ-Terpinen	8,52	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	6,45	5,14	1,88
Germakren-D	–	–	–	1,03	–	–	4,66	–	–	–	–	–	–	0,77
Timol metil eter	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,52	–	–	–
3-Oktanon (CAS)	2,41	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,39	–	2,37
α-Pinen	1,02	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
α-Terpinen	1,78	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,64	–
Dihidroaktinolid	–	–	0,26	–	–	–	0,95	–	–	–	–	–	–	–
Karyofilen oksid	–	–	0,29	0,48	0,49	–	–	0,54	0,74	0,54	1,21	–	–	–
γ Kadinen	–	–	–	0,69	–	–	–	0,48	0,62	–	0,51	–	–	–
γ-Muurolen	–	–	–	–	0,21	0,76	–	–	–	0,46	–	–	–	–
Kapronaldehid	–	–	–	–	–	0,68	3,17	–	–	–	–	–	–	–
2-Butenal	–	–	–	–	–	–	2,15	–	–	–	–	–	–	–
Karvone, (+)	–	–	–	–	–	0,4	–	–	4,17	–	–	–	–	–
Ökaliptol	1,55	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,32	–
Limonen	3,34	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Bilinmeyen	13,45	45,53	4,92	5,92	8,52	6,23	28,99	5,87	7,53	5,31	5,61	13,79	11,7	15,4

*1 gram örnekteki yüzde miktarı. Veriler 4 haftalık kültür süreci sonunda elde edilmiştir.

3.8.1.3. Fenilalanin, Tirozin ve N-asetil Sisteinin Uçucu Yağ İçeriğine Etkileri

Uygulanan maddeler BBD uygulamalarının aksine, 50 mg/L N-asetilsistein (% 40,68 v/w) hariç timol oranlarında artışa neden olmamıştır. Aynı durum karvakrol için de geçerlidir. En yüksek değer % 3,51 v/w ile 10 mg/L tirozin uygulamasında gözlenirken bu değer doğal bireylerdekine çok yakındır. Timokinon varlığı bazı öncül uygulamalarında saptansa da bu oran oldukça düşüktür (Tablo 30). Söz konusu BBD uygulamalarında gözlenmeyen ökaliptol ve limonene gelince, bu iki kimyasal tüm öncül uygulamalarında ortaya çıkmıştır. Ökaliptol % 2,04 v/w oranla en çok 50 mg/L fenilalanin uygulamasında iken, limonen % 4,66 v/w oranla en çok 10 mg/L N-asetilsistein uygulamasında ortaya çıkmıştır. Dikkat çeken artış 10mg/L Nasetilsistein grubundaki β -Karyofilen miktarında (% 21,38 v/w) ve 10 mg/L fenilalanin uygulamasındaki γ -Terpinen miktarında (% 20,49 v/w) gözlenmiştir.

Tablo 30. Fenilalanin, tirozin ve N-asetilsisteinin farklı derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus* 'un uçucu yağ içerikleri

	Doğal	Fenilalanin			Tirozin			N-asetilsistein		
		10mg/ L	50mg/ L	100mg /L	10mg/ L	50mg/ L	100mg /L	10mg/ L	50mg/ L	100mg /L
Timol	36,86	24,8	33,1	34,3	34,87	32,86	34,12	9,48	40,68	33,1
Karvakrol	3,31	2,81	0,94	1,03	3,51	3,14	0,99	0,61	1,17	1,14
Timokinon	–	0,74	2,89	2,83	1,05	1,57	1,75	0,22	1,13	–
β-Karyofilen	2,11	1,86	2,02	2	3,68	3,65	3,72	21,38	6,85	3,25
β-Bisabolen	0,47	3,41	4,5	4,63	3,72	4,05	4,02	–	3,71	3,9
Mirsen	4,33	6,15	5,75	5,69	5,26	5,08	5,91	10,78	6,21	5,04
Para-simen	20,85	16,66	19,67	19,96	19,53	18,42	18,67	19,66	16,39	18,87
γ-Terpinen	8,52	20,49	10,6	8,84	7,33	8,73	9,2	11,16	5,45	6,98
Germakren-D	–	–	–	–	–	–	–	–	1,17	–
3-Oktanon(CAS)	2,41	1,02	1,44	1,41	1,06	–	–	–	–	–
α-Pinen	1,02	3,24	2,94	3,06	4,01	4,23	3,52	0,89	2	3,2
α-Terpinen	1,78	4,32	2,61	2,64	2,65	2,75	2,56	2,28	1,8	2,54
Ökaliptol	1,55	1,93	2,04	2,1	1,6	1,85	1,7	0,67	1,39	1,45
α-Thujen	–	2,19	1,48	1,39	1,67	1,6	1,44	1,48	1,12	1,48
Linalool	–	–	1,43	–	–	1,25	1,3	0,97	–	1,16
Fenol,3-methoksi- 2,5,6-trimetil-	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2,37
Limonen	3,34	2,87	3,23	3,55	3,34	3,28	3,3	4,66	3,39	3,12
Bilinmeyen	13,45	7,51	5,36	6,57	6,72	7,54	7,8	15,76	7,54	12,4

*1 gram örnekteki yüzde miktarı. Veriler 4 haftalık kültür süreci sonunda elde edilmiştir.

3.8.1.4. Sukroz Derişimlerinin Uçucu Yağ İçeriğine Etkisi

Dört farklı sukroz derişiminin uçucu yağ içeriklerine etkisine bakıldığında, timol içeriğinin sukroz derişimi artıkkça düştüğü gözlenmiştir. % 1 sukroz içeren ortamda büyüyen fidelerdeki timol oranı % 40,57 v/w ile en yüksek değere ulaşmıştır. Ancak artan sukroz timol üzerinde ciddi düşüğe neden olmuştur. Karvakrol oranlarına bakıldığında en yüksek değer doğal fidelerde gözlenmiştir. Önceki uygulamaların aksine timokinon bu deneme gruplarının hiç birinde gözlenmemiştir. Ökalyptol ve limonen miktarları tüm gruplarda belirlenmiş ancak çok ciddi fark gözlenmemiştir. Ciddi artış γ -Terpinen'de gözlenmiştir. Doğal fidelerde % 8,52v/w iken, % 3 sukroz derişiminde yetişen fidelerde bu değer % 17,11 v/w'e yükseldiği belirlenmiştir (Tablo 31).

Tablo 31. Farklı sukroz derişimlerinde mikroçoğaltılan *Thymus leucotrichus* 'un uçucu yağ içerikleri

	DOĞAL		SUKROZ		
		%1	%2	%3	%4
Timol	36,86	40,57	29,71	27,59	29,67
Karvakrol	3,31	2,82	0,93	1,26	1,31
Timokinon	–	–	–	–	–
β-Karyofilen	2,11	2,38	4,26	2,02	2,31
β-Bisabolen	0,47	4,1	3,83	2,41	2,05
Mirsen	4,33	3,5	3,55	6,35	6,58
Para-simen	20,85	19,41	21,26	15,97	16,64
γ-Terpinen	8,52	5,67	4,7	17,11	14,04
Germakren-D	–	0,65	1,11	0,46	0,44
3-Oktanon(CAS)	2,41	–	–	–	–
α-Pinen	1,02	1,56	3,39	2,25	2,01
α-Terpinen	1,78	1,56	1,46	3,44	2,76
γ-Muurolen	–	0,4	0,2	–	–
Ökalyptol	1,55	1,16	1,75	1,54	1,43
α-Thujen	–	1,67	1,66	1,61	1,41
Linalool	–	–	–	1,33	1,47
Fenol, 3-methoksi- 2,5,6-trimetil-	–	6,46	8,2	–	–
Limonen	3,34	3,11	3,35	2,69	2,74
Bilinmeyen	13,45	4,98	10,64	13,97	15,14

*1 gram örnekteki yüzde miktarı. Veriler 4 haftalık kültür süreci sonunda elde edilmiştir.

4. TARTIŞMA

Mikroçoğaltım, bir çok bitki türünde olduğu gibi tıbbi ve aromatik bitkilerin de vejetatif olarak hızlı ve çok miktarda çoğaltılabilmesine olanak sağlayan bir üretim şeklidir. Tıbbi ve aromatik bitkilerin mikroçoğaltımı, sekonder metabolitlerin *in vitro* yöntemlerle çoğaltılmasının sağladığı faydaların yanı sıra, bitkiye yılın her döneminde ulaşılabilmesi ve daha kısa kültür süresine ihtiyaç duyulması, nesli tehlikede olan tıbbi bitkilerin korunması, üretilen bitkilerde fenotipik ve genotipik benzerliğin sağlanması (homojenite), zor üretilen türlerin daha kolay üretebilmesi gibi önemli avantajlar sağlar (Erkonyuncu ve Yorgancılar, 2015).

Bitkilerde büyüme ve gelişmenin meydana gelebilmesi için bir takım iç ve dış faktörler birlikte rol almaktadır (Kumlay ve Eryiğit, 2011). Bitkiler, büyüyüp gelişebilmek için hücreler arası kimyasal iletişime ihtiyaç duyarlar. Bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) bitkilerde hücreden hücreye iletişimi sağlayan temel yapılardır. Pratikte bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanımı şu şekilde özetlenebilir; olgunlaşmayı hızlandırmak, tohumların çimlenme gücünü artırmak, çiçeklenmeyi teşvik etmek veya geciktirmek, soğuğa dayanıklılığı artırmak, meyvelerde tohum oluşumunu artırmak, meyve iriliğini artırmak, bitkilerin hastalık ve zararlılara dayanıklılığını artırmak, yabancı ot kontrolünü sağlamak, dormansiyi kırmak, doku kültürü çalışmalarında kök-sürgün ve yumru oluşumunu teşvik etmek (Kumlay ve Eryiğit, 2011). Bu sebeplerden dolayı etkin bir büyüme ve gelişme sağlayabilmek için mikroçoğaltılan bitki dışarıdan bitki büyüme düzenleyicileri ile muamele edilir ve süreçlerin hızlanması sağlanır.

Sekonder metabolitler, bitkilerde çok önemli fonksiyonları olan karmaşık kimyasal bileşiklerdir. Bitki yaşamı için primer öneme sahip olmamakla birlikte bitki herhangi bir stres faktörü (UV ışını, herbisit, vb.) ile karşı karşıya kaldığında savunma mekanizması olarak bu bileşenleri sentezlenmeye başlarlar. Ayrıca, sekonder metabolitler bitkiyi büyüme koşullarındaki varyasyonlardan koruyarak bitki gelişimine yardım eden metabolik aktiviteleri etkilerler (Gueven ve Knorr, 2011). Ekonomik değer taşıyan bu 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). Biyoteknolojik çalışmalar sonucunda hücre doku kültürlerini kullanarak sekonder

metabolitlerin üretilmesi, ilaç ve gıda sanayinde kullanılması yönünde çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır (Rao ve Ravishankar, 2002).

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 üretilebiliyorsa ürünün miktarının artırılması, yani kültürü optimize etme olanağının araştırılması evrelerinin her biri bu süreçte dönüm noktalarıdır.

T. leucotrichus 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. leucotrichus* bitkisinin *in vitro*' da gelişim olanakları araştırılmıştır. Doğal ortamlarından *T. leucotrichus* tohumlarından başlatılan kültürlerde; ilk olarak tohumların çimlenmesi için en uygun besi ortamı belirlenmiş ve daha sonra oluşan fidelerden alınan eksplantlardan doğrudan organogenez ile fideler oluşturulmuştur. Çalışmanın bu aşamasında, kinetin, BAP, 2iP ve TZD, IAA, IBA ve NAA'nın 0,1; 0,5; 1 ve 2 mg/L derişimlerinin sürgün boyu, kardeşlenme sayısı, boğum sayısı, kök uzunluğu kök sayısı, yaş ağırlık ve kuru ağırlık üzerine etkileri belirlenmiştir. Ayrıca uygulanan bu bitki büyüme düzenleyicilerinin, bitkideki rosmarinik asit miktarına ve uçucu yağ içeriğine etkisi bakılmıştır.

In vitro çalışmalarda kullanılan besi ortamları bitki türlerine göre spesifiklik göstermektedir ve çalışılması planlanan bitki türlerinden alınan eksplantların kültür ortamlarına hızlı ve sağlıklı bir şekilde aktarılması da büyük önem arz etmektedir. Yürütülen tez çalışması kapsamında *T. leucotrichus* türüne ait tohumlar en uygun besi ortamını belirlemek amacıyla Murashige ve Skoog (MS), Gamborg (B5), Linsmaer ve Skoog (LS) ve Shake ve Hildebrandt (SH) besi ortamlarında herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisinin uygulanmadığı temel besi ortamlarında 30 gün süre ile kültüre alınmıştır. 4 hafta sonunda veriler çimlenme yüzdesi ve boy uzunluğu parametreleri açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. En uygun besi ortamının belirlenmesinden elde edilen sonuçlar LS ve SH besi ortamlarının *T. leucotrichus* türünün tohumlarının çimlendirilmesi için uygun olmadığını göstermiştir. Bu nedenle yüksek çimlenme oranı ve boy uzunluğu değerlerini veren MS ve B5 ortamları bitki büyüme düzenleyicisi

uygulamalarında bu türün tohumlarının nasıl bir çimlenme tepkisi vereceğini belirlemek amacıyla temel besi ortamı olarak kullanılmıştır. Her iki besi ortamına 1 mg/L BAP uygulandı ve sonuçlar 30 günün sonunda çimlenmeyüzdesi, sürgün boyu ve yaş ağırlık parametreleri açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

En yüksek çimlenme yüzdesi % 83,27 ile MS besi ortamından elde edilmiş ve B5 ortamından elde edilen çimlenme yüzdesi ile aralarında önemli derecede istatistiksel olarak fark oluşmuştur. Ekonomik değer taşıyan bu tarz bitki türlerinin mikroçoğaltım çalışmalarından elde edilen madde miktarları (yaş ve kuru ağırlık miktarları) en önemli parametreler arasındadır. En uygun besi ortamını belirlemek için uygulanan BAP çalışmalarında en yüksek yaş ağırlık yine 30,7 mg ile MS ortamından elde edilmiştir. Literatürde *T. leucotrichus* türünün *in vitro* çimlendirilmesine dair herhangi bir rapora rastlanmamıştır. Ancak *Thymus* cinsine ait farklı türler ile yapılan çalışmalar mevcuttur ve bu çalışmalarda araştırmacılar, denemelerinde MS ortamını kullandıklarını ve yüksek çimlenme oranlarını elde ettiklerini bildirmişlerdir. (Özüdoğru, 2011, Aicha vd., 2013).

Uygun Yüzey Sterilizasyon Süresinin Belirlenmesi amacı ile *T leucotrichus* türüne ait tohumlar ön muamele olarak 30 dk musluk suyunda yıkandı ve akabinde 30 sn %70'lik etanol (EtOH) çözeltilisi ile muamele edilmiştir. Son olarak en uygun yüzey sterilizasyon süresini belirlemek amacıyla 10, 15, 20, 25 ve 30 dk % 2'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltilisi ile muamele edilmiştir. En düşük kontaminasyon yüzdesi % 6,66 ile 30. dk.'dan elde edilmesine rağmen kararma oranının % 42,22 ile en yüksek değeri vermesi bu sterilizasyon süresinin bu türün tohumlarının sterilizasyonunda uygun olmadığını göstermektedir. Elde edilen tüm bu değerler 15. dk uygulamasının bu türün tohumlarının yüzey sterilizasyonunda hem kararma sağlamaması hem de kontaminasyon azlığı nedeni ile en etkili sterilizasyon süresi olduğunu göstermiştir. Yapılan pek çok çalışmada sterilizasyon materyali olarak NaOCl tercih edilmiştir (Daneshvar-Royandezagh vd., 2009, Affonso vd., 2009). Ancak bu araştırmalarda kullanılan süre ve NaOCl derişimi farklılık göstermektedir. Tohum yapısı, genotipik farklılıklar ve çalışma koşulları var olan çeşitliliğin nedeni olabilmektedir.

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 kısılmasına hem de üretilen miktarın artırılması sağlamaktadır. Bitki türleri *in vitro*

çalışmalarda uygulanan sitokinin çeşidine göre farklı büyüme değerleri ve farklı biyolojik olarak aktif bileşen (sekonder bileşikler) içerik değerleri vermektedirler. Bu yüzden sürgün çoğaltım aşamasında doğru sitokinin çeşidinin ve derişiminin belirlenmesi zorunludur.

Başlangıç kültürlerinden alınan *T. leucotrichus* türüne ait eksplantlar kinetin, BAP, 2iP ve TDZ'nin 0,0-0,1-0,5-1 ve 2 mg/L derişimlerini içeren MS besi ortamında aktarılmıştır. Sekizinci haftanın sonunda sürgün sayısı, sürgün boyu, boğum sayısı, yaş ve kuru ağırlık parametreleri açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen verilerde, sürgün sayısı incelendiğinde 1 mg/L BAP'ın en etkili olduğu gözlenmiştir. *T. piprella* ile yapılan bir çalışmaya göre BAP'nın çoklu sürgün oluşumunda kinetine göre daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, 1,0 mg/L derişimine kadar artan BAP derişiminin kardeşlenme sayısında artışa ve bu derişimden sonra azalmaya neden olduğunu belirlemişlerdir (Shabnum ve Wagay, 2011). Buna benzer olarak, bu tez çalışmasında, artan BAP derişimindeki sürgün boyunun, boğum sayısının ve sürgün sayısının 1 mg/L derişimine kadar arttığı ve bu derişimden sonra azaldığı gözlenmiştir. *Thymus persicus* ile yapılan bir başka çalışmada da sürgün sayısı bakımından BAP'ın TZD ve kinetine göre daha etkili olduğu gösterilmiştir (Bakhtiar vd., 2014).

Sürgün uzunluğu parametresi bakıldığında ise en yüksek değer kinetinin 0,1 mg/L (40,88 mm) ve 0,5 mg/L (40,16 mm) derişimlerinde gözlendi. *T. vulgaris* ve *T. hyemalis* ile yapılan çalışmalarda, sürgün uzamasında en etkili sitokininin kinetin olduğu belirlenmiştir (Ozudogru vd., 2011; Aicha vd., 2013). Ayrıca, Tatari Vernosefadrani vd., (2009), besi ortamlarının 2,0 mg/L kinetin ile desteklenmesinin sürgün uzamasını diğer derişimlerden daha fazla teşvik ettiğini rapor etmişlerdir. Öte yandan *T. bleicherianus* ile yapılan bir çalışmada bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamı, kinetin ve BAP içeren ortamlardan sürgün boyu bakımından daha etkili olmuştur. (Aicha ve Abdelmalek, 2014)

Doğrudan organogenez çalışmaları sonucunda incelenen parametrelerden bir tanesi de, elde edilen fidelerin % kuru ağırlıklarının belirlenmesi olmuştur. Yapılan bu tez çalışmasında yaş (697 mg) ve kuru ağırlık (61,3 mg) bakımından en etkili sitokinin TDZ'nin 1 mg/L derişimi olduğu belirlenmiştir Buna karşılık, TDZ'li MS besi ortamlarında üretilen fidelerde ciddi boyutlarda vitrifikasyon (camlaşma) görülmüştür. Zira camlaşma, *in vitro* çoğaltımda en önemli fizyolojik sorunlardan birisidir. Besin ortamındaki oksin, sitokinin, minarel madde, şeker ve agar miktarı camlaşmanın nedenlerini oluşturmaktadır

(Gabryszewska ve Hempel, 1985). Pasqualetto vd., (1992) ise camlaşmanın bazı morfolojik (hücrenin aşırı su alması, hücre duvarının yıkılması, klorofil eksikliği, yaprak yapısı ve besin kompozisyonu) ve ekolojik (agarın niteliği ve konsantrasyonu, sitokin konsantrasyonu, ortamdaki K ve Mg bileşikleri ve kültür kabı içerisindeki atmosferin durumu) etmenlere bağlı olduğunu bildirmiştir. Coelho ve arkadaşları (2012), bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamında *T. lotocephalus* fidelerinin sağlıklı bir biçimde geliştiklerini ve BAP eklenmesiyle camlaşma karşılaştıklarını bildirmişlerdir.

Tüm bu verilere bakıldığında *T. leucotrichus*'un sürgün boyu, sürgün sayısı vb fiziksel parametreler bakımından mikroçoğaltımda en etkili sitokininin kinetin olduğu sonucuna varılmıştır. Benzer olarak, pek çok araştırmada kinetin kekik türlerinin mikro çoğaltımı için en uygun sitokinin olduğunu göstermiştir (Ozudogru vd., 2011). Öte yandan *T. lotocephalus* (Coelho, 2012) ve *T. pepirella* (Shabnum, ve Wagay, 2011) ile yapılan çalışmalarda ise en etkili bitki büyüme düzenleyicisinin BAP olduğu ortaya konulmuştur.

Kök gelişimini gözlemlemek amacıyla, başlangıç kültürlerinden alınan *T. leucotrichus*'a ait eksplantlar 0,1-0,5-1,0 ve 2,0 mg/L IAA, IBA ve NAA derişimlerini içeren MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Veriler 8. haftanın sonunda kök uzunluğu, kök sayısı, sekonder kök sayısı ve köklenme yüzdesi parametreleri açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Köklenme yüzdesi bakımından IBA en etkili bulunurken, değişen derişimler arası istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir. Söz konusu kök uzunluğu olduğunda ise 1 mg/L IBA, 37,17 mm ile en etkili oksin olarak değerlendirilmiştir. Bu fiziksel parametreler göz önüne alındığında *T. leucotrichus*'un mikroçoğaltımında kök gelişimini en çok destekleyen oksinin IBA olduğu ortaya konulmuştur. *T. vulgaris* ve *T. percicus* ile yapılan bazı araştırmalarda da IBA'nın IAA ve NAA 'ya oranla köklenmeyi daha çok desteklediği gösterilmiştir (Ozudoğru vd.,2011, Bakhtiar vd., 2014).

Diğer taraftan, *T. lotocephalus* 'un köklenmesini destekleyen oksin IAA iken, *T. hyemalis*'de kök oluşumu NAA tarafından daha çok uyarılmıştır (Coelho vd., 2012, Aicha vd., 2013).

Uygulanan oksinlerin köklenme üzerindeki değişik etkilerinin, kekik türünden, uygulanan oksinin derişim aralığından, içsel oksin/sitokinin dengesinden, dıştan uygulanan oksinin bitki dokuları tarafından emilme yeteneğinden kaynaklı olduğu düşünülebilir. (de Klerk, 2002).

Büyüme ve gelişme amaçlı uygulanan tüm bu bitki büyüme düzenleyicileri *T. leucotrichus*' un rosmarinik asit içeriğini de etkilemiştir. Doğadan toplanan fidelerde 1 gr

kuru ağırlıktaki RA miktarı 6,78 mg/g kuru ağırlık iken standart MS besiyerinde yetiştirilen fidelerde bu değer 6,88 mg/g kuru ağırlık olduğu saptanmıştır. Besiyeriye eklenen BBD'ler, RA içeriğine hem olumlu hem de olumsuz katkı sağlamıştır. Tüm deneme grupları arasında en etkili BBD, 16,18 mg/g kuru ağırlık RA içeriği ile 0,1 NAA oldu. NAA' nın RA üretimini olumlu etkilediğini kanıtlayan bir çalışmada, De-Eknamkul ve Ellis (1985), *in vitro* kültürde uygulanan NAA'in RA sentezini başlatmakla kalmayıp aynı zamanda sentez oranını da maksimize ettiğini göstermiştir (De-Eknamkul ve Ellis, 1985). Oksin grubu büyüme düzenleyiciler RA miktarını sitokin grubu büyüme düzenleyicilere oranla daha çok arttırmıştır. Oksinlerin RA oranı üzerindeki bu olumlu etkisi başka çalışmalarda da gösterilmiştir. Örneğin, *Salvia officinalis* (Santos-Gomes ve Fernandes-Ferreira, 2003), *Satureja hortensis* (Tepe and Sokmen, 2007), *Thymus lotocephalus* (Costa vd., 2012), *Lavandula viridis* (Costa vd., 2012), gibi türlerin hücre süspansiyon ya da kallus kültürlerinde ve *Eryngium maritimum* (Kikowska vd., 2014)'un mikroçoğaltımında RA artışı oksinlerle ilişkilidir.

Bu tez çalışmasında ölçülen bir diğer parametre ise uçucu yağ profilleridir. Uygulanan oksin ve sitokin grubu büyüme düzenleyicileri *T. leucotrichus* bitkisinin uçucu yağ içeriğinde de değişikliği neden olmuştur. Doğal yetişen fidelerde esas bileşenin timol (% 36,86 v/w) olduğu belirlenmiştir. Uygulanan bitki büyüme düzenleyicilerinin timol içeriğini % 69,26 v/w'ya (0,1 mg/L IAA denemesinde) kadar çıkardığı gözlenmiştir. 2005 yılında yapılan çalışmada *T. danenensis* ve *T. kotschyanus* bitkilerinin de esas bileşenin timol olduğu belirlenmiştir (Nickavar vd., 2005). Karvakrol miktarı ise doğal fidelerde % 3,31v/w iken tüm uygulama grupları bu değeri arttırdı ve en yüksek değer 0,1mg/L IBA uygulandı % 12,53 v/w ile gözlenmiştir. RA değerlendirmesine benzer olarak oksin grubu büyüme düzenleyicileri timol ve karvakarol içeriğini sitokin grubu büyüme düzenleyicilerine göre daha çok arttırmıştır. Oksinlerin sekonder metabolizmayı daha aktif hale getirmesi, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu uyarımasından kaynaklı olabilmektedir. 2001 yılında yapılan bir çalışmada, kök gravitropizma hareketinin, yer çekimi oksinlerin asimetric dağılımına neden olduğu ve bunun neticesinde gravitropizmaya aracılık edecek reaktif oksijen türlerinin oluşumu uyarıldığı gözlenmiştir (Joo vd., 2001). Bu araştırmada ortaya çıkan bir parametre de timokinon varlığıdır. Timokinon çörek otu tohumunun esas bileşenidir. Analjezik, antipiretik, antimikrobiyal ve antineoplastik aktiviteye sahiptir (Ali ve Bludan, 2003). Hatta bir çalışmada timokinonun hafif epilepside antikonvülsan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Ezz vd, 2011).

Nigella sativa tohumlarının en önemli bileşiği olan TQ ilk olarak 1959 yılında sentez edilmiştir (Al-Ghamdi, 2001). Timokinon uçucu yağda % 27.8-57.0 v/w oranında bulunur (Hosseinzadeh vd., 2004). *Thymus caespititius* ile 2013 yılında yapılan çalışmada doğal fidelerde eser miktarda da (<0,05) olsa timokinon maddesine rastlanmıştır. Ancak *in vitro* ortamda büyütme timokinon miktarında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. (Mendes vd., 2013).

Bu çalışmada *T. leucotrichus* 'un doğal fidelerinde timokinon gözlenmez iken uygulanan BBD ilaveleri neticesinde, % 6,24 v/w ile % 26,9 v/w aralığında miktar değişkenliği göstermiştir.

Pek çok çalışmada *in vitro* büyütülen fidelerde doğal fidelere oranla uçucu yağ miktarlarının arttığı gözlenmiştir. Arafeh (1999) *in vitro* büyütülen *O. vulgare* fidelerinin doğala kıyasla 6 kat daha fazla uçucu yağ içerdiğini göstermiştir. Mikroçoğaltım koşullarının bitkilerde bir nevi strese neden olduğunu düşünen araştırmacılar (Casado vd., 2002) olmasına karşın, doğal koşullardaki yüksek ışık, septik çevresel koşullar, düşük bağıl nem oranı gibi faktörlerin bitkilerde daha fazla stres oluşturacağını öne süren araştırmacılar da mevcuttur (Juliani vd., 1999).

Tez kapsamında araştırılan bir diğer kriter de sukroz derişiminin büyüme, gelişme ve RA miktarı ile uçucu yağ içeriklerine etkisi olmuştur. Sürgün boyunu en çok arttıran konsnatrasyon %1 sukroz, sürgün sayısı için en etkili grup % 3 sukroz olmuştur. Benzer olarak *T.hyemalis* ile yapılan çalışmada da sürgün sayısını en çok % 3 sukroz konsnatrasyonu arttırmıştır (Aicha vd., 2013). % 4 sukroz derişim en yüksek yaş ve kuru ağırlık değerini verirken, 19,10 mg/g kuru ağırlık değer ile de en fazla RA miktar artışını da sağlamıştır. Karam ve arkadaşlarının (Karam vd., 2003) *Salvia fruticosa* ile yaptıkları çalışmada da % 4 sukroz derişiminin , yaş ve kuru ağırlık ile RA miktarını en çok arttıran oran olduğunu ortaya koymuştur. Bir başka çalışmada da artan sukroz derişiminin sekonder metabolizmayı primer metabolizmadan daha çok etkilediği sonucunu ortaya koymuştur (Hippolyte vd., 1992).

Bitki doku kültürlerinde üretilmesi amaçlanan bir metabolitin biyosentez mekanizması biliniyorsa kültürleri sentez yolundaki bu maddelerle besleyerek enzimatik yollar uyarılabilir ve böylelikle hedef metabolitin üretimi artırılabilir (Sökmen ve Gürel, 2001).

Büyüme, gelişme, RA miktarı ve uçucu yağ profili üzerindeki etkilerine bakmak amaçlı fenilalanin, tirozin ve N-asetilsistein kimyasal maddelerin 10, 50 ve 100 mg/L

derişimleri de denenmiştir. Genel olarak, fenilalanin uygulaması ölçülen kriterlerde kontrolden daha fazla büyüme ve gelişmeyi desteklemiştir. 10 mg/L fenilalanin derişimi sürgün sayısı, sürgün boyu, yaş ve kuru ağırlık parametreleri bakımından en etkili grup olmuştur. Benzer şekilde 10 mg/L tirozin uygulaması da yetiştirilen fidelerin, sürgün boyu, yaş ve kuru ağırlıkları da kontrol grubu bitkilerinden daha fazla çıkmıştır. Amino asitlerin büyüme üzerindeki bu pozitif etkisi Goss tarafından izah edilmiştir. Bu araştırmacı, karbonhidratlar yetersiz kaldığında ortama ilave edilen aminoasitlerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılacağını göstermiştir. Bu sürecin, amino asitin yapısında olan amonyak ve organik asitin serbest kalması ve organik asitin Kreb's döngüsüne katılması sonucu olduğunu öne sürmüştür (Goss, 1973). Ayrıca amino asitlerin serbest nitrojen kaynağı olduğu ve bunun ortama ilave edilen inorganik nitrojenden daha hızlı ve etkin biçimde hücreler tarafından alındığını gösteren araştırmalar da mevcuttur (Thon vd., 1981). Yapılan fenilalanin ve tirozin denemelerinde ortaya çıkan sonuçlara benzer olarak, *Ocimum africanum* (Yousef vd.,2004), *Mentha piperita* (Youssef vd., 2004), *Pelargonium graveoleus* (Mona ve Talaat, 2005) türleri ile yapılan uygulamalarda amino asitlerin vejetatif büyümeyi arttırdığı gözlenmiştir. Büyüme üzerindeki bu uyarıcı etkinin, fenilalanin gibi bazı aminoasitlerin giberellin biyosentesiyle ilişkisinden kaynaklı olabildiği de öne sürülür (Waller ve Nawacki, 1978). Rosmarinik asitin öncülleri (Sang vd., 2008) olan fenilalanin ve tirozin uygulaması neticesinde, kontrole oranla rosmarinik asit miktarında artış gözlenmiştir. 25 mg/L fenilalanin derişimi 10,88 mg/g kuru ağırlık değeri ile en yüksek RA ölçümünü vermiştir. Benzer olarak, *Mentha arvensis* sürgün kültürlerinde en yüksek rosmarinik asit içeriği 30 mg/L fenilalanin içeren besi ortamında gözlenmiştir (Phatak ve Heble, 2002). Tirozin uygulamasında ise 10 ve 50 mg/L derişimleri en etkili RA (12,03 mg/g kuru ağırlık ve 13,14 mg/g kuru ağırlık) artışını sağlamıştır. Bu iki grup arasında istatistiki bir fark gözlenmemiştir. *In vitro* yetişen *T. leucotrichus* fidelerinin RA miktarını arttırmak amaçlı denenilen bu öncül aminoasitlerden tirozinin daha etkin olduğu gözlenmiştir. Benzer olarak, *Mentha piperita* da yapılan bir araştırmada da tirozinin fenilalaninden daha etkin bir şekilde rosmarinik asit ürettiği ortaya konulmuştur (Roy ve Mukhopadhyay, 2012).

In vitro doku kültürlerinde yapılan araştırmalar incelendiğinde, N-asetil sistein uygulamalarına rastlanmamıştır. Bu bakımdan bu çalışma bir ilk niteliğindedir. *T. leucotrichus* 'un mikroçoğaltım aşamasında besiyerine eklenen 10 mg/L, 50 mg/L ve 100 mg/L NAC derişimleri incelendiğinde, derişim artışının büyüme ve gelişimle ilgili

parametreleri olumsuz etkilediği gözlenmiştir. 10 mg/L NAC içeren besiyerinde yetiştirilen fidelerin, en fazla sürgün sayısına, en uzun sürgün boyuna ve en fazla yaş ve kuru ağırlığa sahip olduğu belirlenmiştir. Bazı bitkilerde var olduğu kanıtlanan NAC proteinlerinin stres koşullarında üretildiği ve bitki savunmasında görev aldığı doğrulanmıştır (Puranik vd., 2012). Yapılan araştırmalarda NAC uyarımının strese dayanıklılık sağlarken bitki verimini de arttırdığını göstermiştir (Hu vd., 2006, Jeong vd, 2010). Ancak tersi gözlenen çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, çeltikte yapılan bazı denemelerde, NAC genleri uyarılmış ve büyüme üzerinde herhangi bir pozitif etki sağlamaksızın strese tolerans geliştirilmiştir (Zheng vd., 2009, Takasaki vd., 2010). NAC uygulamalarında araştırılan diğer kriter ise rosmarinik asit miktarına etkisidir. Uygulanan NAC derişimlerinden rosmarinik asit içeriğini en çok arttıran grup, 16,28 mg/g ka değeri ile 50 mg/L NAC derişimi olmuştur. Kontrol grubunun rosmarinik asit içeriğine bakıldığına (8,74mg/g ka) bu uygulama grubunda ciddi bir rosmarinik asit artışı gözlenmiştir. NAC proteinlerinin strese tolerans oluşturma özelliğinden dolayı rosmarinik asit miktarını arttırdığı düşünülebilir (Nakashima vd., 2012). Fakat bunun nasıl gerçekleştirildiği ve hangi metabolik yolların kullanıldığı, araştırılması gereken bir olgudur. Sentez basamaklarının ortaya çıkarılması ve NAC ile rosmarinik asit ilişkisinin değerlendirilmesi için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar neticesinde, *T. leucortichus* fidelerinin uçucu yağ çeşit ve miktar değişimleri de incelenmiştir. Fenil alanin, tirozin, NAC ve sukroz uygulamalarına bakıldığında uçucu yağ içeriklerinin doğal fidelerin içeriğinden genel olarak pek bir fark göstermediği saptanmıştır. Ancak bazı uygulama gruplarında uçucu yağ bileşenlerinden bazılarında ciddi miktar artışı saptandı. Örneğin γ -terpinen doğal fidelerde % 8,52 v/w iken, 10 mg/L FA uygulaması ile % 20,49 v/w 'a yükselmiştir. Benzer olarak β -karyofilen 10 mg/L NAC uygulamasında % 2,11 v/w 'den % 21,38 v/w'e yükselmiştir. Bu denli artışların nedenini açıklamak oldukça zor bir durumdur. Çünkü uçucu yağ karışımları genellikle 20 den fazla düşük moleküler ağırlıklı bileşen içerirler ve bu bileşenler kendi aralarında sürekli değişime uğrarlar (Javad vd., 2017). Bu değişimin nasıl olduğu ve bileşenlerin birbirine dönüşümünde görev alan enzimlerin ortaya konulması elzem bir durumdur. Bu kriterler bilinmediğinden dolayı uygulaması yapılan fenilalanin, tirozin, NAC ve sukroz denemelerinin sonuçları hakkında net bir kanıya varmak doğru değildir.

5. SONUÇLAR

- 1- Başlangıç kültürlerini belirlemek amaçlı denenen 4 farklı besi yeri arasından en uygun olanı MS temel besi ortamı olarak belirlenmiştir.
- 2- Uygun sterilizasyon süresinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerde 15. dk uygulamasının bu türün tohumlarının yüzey sterilizasyonunda en etkili sterilizasyon süresi olduğunu göstermiştir.
- 3- Yapılan sürgün çoğaltımı çalışmalarında, en uzun sürgün boyu 0,1 ve 0,5 mg/L kinetin (40,16 mm ve 40,88 mm), en fazla sürgün sayısı 3,3 adet ile 1 mg/L BAP, en fazla boğum sayısı 1 mg/L ve 2 mg/L 2iP (sırası ile 5,71 ve 5,9) en fazla yaş (697 mg) ve kuru (61,3 mg) ağırlık ise 1 mg/L TDZ denemelerinde gözlenmiştir.
- 4- Oksinlerin köklenme üzerine etkilerine bakıldığında ise IBA'nın diğer oksin gruplarından köklenme açısından daha etkili olduğu belirlenmiştir.
- 5- Doğadan toplanan örneklerde rozmarinik asit miktarının 6,78 mg olduğu belirlenirken, denenen BBD gruplarında yetiştirilen fidelerde en yüksek rozmarinik asit içeriği 16,18 mg/g kuru ağırlık değeri ile 0,1mg/L NAA içeren uygulama grubunda gözlenmiştir.
- 6- Sitokin ve oksinlerin büyüme/ gelişme ve rozmarinik asit miktarları göz önüne alınarak sonraki basamaklar için standart bir besiyeri ortamı belirlenmiştir. Bu ortam için seçilen 2 mg/L 2iP ve 0,1 mg/L NAA içeren MS besi yeri olmuştur.
- 7- Belirlenen kontrol ortamına ayrı ayrı 10, 50, 100mg/L derişimlerinde fenil alanin, tirozin ve N-asetilsistein ilave edilip *T.leucotrichus* sürgünleri 4 hafta büyütülmüş ve sürgün sayısı, yaş ve kuru ağırlık bakımından en etkili grup 10 mg/L N-asetilsistein, sürgün boyunu açısından ise 10 mg/L fenilalanin derişimi olmuştur.
- 8- Fenilalanin, Tirozin ve N-asetilsistein denemelerinde yetiştirilen fidelerin rozmarinik asit miktarlarına bakıldığında, 50 mg/L N-asetilsistein uygulamasının 16,28 mg/g kuru ağırlık değeri ile en etkili grup olduğu gözlenmiştir.
- 9- Besiyeri ortamının sukroz miktarının değışimi büyüme gelişmeyi de rozmarinik asit üretimini de etkilemiştir. En çok sürgün sayısı 4,47 adet ile % 3 sukroz derişiminde gözlenirken, en fazla yaş (114,8 mg) ve kuru (18,05 mg) ağırlık değeri % 4 sukroz grubunda belirlenmiştir. Sürgün boyu sukroz derişim artışından olumsuz etkilenmiş ve en

yüksek değer 34,00 mm ile % 1 sukroz içeren deneme grubunda saptanmıştır. Sürgün boyunun aksine rozmarinik asit içeriği derişim artışından olumlu etkilenmiş ve 19,10 mg/g kuru ağırlık değeri ile en yüksek veri % 4 sukroz denemesinde ortaya çıkmıştır.

10- Tez çalışma kapsamında ölçülen diğer parametre ise uçucu yağ miktarları ve çeşitleridir.

a-BBD uygulamaları sonucunda en yüksek timol içeriği % 69,26 v/w ile 0,1 mg/L IAA denemesinde gözlenirken, en yüksek karvakrol içeriği % 12,53 v/w değeri ile 0,1 mg/L TDZ grubunda saptanmıştır. Doğal fidelerin aksine BBD uygulamaları ile timokinon varlığı ortaya çıkmıştır. Bu değerli kimyasal 2 mg/L NAA denemesinde % 26,9 v/w 'a kadar yükselmiştir. Öte yandan doğal fidelerde saptanan ökaliptol (% 1,55 v/w) ve limonen (% 3,34 v/w) hiçbir BBD uygulama grubunda belirlenmemiştir.

b- Fenil alanin, tirozin ve N-asetilsistein denemelerindeki, timol, karvakrol, limonen ve ökaliptol değerlerinin doğala çok yakın olduğu gözlenmiştir. Doğal fidede % 8,52 v/w oranında bulunan γ -terpinen, 10 mg/L fenilalanin uygulamasıyla % 20,49 v/w' a yükselirken, β -karyofilen miktarı 10mg/L N-asetilsistein uygulamasıyla % 2,11 v/w 'den % 21,38 v/w'e kadar çıkmıştır.

c- Sukroz uygulamalarında da timol, karvakrol, limonen ve ökaliptol verilerinin doğala çok yakın olduğu belirlenmiştir. γ -terpinen miktarının, doğal fidelerden farklı olarak, % 3 sukroz uygulamasında % 17,11 v/w' e kadar yükseldiği gözlenmiştir.

6. ÖNERİLER

Thymus leucotrichus HAL. tohumlarından başlatılan mikroçoğaltımı ve elde edilen fidelerin rosmarinik asit içeriği ve uçucu yağ profillerini çıkarılıp doğalıyla kıyaslanmasını amaçlayan 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.

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 protokoller ışığında, diğer *Thymus* türlerinin de *in vitro* ortamlarda üretimi yapılabilir.

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

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

- Abd El-Aziz, N. G. ve Balbaa, L. K., 2007. Influence of Tyrosine and Zinc on Growth, Flowering and Chemical Constituents of *Salvia farinacea* Plants. Journal of Applied Sciences Research, 3,11, 1479-1489.
- Abdin, M. Z., Israr, M., Rehman, R. U. ve Jain, S. K., 2003. Artemisinin, a Novel Antimalarial Drug: Biochemical and Molecular Approaches for Enhanced Production. Planta Med, 69,4, 289-299.
- Affonso, V., Bizzo, H., Lage, C. L. S. ve Sato, A., 2009. Influence of Growth Regulators in Biomass Production and Volatile Profile of in Vitro Plantlets of *Thymus vulgaris* L., J. Agric. Food Chem.,57, 6392–6395.
- Aicha, N. ve Abdelmalek, E. M., 2014. Rapid in Vitro Regeneration and Clonal Multiplication of *Thymus Bleicherianus* Pomel, a Rare and Threatened Medicinal and Aromatic Plant in Morocco. Med Aromat Plants 3, 145.
- Aicha, N., Dalila, B., Abdesalem, E. K. ve Abdelmalek E. M., 2013. An Efficient and Rapid *in vitro* propagation system of *Thymus hyemalis* lange, a wild medicinal and aromatic plant of mediterranean region. International Journal of Pharma Bioscience and Technology.1, 3, 118-129.
- Al-Ghamdi, M. S., 2001. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. J Ethnopharmacol. 76, 1, 45-48.
- Ali, B. H. ve Blunden, G., 2003. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. Phytotherapy Research 17, 299–305.
- Arafeh, R. M., 1999. Factors affecting in vitro propagation, callusing, cell suspension culture and secondary metabolites production in sweet marjoram *Origanum vulgare* L. and Syrian marjoram *Majorana syriaca* L. Rafin (*Origanum syriacum* L.). M.Sc. Thesis. Jordan University of Science and Technology, Irbid, Jordan.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M. ve Butler, J., 1989. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid, Free Radic. Biol. Med. 6, 593–597.
- Aydın, Ç. ve Mamnadov, R., 2017. İnsektisit Aktivite Gösteren Bitkisel Sekonder Metabolitler ve Etki Mekanizması, Marmara Pharmaceutical Journal 21, 30-37.
- Bacila, I., Coste, A., Halmagyı, A. ve Delu, C., 2010. Micropropagation of *Hypericum maculatum* Cranz an important medicinal plant. Romanian Biotechnological Letters, 15, 1, 86-91.
- Bahtiyarca-Bağdat, R., 2006. Use of medicinal and aromatic plants and cultivation of sage (*Salvia officinalis* L.) and oregano, thyme species. Tarla bitkileri merkez araştırma enstitüsü Dergisi. 15, 1-2, 19-28

- Bakhtiar, Z., Mirjalili, M., Sonboli, A., Farimani, M., ve Ayyari, M., 2014. In vitro propagation and phytochemical assessment of *Thymus persicus*. Biologia 69, 5, 594–603.
- Bakkali, F., Averbeck, S. Averbeck, D. ve Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology 46, 446–475.
- Başer, K. H. C., Özek, T., Tümen, G. ve Sezik, E., 1994. Ticari Önemi Olan Türk Origanum Türlerinin Uçucu Yağları. TAB Bülteni 10, 28-32.
- Başer, K. H. C., Demirci, B., Iscan, G., Hashimoto, T., Demirci, F., Noma, Y. ve Asakawa, Y., 2006. The essential oil constituents and antimicrobial activity of *Anthemis aciphylla* var. *discoidea* BOISS. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 54, 222–225.
- Başer, K. H. C., Kirimer, N., Ermin, N., Özek, T. ve Tümen G. ,1996c. Composition of essential oils from three varieties of *Thymus praecox* Opiz growing in Turkey. J. Essent. Oil Res. 8, 319–321.
- Başer, K. H. C., Kirimer, N., Tümen, G. ve Duman, H., 1998. Composition of the essential oil of *Thymus canoviridis* Jalas. J. Essent. Oil Res., 10, 199–200.
- Başer, K. H. C., Kürkçüoğlu, M., Ermin, N., Tümen, G. ve Malyer, H., 1999. Composition of the essential oil of *Thymus pseudopulegioides* Klokov et Des.-Shost. from Turkey. J. Essent. Oil Res., 11, 86–88.
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S., Telci, İ., 2010. “Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretiminin Arttırılması 400 Olanakları”. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-I; 437–456, Ankara.
- Bekircan, Ç., Mustafa Cüce, M. ve Sökmen, A., 2014. Antifeedant Activity of the Essential Oils from Four Different Lamiaceae Species against *Agelastica alni* L. (Coleoptera: Chrysomelidae), Advances in Zoology and Botany 2, 4, 57-62.
- Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R., ve Bandyopadhyay, U., 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). Current Science. 82, 11, 1336-1345.
- Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S. ve Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 161, 5, 839–851.
- Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L. ve Hickman, R., 2011. High-resolution temporal profiling of transcripts during Arabidopsis leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. Plant Cell, 23, 873–894.
- Casado, J. P., Navarro, M. C., Utrilla, M. P., Martí'nez, A. ve Jime'nez, J., 2002. Micropropagation of *Santolina canescens* Lagasca and *in vitro* volatiles production by shoot explants. Plant Cell Tiss Org Cult, 69, 147–153.
- Ceylan A., 1987. Tıbbi Bitkiler 2 (Uçucu Yağ İçerenler), Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 481,188, İzmir.

- Cheng, S. S., Chang, H. T., Wu, C. L. ve Chang, S. T., 2007. Anti-termitic activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. Bioresour. Technol., 98, 456–459.
- Coelho, N., Goncalves, S., Gonza'lez-Benito, E. ve Romano, A., 2012. Establishment of an in vitro propagation protocol for *Thymus lotocephalus*, a rare aromatic species of the Algarve (Portugal). Plant Growth Regul., 66, 69–74.
- Costa, P., Gonçaves, S., Valentão, P., Andrade, P. B., Coelho, N. ve Romano, A., 2012. *Thymus lotocephalus* wild plants and in vitro cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. Food Chemistry, 135, 1253–1260.
- Daneshvar-Royandezagh, S., Khawar, K. M. ve Ozcan, S., 2009. In Vitro Micropropagation of Garden Thyme (*Thymbra spicata* L. Var. *Spicata* L.) Collected from Southeastern Turkey using Cotyledon BOĞUMe., Biotechnology & Biotechnological Equipment, 23, 3, 1319-1321.
- Davis, P.H., 1982. Flora of Turkey and the East Aegean Island, 7, Univ. Press, Edinburg, 349.
- de Klerk G-J., 2002. Rooting of microcuttings:theory and practice. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant., 38, 5, 415–422.
- de-Eknamkul, W. ve Ellis, B. E., 1985. Effects of auxins and cytokinins on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. Plant Cell Rep., 4, 50–53.
- Duschatzky, C. B., Possetto, M. L., Talarico, L. B., Garcia, C. C., Michis, F., Almeida, N. V., De Lampasona, M. P., Schuff, C. ve Damonte, E. B., 2005. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. Antivir. Chem. Chemother., 16, 247– 251
- Duval, M., Hsieh, T. F., Kim, S. Y. ve Thomas, T. L., 2002. Molecular characterization of AtNAM: a member of the Arabidopsis NAC domain superfamily. Plant Mol. Biol., 50, 237–248.
- Essawi, T. ve Srour, M., 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology, 70, 3, 343- 349.
- Ezz, H. S., Khadrawy, Y. A. ve Noor, N. A., 2011. The neuroprotective effect of curcumin and Nigella sativa oil against oxidative stress in the pilocarpine model of epilepsy: a comparison with valproate. Neurochem Res., 36, 11, 2195-204.
- Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M.S., 2011. Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi. Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi, 11, 1, 52 – 67.
- Gabryszewska, E. ve Hempel, M., 1985, The influence of cytokinins and auxins on *Alstroemeria* in tissue culture. Acta Hort., 167, 295-300.

- 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.
- Gezgin, D. 2006. Bitki Mitosları. Sel Yayıncılık.
- Goss, J. A., 1973. Amino acid synthesis and metabolism physiology of plants and their cell. P.202. Pergamon Press INC, New York, Toronto, Oxford, Sydney, Braunschweig.
- Gueven, A. ve Knorr, D., 2011. Isoflavonoid production by soy plant callus suspension culture. J Food Eng, 103, 237-243.
- 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.
- Hippolyte, I., Marin, B., Baccou, J. C., ve Jonard, R., 1992. Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L., Plant Cell Reports, 11, 109-112.
- Hoffer, E., Baum, Y., Tabak, A. ve Taitelman, U., 1996. N-acetylcysteine increases the glutathione content and protects rat alveolar type II cells against paraquat-induced cytotoxicity, Toxicol. Lett., 84, 7-12.
- Hooker, C. W., Lott, W. B. ve Harrich, D., 2001. Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase target distinct phases of early reverse transcription. Journal of Virology, 75, 3095-3104.
- Hosseinzadeh, H. ve Parvardeh, S., 2004. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. Phytomedicine, 11, 1, 56-64.
- Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q. ve Xiong, L., 2006. Overexpressing a NAM, ATAF and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103, 12987-12992.
- Huang, S. S. ve Zheng, R. L., 2006. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. Cancer Lett., 239, 271-280.
- Javad, S. R., Sureda, A., Tenore G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Rosa Tundis, R., Monica, R., Adedayo, L., Ademiluyi, O., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S. A., ve Iriti, M., 2017. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. Molecules, 22, 70.
- Jeong, J. S., Kim, Y. S., Baek, K. H., Jung, H., Ha, S. H., Choi, Y., Kim, M., Reuzeau, C. ve Kim, J. K., 2010. Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. Plant Physiol., 153, 185-197.
- Joo, J. H., Bae, Y. S. ve Lee, J.S., 2001. Role of Auxin-Induced Reactive Oxygen Species in Root Gravitropism. Plant Physiology, 126, 3, 1055-1060.

- Juliani, H. R. Jr, Koroch, A. R., Juliani, H. R. ve Trippi, V. S., 1999. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. Plant Cell Tiss Org Cult., 59, 175–179.
- Julsing, M. K., Rijpkema, M., Woerdenbag, H., Quax, W. ve Kayser, O., 2007. Functional analysis of genes involved in the biosynthesis of isoprene in *Bacillus subtilis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 75, 6, 1377–1384.
- Karam, N. S., Jawad, F. M., Arikat, N. A. ve Shibli, R. A., 2003. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73, 117–121.
- Kasumov, F. Y. ve Gavrenkova, S. I., 1985. *Thymus transcaucasicus* Ronn. Promising essential oil containing plant of Azerbaijan flora. Dokl. Akad. Nauk Az. SSR, 41, 56–59.
- Kendir, G. ve Güvenç, A. 2010. Etnobotanik ve Türkiye’de Yapılmış Etnobotanik Çalışmalara Genel Bir Bakış. Hacettepe Üniv. Eczacılık Fak. Dergisi, 30, 3, 49-80.
- Kikowska, M., Thiem, B. ve Sliwinska, E., 2014. The Effect of Nutritional Factors and Plant Growth Regulators on Micropropagation and Production of Phenolic Acids and Saponins from Plantlets and Adventitious Root Cultures of *Eryngium maritimum* L. J Plant Growth Regul., 33, 809.
- Kim, S. G., Lee, A. K., Yoon, H. K. ve Park, C.M., 2008. A membrane-bound NAC transcription factor NTL8 regulates gibberellic acid-mediated salt signaling in Arabidopsis seed germination. Plant J. 55, 77–88.
- Kim, Y. S., Kim, S. G., Park, J. E., Park, H. Y. ve Lim, M. H., 2006. A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in Arabidopsis. Plant Cell, 18, 3132–3144.
- Koçyiğit, M. 2005. Yalova ilinde Etnobotanik Bir Arastırma, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kokkini, S., Karaousou, R., Dardioti, A., Krigas, N. ve Lanaras, T., 1997. Autumn essential oils of Greek Oregano. Phytochemistry, 44, 883.
- Könemann, 1999. The Illustrated A-Z of over 10,000 Garden Plants and How to Cultivate them. Botanica, Gordon, 885. Cheers Publication: Hong Kong.
- Kumar, P., 2004. Valuation of medicinal plants for pharmaceutical uses. Curr.Sci., 86, 7, 930-937.
- Kumlay, A. M. ve Eryiğit, T., 2011. Bitkilerde Büyüme ve Gelişmeyi Düzenleyici Maddeler: Bitki Hormonları. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 1, 2, 47-56.
- Lee, J., Kim, Y. S. ve Park, D., 2007. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signalling., Biochem Pharmacol., 74, 960-968.

- Lin, Y. L., Chang, Y., Kuo, Y. H. ve Shiao, M. S., 2002. Anti-lipid-peroxidative principles from *Tournefortia sarmentosa*. J Nat Prod, 65, 745-747.
- Linsmaier, E. M. ve Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. Plant Physiol., 21, 487-492.
- Lu, Y., ve Foo, L.Y., 2002. Polyphenolics of Salvia- A review. Phytochemistry, 75, 197-202.
- Makkar, H. P.S., Sidhuraju, P. ve Becker, K. 2007. Induction of flavonoid biosynthesis in plants and plant cell suspension cultures. Plant Secondary Metabolites Series: (Methods in Molecular Biology), 393, 130.
- Mansuroğlu, S. ve Gürel, E., 2001. Mikroçoğaltım. Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları, Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (edt.) 374, 262-281.
- Marco-Medina, A., ve Casas J.L. 2015. In vitro multiplication and essential oil composition of *Thymus moroderi* Pau ex Martinez, an endemic Spanish plant. Plant Cell Tiss Organ Cult, 120, 99–108.
- Marta, D., Mendes, A., Cristina Figueiredo, M., Oliveira, M. ve Trindade, H., 2013. Essential oil production in shoot cultures versus field-grown plants of *Thymus caespititius* Plant Cell Tiss Organ Cult, 113, 341–351.
- Mary, A.L., 2005. Valuable secondary products from in vitro culture. CRC Press LLC. 285-288.
- Mona, M.H., ve Talaat, I.M. 2005. Physiological response of rose geranium (*Pelargonium graveolens*, L.) to phenylalanine and nicotinic acid. Annals of Agric. Sci., 43, 2, 807-822.
- Morales, R., 2002. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: Stahl-Biskup, E. ve Saez, F., Eds., *Thyme The genus Thymus*. Taylor & Francis, 7, 14-55.
- Murashige, T. ve Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 80, 662-668.
- Murashige, T. ve Skoog, F., 1962. A revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures, Physiol. Plant., 15, 473-497.
- Musarurwa, H. T., Van Staden, J. ve Makunga, N. P., 2010. *In vitro* seed germination and cultivation of the aromatic medicinal *Salvia stenophylla* (Burch. ex Benth.) provides an alternative source of a-bisabolol. Plant Growth Regul., 61, 287–295.
- Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki K. ve Yamaguchi-Shinozaki, K., 2012. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. Biochimica et Biophysica Acta, 1819, 97–103.
- Nickavar, B., Mojab, F. ve Dolat-Abadi, R., 2005. Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. Food Chemistry 90, 609–611.

- Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M. ve Yoshikawa, T., 2004. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: Anti-carcinogenic effects of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin mode. Carcinogenesis, 25, 549-57.
- Ozudogru, E. A., Kaya, E. ve Kirdok, E., 2011. In vitro propagation from young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* and *T. longicaulis*) resulting in genetically stable shoots. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant, 47, 309-320.
- Pasqualetto, P. L., Zimmerman, R. H. ve Fordham, I., 1988. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars in vitro. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 14, 3140.
- Patwardhan, B., Vaidya, A. D. ve Chorghade, M., 2004. Ayurveda and natural products drug discovery. Curr. Sci., 86, 6, 789-799.
- Pérez-Tortosa, V., López-Orenes, A., Martínez-Pérez, A., Ferrer, M. A., Antonio A. ve Calderón, A. A., 2012. Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots.. Food Chemistry, 130, 362–369.
- Perry, N. S., Bollen, C., Perry, E. K. ve Ballard, C., 2003. Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. Pharmacol. Biochem. Behav., 75, 651–659.
- Pessoa, L. M., Morais, S. M., Bevilaqua, C. M. L. ve Luciano, J. H. S., 2002. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. Veterinary Parasitology, 109, 1-2, 59-63.
- Peterson, M. ve Simmonds, M. S., 2003. Rosmarinic acid. Phytochemistry, 62, 121-125.
- Phatak, S. V. ve Heble, M. R., 2002. Rosmarinic acid synthesis in shootcultures of *Mentha arvensis* Linn. Ind. J. Biotechnol., 1, 381-385.
- Puranik, S., Sahu, P. P., Srivastava, P. S. ve Prasad, M., 2012. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. Trends in Plant Science, 17, 6, 369-81.
- Rafique, S., Idrees, M., Nasim, A., Akbar, H. ve Athar, A., 2010. Transition metal complexes as potential therapeutic agents. Biotechnology and Molecular Biology Reviews, 5, 2, 38-45.
- Rao, R. S. ve Ravishankar, G. A., 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol Adv., 20, 101-153.
- Roy, D. ve Mukhopadhyay, S., 2012. Enhanced rosmarinic acid production in cultured plants of two species of *Mentha*. Indian Journal of Experimental Biology, 50, 817-825.
- Samuni, Y., Goldstein, S., Dean, O. M. ve Berk, M., 2013. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. Biochimica et Biophysica Acta, 1830, 4117–4129.

- Sanbongi, C., Takano, H., Osakabe, N., Sasa, N., Natsume, M. ve Yanagizawa, K., 2004. Rosmarinic acid in Perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model. Clin Exp Allergy, 34, 971-977.
- Sang, U. P., Uddin, R., Xu, H. Kim, Y. K. ve Lee, S. Y., 2008. Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. African Journal of Biotechnology, 7, 25, 4959-4965.
- Santos-Gomes, P. C. ve Fernandes-Ferreira, M. 2003. Essential oils produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). J Agric Food Chem., 51, 8, 2260-2266.
- Sarıboğa, B. ve Korkmaz, H., 2009. Antimicrobial Activity of *Thymus leucotrichus* and *Origanum laevigatum*. Asian Journal of Chemistry, 21, 4, 2777-2781.
- Schenk, R. U. ve Hildebrandt, A. C., 1972, Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, Canadian Journal of Botany, 50, 1, 199-204.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk G., Bekat, L. ve Leblebici, E., 2000. Tohumlu Bitkiler Sistematığı, 116 Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornova-İzmir, 276.
- Sekeroğlu, N., Deveci, M., Buruk, CK, Gürbüz, B. ve İpek, A., 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of Anzer tea essential oil. Journal of The Science of Food and Agriculture, 87, 7, 1424-1426.
- Sezik, E. ve Basaran, A., 1986. The volatile oil of *Thymus argaeus* Boiss. et Bal. Acta Pharm. Turc., 28, 93-98.
- Shabnum, S. ve Wagay, M., 2011, Micropropagation of Different Species of Thymus, Journal of Research & Development, 11.
- Shekarchi, M., Hajimehdipoor, H., Saeidnia, S., Gohari, A. R. ve Hamedani M. P., 2012. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family, Pharmacogn Mag., 29, 37-41.
- Silva, J., Abebe, W., Sousa, S.M., Duarte, V.G., Machado, M.I.L. ve Matos, F.J.A., 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. J. Ethnopharmacol., 89, 277-283.
- Soylu, E. M., Soylu, S. ve Kurt, S., 2006. Antimicrobial activity of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. Mycopathologia, 161, 119-128.
- Sökmen, A. ve Gürel, E., 2001. Sekonder Metabolit Üretimi. (Editörler M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, 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.
- Sperotto, R. A., Ricachenevsky, F. K., Duarte, G. L., Boff, T. ve Lopes, K. L., 2009. Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. Planta, 230, 985–1002.
- Stahl-Biskup, E., 2002. Essential oil chemistry of the genus *Thymus* – a global view. *In: Thyme The genus Thymus (EdS. Stahl-Biskup, E. ve Saez, F.)*. Taylor & Francis, p. 88-137.
- Stahl-Biskup, E., Hiller, K. ve Loew, D., 2009. Thymian. *In: Wichtl M (ed): Teedrogen und Phytopharmaka*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Germany
- Swarup, V., Ghosh, J., Ghosh, S., Saxena, A. ve Basu, A., 2007. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. Antimicrob Agents Chemother, 51, 3367-70
- Takasaki, H., Maruyama, K., Kidokoro, S., Ito, Y., Fujita, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. ve Nakashima, K., 2010. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. Mol. Genet. Genomics, 284, 173–183.
- Tanker, M., Tanker, N., Şarer, E., Atasu, E., Şener, B., Kurucu, S. ve Meriçli, F., 1990. Result of Certain Investigation on the Volatile Oil Containing Plants of Turkey, Essential Oils for Perfumery and Flavours, Preceedings of an International Conference, Mayıs, Antalya, Bildiriler Kitabı: 16-29.
- Tanur-Erkoyuncu, M., ve Yorgancılar, M., 2005. Bitki Doku Kültürü Yöntemleri İle Sekonder Metabolitlerin Üretimi. Selçuk Tar Bil Der, 2, 1, 66-76.
- Tatari Vernosefadrani, M., Askari Raberi, N., Nosrati, S. Z., 2009. Optimization of in vitro culture for *Gerbera* cv. Tropic Blend. J Sapling Seed, 2, 25, 389-401
- Tepe, B. ve Sökmen, A., 2007. Production and optimisation of rosmarinic acid by *Satureja hortensis* L. callus cultures. Natural Product Research, 21, 1133–1144.
- 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 eigi* 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.
- Thom, M., Maretzki, A., Korner, E., ve Sokai, W. S., 1981. Nutrient uptake and accumulation by sugar cane cell culture in relation to growth cycle. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1, 3-14.

- Tümen, G., Baser, K. H. C., Demirci, B. ve Ermin, N., 1998b. The essential oils of *Satureja coerulea* Janka and *Thymus aznavourii* Velen. *Flavour Fragr. J.*, 13, 65–67.
- Tümen, G., Yıldız, 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.
- Uçar, E., Turgut, K., 2009. Bazı dağ çayı (sideritis) Türlerinin *in vitro* Çoğaltımı, *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22, 1, 51–57.
- Ulukanli, Z., Cigremis, Y. ve Ilcim, A., 2011. .In vitro antimicrobial and antioxidant activity of acetone and methanol extracts from *Thymus leucotrichius* (Lamiaceae). *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15, 649-657.
- URL 1. http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=7958, 22.04.2017.
- 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.
- Vijaya S., Udayasri, P., Aswani Y., RaviBabu, B., Phani, Y. ve Vijay, V.M. 2010. Advancements in the production of secondary metabolites. *Journal of Natural Products*, 3, 112-123.
- Waller, G.R. ve Nawacki, E., 1978. Alkaloid Biology and Metabolism in Plants. Phenum, Press, New York, 152.
- Wang, W., Youlu, Y., Yang, C., Geng, S., Sun, Q., Long, L., Cai, C., Chu, Z., Liu, X., Wang, G., Du, X., Miao, C., Zhang, X. ve Cai, Y., 2016. Characterisation and functional analysis of a novel NAC gene associated with resistance to Verticillium wilt and abiotic stress in cotton. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6, 3951-3961.
- Winkelmann T., Geier T. ve Preil, W., 2006. Commercial in vitro plant production in Germany in 1985–2004, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86, 319–327.
- World Health Organization, 2008. Primary Health Care: Now More Than Ever.
- Xie, Q., Frugis G., Colgan, D. ve Chua, N. H., 2000. Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.*, 14, 3024–3036.
- Yamaguchi, M., Goue, N., Igarashi, H., Ohtani, M. ve Nakano, Y., 2010. Vascular-related NAC-domain6 and vascular-related NACdomain7 effectively induce transdifferentiation into xylem vessel elements under control of an induction system. *Plant Physiol.*, 153, 906–914.
- Yang, Y. K., Lee, S. Y., Park, W. T., Park, N. ve Park, S. U., 2010, Exogenous auxins and polyamines enhance growth and rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Nepeta cataria* L. *Plants omics journal*, 3, 6, 190-193.

- Youssef, A. A., El-Mergawi R. A. ve Abd El-Wahed, M. S. A., 2004. Effect of putrescine and phenylalanine on growth and alkaloid production of some Datura species. J. Agric. Sci. Mansoura Univ., 29, 4037-3053.
- Youssef, A. A., Khattab, M. E., ve Omer, E. A., 2004. Effect of spraying of molybdenum and tyrosine on growth, yield and chemical composition of lemon basil plant. Egypt. Pharm. J., 3, 2, 87-106.
- Zheng, X., Chen, B., Lu, G., Han, B. ve Zheng, X., 2009. Overexpression of a NAC transcription factorenhances rice drought and salt tolerance. Biochem. Biophys. Res. Commun., 379, 985–989.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Trabzon'da doğdu. İlkokulu Yüzüncü Yıl İlköğretim Okulunda, lise öğrenimini Trabzon Lisesinde tamamladıktan sonra 2004–2005 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. 2009 yılında Biyolog unvanı ile mezun oldu. 2009-2010 öğretim yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Biyoloji Bölümünde yüksek lisans eğitime başladı ve 2012 yılında bu bölümden mezun oldu. Yine aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümünde doktora eğitime başladı.

Uluslararası bilimsel dergilerde 3 adet yayınlanmış makalesi bulunmaktadır. İngilizce bilmektedir. Evli ve iki çocuk annesidir.