

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**BATI ANADOLU ENDEMİĞİ *ORIGANUM SIPYLEUM*
L.(Kekik) BİTKİSİNİN *IN VITRO* MİKROÇOĞALTIMI
VE MİKROBİTKİLERDE UÇUCU YAĞ İÇERİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ali ÇAKIR

Tez Danışmanı : Yard.Doç.Dr.Esin AKÇAM OLUK

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.03.00

Sunuş Tarihi : 04 .02.2011

ÖZET

**BATI ANADOLU ENDEMİĞİ *ORIGANUM SIPYLEUM* L.(Keklik)
BİTKİSİNİN *IN VITRO* MİKROÇAĞALTIMI VE
MİKROBİTKİLERDE UÇUCU YAĞ İÇERİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÇAKIR, Ali

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü
Tez Yöneticisi:Yard. Doç. Dr. Esin Akçam OLUK
Şubat 2011, 54 sayfa

Origanum sipyleum L. (Lamiaceae), Batı Anadolu'da yayılış gösteren Türkiye için endemik bir türdür. Uçucu yağları ilaç ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, fidelerden elde edilen eksplantlar kullanılarak bir mikroçoğaltım protokolü geliştirilmiştir. Sürekli gelişim için 20 günlük fidelerin sürgün uçları, 550 mg/l CaCl₂ içeren modifiye edilmiş Murashige-Skoog (MMS) besi ortamında kültüre edilmiş ve sürgün çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. 1 mg/L benzylaminopurine (BAP) içeren ortamda çoklu sürgünler (3.7 ± 0.3 Sürgün/eksplant) üretilmiştir. Alt kültürlerde sürgün çoğaltım oranı 7.8 ± 0.4' e yükselmiştir. Sürgünlerin % 96'sı üç haftanın sonunda 0.5 mg/l indolebutyric asit (IBA) içeren ortamda köklendirilmiştir. Bitkicikler dış ortam koşullarına alıştırılmıştır. Bunların % 76' sı sera koşullarında hayatta kalmıştır.

Doğal ve mikro çoğaltılmış *O.sipyleum* bitkilerinden su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağların analizi GC/MS vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. On sekiz bileşen karakterize edilmiştir. Doğal bitkilerin ana bileşeninin α-kadinol (%23.41), mikro çoğaltılmış bitkilerin ana bileşeninin timol (48.55 %) ve α-cadinol (11.46) ve doğal bitkilerin çiçeklerinin ana bileşeninin germacrene-D olduğu belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Origanum sipyleum*, Lamiaceae, mikroçoğaltım, benzilaminopürin, indolbütirik asit, uçucu yağ, timol, α –kadinol, germacrene-D, α-Humulon.

ABSTRACT

MICROPROPAGATION OF *ORIGANUM SIPYLEUM* L., AN ENDEMIC HERB OF WESTERN ANATOLIA, AND ESSENTIAL OILS OF THE MICROPROPAGATED PLANTLETS

ÇAKIR, Ali

MSc in Biology.

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Esin Akçam OLUK

February 2011, 54 pages

Origanum sipyleum L. (Lamiaceae) is an endemic species of the Western Anatolia, Turkey. Essential oils of oreganos are utilized in pharmaceutical and cosmetic industries. In this study, a micropropagation protocol was developed using seedlings-derived explants. Shoot apices of 20 d-old seedling were cultured and shoots multiplied on Murashige-Skoog modified (MMS) containing 550 mg/l of CaCl₂ for sustained growth. Multiple shoots (3.7 ± 0.3 shoot/explant) were produced on medium containing 1 mg/L benzylaminopurine (BAP). On subculturing rate of shoot multiplication increased to 7.8 ± 0.4 . 96% of the shoots rooted in a culture medium with 0.5 mg/L indolebutyric acid (IBA) after 3 weeks. The plantlets were acclimatized into outdoor conditions. 76% of these survived in the greenhouse.

Water distilled essential oils of wild and micropropagated *O. sipyleum*, was analyzed by GC/MS. Eighteen components were characterized. Major constituent was α -cadinol (23.41 %) and, thymol (48.55 %) and α -cadinol (11.46) in wild and micropropagated plants of the species, respectively; whereas it was germacrene-D in the flowers of wild plants.

Keywords: *Origanum sipyleum*, Lamiaceae, micropropagation, benzylaminopurine, indolebutyric acid, essential oils, thymol, α -cadinol, germecren-D, α -Humulen.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans süresi boyunca katkılarını benden esirgemeyen sayın hocam Yard.Doç.Dr. Esin Akçam OLUK' a, tez çalışmamın kimyasal analizleri konusunda değerli katkılarından dolayı sayın Prof.Dr. Süheyla KIRMIZIGÜL'e, ve eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE METOD	12
2.1. Bitkisel Materyal	12
2.2. Denemelerde kullanılan besi ortamları, cam eşya ve sterilizasyonları	12
2.3. Tohumların Çimlendirilmesi	14
2.4. Tohumların Çimlenme Oranı ve Morfolojik Ölçümleri	15
2.5. Mikro Çoğaltım, Köklendirme ve Aklimatizasyon	15
2.6. Uçucu Yağların Analizleri	16
2.7. GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi) Analizleri	17
2.8. Eterik Yağ Bileşenlerinin Tanımlanması	18
3. BULGULAR	19
3.1. Çimlenme Oranlarına İlişkin Bulgular	19

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2. Kök ve Gövde Boylarına İlişkin Bulgular	21
3.3. Taze ve Kuru Ağırlıklara İlişkin Bulgular	23
3.4. Mikroçoğaltımla İlgili Bulgular	24
3.5. Köklendirme Aşamasına İlişkin Bulgular	29
3.6. Aklimatizasyon (şasırtma) Aşamasına İlişkin Bulgular	33
3.7. Uçucu Yağ Analizlerine İlişkin Bulgular	36
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	39
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Türkiye'nin floristik haritası	2
1.2. <i>Origanum sp.</i> türlerinde gözlenen genel çiçek yapısı	5
1.3. Türkiye de yayılış gösteren bazı <i>Origanum</i> türleri.....	7
1.4. <i>Origanum sipyleum</i> L.	8
1.5. Gövdede sürgün ucu ve apikal meristem.....	11
2.6.1. Clevenger aparatı ile hidrodistilasyon işlemi	16
2.7.1. Agilent 6890 GC sistemi	18
3.1.1. 20. günün sonunda <i>Origanum sipyleum</i> tohum çimlenme oranları (%).....	20
3.1.2. 18°C' de T2 besi ortamında yetişen 20 günlük <i>Origanum sipyleum</i> fideleri	21
3.2.1. Yirmi günlük fidelerin kök-gövde boyları	22
3.3.1. 20 günlük fidelerin kök-gövde taze ve kuru ağırlıkları	24
3.4.1. 25° C' de T2 besi ortamında yetişen 20 günlük <i>Origanum sipyleum</i> fideleri.....	25
3.4.2. Mikroçoğaltım işlemi için alınan ve T2+1 mg/l BAP ortamında inkübe edilen sürgün uçları.....	26
3.4.3. 5 haftalık ilk altkültürün 3. haftasında sürgün ucu eksplantlarında BAP etkisi ile yanal tomurcukların uyanması.....	26

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.4.4. Beş haftalık ilk altkültür süresi sonunda yanal tomurcuklardan gelişen fideler (A, B).....	28
3.4.5. Üç haftalık ikinci alt kültür sonunda mikroçoğalmış fideler	29
3.5.1. 0,5 mg/l IBA uygulanan bitkilerde 3 hafta sonundaki kök gelişimi (A, B).....	31
3.5.2. 1 mg/l IBA uygulanan bitkilerde 3 hafta sonundaki kök gelişimi	32
3.5.3. Köklendirme amaçlı uygulanan 0,5 mg/l IBA' nın sürgün çoğalımı üzerine etkisi.....	33
3.6.1. Kum : torf : perlit (1:1:1 v/v) içeren Macenta kabında aklimatize edilen fideler,.....	34
3.6.2. Sera koşullarında hayatta kalan mikropropage bitkiler (A,B).	35
3.7.1. α -Cadinol	36
3.7.2. Thymol.....	37
3.7.3. Germacrene-D.....	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Ilıman iklim kuşağına ait bazı ülkelerde toplam tür ve endemik tür sayısı ile endemizm oranı	3
1.2. Türkiyede yetişen <i>Origanum</i> türleri	6
2.2.1. Murashige - Skoog (MS) besi ortamı	13
2.2.2. Modifiye edilmiş Murashige - Skoog (MMS) (Akçam ve Yürekli, 1993) besi ortamı.....	14
3.1.1. 20. günün sonunda <i>Origanum sipyleum</i> tohum çimlenme oranları(%) ...	20
3.2.1. Fidelerin 20. günde kök-gövde boyları (mm).....	22
3.3.1. 20 günlük fidelerin kök ve gövde taze (TA) ve kuru (KA) ağırlıkları	23
3.4.1. Mikroçoğaltım işleminde T2+1 mg/l BAP ortamında ilk ve ikinci alt kültürler sonunda elde edilen sürgün sayısı ve boyları	27
3.5.1. T2 ortamına eklenen IBA'in 3 hafta sonunda mikropropage fidelerin köklenmeleri üzerine etkileri.....	30
3.6.1. Aklimatizasyon işlemine ilişkin elde edilen veriler.....	33
3.7.1. <i>Origanum sipyleum</i> L.'un uçucu yağ bileşenleri (MB: Mikropropage Bitki, DB: Doğadan toplanan bitkinin toprak üstü kısmı, Ç: Doğadan toplanan bitkinin çiçekleri, RRI: Relative Retention Indices).....	38

1.GİRİŞ

Günümüzde iyi kurulmuş bir teknoloji olan bitki doku kültürleri kısaca, *in vitro* koşullar altında, hücre çoğaltımı ve rejenerasyonu vasıtasıyla, anaç bitkiden izole edilen bir bitki hücresi, dokusu veya organından yeni organların veya tüm bitkinin üretildiği steril kültürler olarak tanımlanmaktadır (Ibitoye et al., 2009).

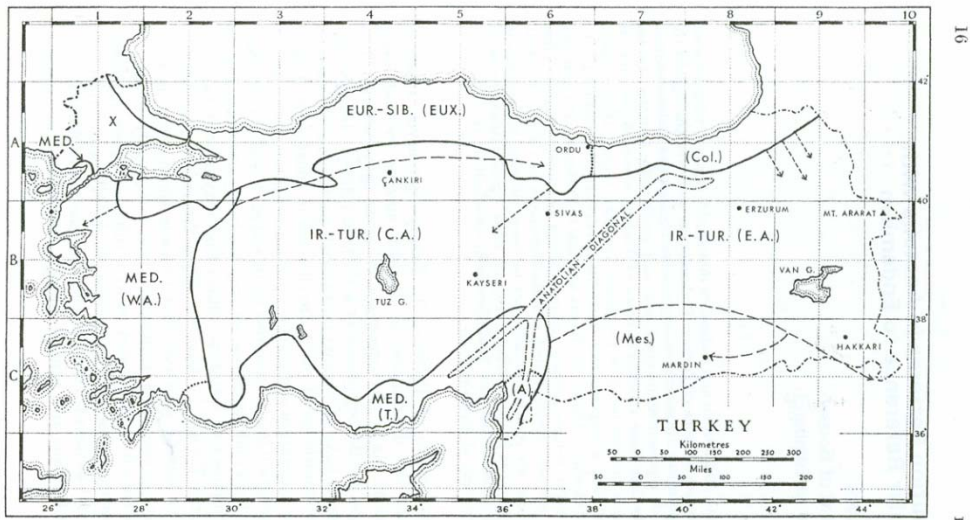
Doku kültürü, bitkilerin üç temel yeteneği olan **totipotensi** (bir hücre veya dokunun tam bir bitkiyi verebilme yeteneği), **dediferansiyasyon** (farklılaşmış hücrelerin farklılaşmamış forma (meristematik hücrelere) geri dönüşümü) ve **kompotensi** (gelişen özel bir yolla yeni hücre veya doku verebilme içsel potansiyeli) yeteneklerine dayanmaktadır (Taji, 2003). Bu bağlamda tohum, embriyo, organ, meristem, sürgün ucu, kök, kallus, hücre süspansiyon ve protoplast kültürü gibi çeşitli *in vitro* kültür tipleri bulunmaktadır (George et al., 2008).

In vitro kültürün; genetik olarak aynı ve virüsten ari bitkilerin üretilmesi, haploid bitki üretimi, uyuşmazlık sorunu olan bitkiler için hibrit tür üretimi, yeni varyantların üretilmesi, yıl boyunca üretim yapabilme ve üretimi zor olan bitkilerin üretilmesi gibi avantajları olmasına karşın; pahalı bir teknik oluşu, özel beceri gerektirmesi, bilinmeyen patojen girişi ve mutasyonların denetlenememesi gibi dezavantajları da söz konusudur (Taji, 2003). Doku kültürüne özne oluşturan bitkiler arasında domates (Rashid et al, 2010), soya fasulyesi (Santarem and Finer, 1999), pirinç (Gairi and Rashid, 2004), patates (Mohamed et al., 2010), tütün (Da Silva, 2003) gibi kültür bitkileri olmakla birlikte *Catharanthus roseus* (Akçam Oluk ve ark, 2003; Taha et al., 2009), *Taxus yunnanensis* (Guo and Wang, 2008), *Digitalis purpurea* (Hagimori et al., 1982) gibi doğal bitkiler de bulunmaktadır.

Bilindiği gibi, jeolojik açıdan genç bir oluşum olan ülkemiz, doğal yayılış gösteren bitki türü zenginliği açısından dünyanın sayılı ülkeleri arasında bulunmaktadır. Orta enlem kuşağında yer alan Türkiye, deniz seviyesinden iki bin metre ve üzeri yüksekliğe sahip dağları, platoları ve ovalarıyla farklı iklim

koşulları isteyen binlerce canlı türüne ev sahipliği yapmaktadır (Akman ve Ketenoğlu, 1986). Vadiler ve çöküntü alanlarının yarattığı mikroklima etkisi, tür zenginliğini daha da arttırmaktadır (UBÇSEP, 2001). Son 2 milyon yılda yaşanan buzul çağları boyunca Türkiye pek çok canlı türü tarafından sığınak olarak kullanılmış ve günümüzdeki biyolojik çeşitliliğine kavuşmuştur (UBÇSEP, 2007; Akgündüz ve ark., 2009).

Bitki coğrafyası bilim dalına göre dünya 37 ayrı flora bölgesine ayrılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre üç farklı bitki coğrafyası bölgesi 'İran-Turan, Akdeniz ve Avrupa- Sibirya Bölgeleri' Türkiye sınırları içerisinde bulunmaktadır (Şekil 1.1). Türkiye gibi dünyanın çok küçük bir bölümünü kaplayan bir alanda üç ayrı bölgenin buluşması nadir görülen bir durumdur (Avcı, 1993). Ayrıca karasal iklim, okyanus iklimi ve Akdeniz iklimi gibi farklı iklim kuşaklarının Türkiye sınırları içinde bulunuşu, jeolojik ve jeomorfolojik çeşitlilik, deniz, göl ve akarsular gibi zengin su kaynaklarının varlığı, deniz seviyesinden başlayıp 5000 m' ye kadar ulaşan büyük yükseklik farkları ve Anadolu'nun doğusu ile batısı arasında ekolojik farklılıklar bulunması ve bunun floristik farklılıklara yansımaları Türkiye'nin bugünkü flora zenginliğine ulaşmasını sağlayan diğer etmenlerdendir (Kaya ve Aksakal, 2005; Akgündüz ve ark., 2009).



Şekil 1.1. Türkiye'nin floristik haritası ([http://www.dkm.org.tr/anadolu-caprazi/en/bolum-fotograf/DavisAnadolu Caprazi.jpg](http://www.dkm.org.tr/anadolu-caprazi/en/bolum-fotograf/DavisAnadolu%20Caprazi.jpg))

Davis'in 1988 yılında yazdığı "Flora of Turkey and The East Aegean Islands" kitabına göre (Davis et al., 1988) bugüne kadar Türkiye'de 3022' si endemik olmak üzere 8 bin 897 çiçekli bitki ve eğrelti türü tanımlanmıştır (Çizelge 1.1). Bununla birlikte günümüzde yapılan yeni çalışmalarla alttür, varyete ve hibritlerle birlikte toplam takson sayısının 10 bin 765'e ulaştığı ve bunların da 3504'ünün Türkiye'ye endemik olduğu belirtilmektedir (Seçmen, 2004).

Çizelge 1.1. Ilıman iklim kuşağına ait bazı ülkelerde toplam tür ve endemik tür sayısı ile endemizm oranı (Davis, Heywood and Hamilton, 1994'den düzenlenmiştir).

Ülke	Toplam Tür (çiçekli bitki ve eğrelti)	Endemik tür	Endemizm (%)
Türkiye	8897	3022	34,4
İran	8000	1400	17,5
Fas	3675	625	17,0
İtalya	5600	712	12,7

Endemik terimi Latince **endemos** (indigenous) kelimesinden gelir ve "yerli-oraya özgü (ait)" anlamında kullanılır. Endemik bitkiler yayılış alanı belli bir ülke veya bölge olan, yerel, ender veya çok ender bulunan türlerdir. Bir ülkenin floristik zenginliği ve çeşitliliği içerdiği nadir ve endemik taksonların çokluğu ile önem kazanmaktadır. Tüm Avrupa kıtasında yaklaşık 12 bin bitki türü yetiştiği ve bunlardan 2 bin 500'ünün endemik olduğu göz önüne alınırsa Türkiye'nin floristik zenginliği daha iyi anlaşılır (Sezik ve ark, 1991; Başer, 2002; UBÇSEP, 2007).

Yurdumuz florasını oluşturan familyalar içinde en çok tür *Asteraceae* (*Compositae*) familyasında bulunmaktadır. 133 cins ve 1156 türü olan bu familya angiospermilerin % 13.3' ünü oluşturmaktadır. Bunu takip eden diğer önemli dikotil familyaları *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Brassicaceae* (*Cruciferae*), *Scrophulariaceae* ve *Lamiaceae* (*Labiatae*)'dir (Seçmen, 2004).

Bunlardan dünya üzerinde yaklaşık 200 cins ve 3000 tür ile temsil edilen *Lamiaceae* familyasının ülkemizde 45 cins ve 546'dan fazla türü bulunmaktadır (Seçmen ve ark., 1998). Familya üyeleri otsu veya çalı formunda olup gövdeler genellikle dört köşelidir. Yapraklar stipulasız, basit, bazen pennat, daima karşılıklıdır. Çiçek durumu üst yapraklar veya braktelerin koltuklarında ortaya çıkan kimoz durumunda ve genellikle vertisillastrumdur. Brakteler belirgin şekilde yapraklardan farklı olabildiği gibi bazı türlerde yapraklara benzediği de görülmektedir. Meyve 4 (nadiren daha az) kuru (çok nadir taze) fındıkcıktan oluşur. Isıtıldığında genellikle müsilaşlıdır (Davis et al., 1988). Familya genellikle Akdeniz bölgesinde doğal yayılış göstermekte olup Avrupa ülkelerinde bazı türlerinin kültürü de yapılmaktadır. Familyaya ait en bilinen türler günlük hayatımızda da sıkça kullandığımız adaçayı (*Salvia officinalis*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*), oğul otu (*Melissa officinalis*), reyhan (*Ocimum basilicum*), zulfa (*Hyssopus officinalis*), nane (*Mentha piperita*) ve kekik'tir (Akgül, 1989). Yöresel kullanımda pek çok bitki türü kekik adıyla anılabilmektedir. Bunlar arasında en bilineni ve ülkemiz dışında bir çok ülkede de kekik olarak kullanılan *Thymus sp.*'dir (özellikle *T. vulgaris*). *Thymus sp.* dışında kekik olarak adlandırılan diğer cinsler *Corydothymus* (*C. capitatus*; başlı kekik veya beyaz kekik), *Satureja sp.* (*S. hortensis*, *S. spicigera* ve *S. thymbra*; bakla kekiği), *Thymbra sp.* (*T. spicata*; kara kekik, zahter) ve *Origanum sp.* (*O. vulgare*, *O. majorana*, *O. onites*; İzmir kekiği vs.)'dur (Arslan ve ark., 2005).

Origanum cinsine ait türler, genellikle yarı çalimsı veya otsu formda olup, tüylü veya tüysüz (genellikle donuk mavimsi yeşil renkte) çok yıllık bitkilerdir. Gövdeler yükselici veya dik, genellikle dallanmış ve birkaç tanedir. Yapraklar hemen hemen sapsız veya az çok saplıdır. Brakteler şekil ve büyüklük bakımından yapraklardan daima farklıdır; genellikle imbrikat, kaliksin 1/2 veya 1/3'ü uzunluğundadır; ya zarımsı ve kısmen morumsu kırmızı ya da sarımsı yeşildir veya yapı ve renk bakımından yapraklara benzer. Çiçekler hermafrodit veya ginodioik olup sık ve imbrikat dizilişli braktelerin koltuğundadır (Şekil 1.2) (Davis et al., 1988).



Şekil 1.2. *Origanum sp.* türlerinde gözlenen genel çiçek yapısı

(www.ubcbotanicalgarden.org/potd/2006/08/origanum_barbara_tingey.php)

Origanum, kelime olarak ‘dağların süsü’ anlamına gelmektedir (Yunancada oros =dağ, tepe ve ganos = süs). Dünya üzerinde 39 türü bulunan *Origanum* cinsi, ülkemizde 8 seksiyonda toplanmış 14’ü endemik 21 tür ve 25 taksonla temsil edilmektedir (Çizelge 1.2., Şekil 1.3) (Başer ve ark., 1995). Diğer çoğu *Lamiaceae* üyesi türde olduğu gibi *Origanum* cinsi üyelerinin bir çoğu da (~ % 75’i) genellikle Doğu Akdeniz bölgesinde yayılış göstermektedir (Ietswart, 1982; Kitiki, 1996; El-Gengaihi et al., 2006).

Çizelge 1.2. Türkiyede yetişen *Origanum* türleri

<p>SEKSİYON:AMARACUS</p> <p>1-* <i>Origanum boissieri</i> 2-+ <i>Origanum calcaratum</i> 3-* <i>Origanum saccatum</i> 4-* <i>Origanum solymicum</i> 5-+ <i>Origanum symes</i></p>	<p>SEKSİYON:CHILOCALYX</p> <p>16- * <i>Origanum bilgeri</i> 17- * <i>Origanum micranthum</i> 18- * <i>Origanum minutiflorum</i></p>
<p>SEKSİYON:ANATOLICON</p> <p>6- * <i>Origanum hypericifolium</i> 7- * <i>Origanum sipyleum</i></p>	<p>SEKSİYON:MAJORANA</p> <p>19- <i>Origanum majorana</i> 20- <i>Origanum onites</i> 21- <i>Origanum syriacum</i> var. <i>bevanii</i></p>
<p>SEKSİYON:BREVIFILAMENTUM</p> <p>8-* <i>Origanum rotundifolium</i> 9-* <i>Origanum acutidens</i> 10-* <i>Origanum haussknechtii</i> 11-* <i>Origanum bargyli</i> 12-* <i>Origanum brevidens</i> 13-* <i>Origanum leptocladum</i> 14-* <i>Origanum munzurense</i></p>	<p>SEKSİYON:ORIGANUM</p> <p>22- <i>Origanum vulgare</i></p> <p>A) <i>O. vulgare ssp.hirtum</i> B) <i>O. vulgare ssp.gracile</i> C) <i>O. vulgare ssp.vulgare</i> D) <i>O. vulgare ssp.viride</i></p>
<p>SEKSİYON:LONGITUBUS</p> <p>15-* <i>Origanum amanum</i></p>	<p>SEKSİYON:PROLATICOROLLA</p> <p>23- <i>Origanum laevigatum</i></p>
<p>+: Sadece Ege adalarında yetişen <i>Origanum</i> türleri</p> <p>*: Türkiyede yetişen endemik <i>Origanum</i> türleri</p>	



Şekil 1.3. Türkiye de yayılış gösteren bazı *Origanum* türleri (Başer ve ark., 1995).

- (A) *Origanum amanum*: Türkiye de endemik olarak yetişir
- (B) *Origanum onites*: Genel yayılışa sahip olup, Türkiye’de de yetişir ve kültürü yapılan tek *Origanum* türüdür
- (C) *Origanum majorana*: Geniş yayılışa sahip bir türdür.
- (D) *Origanum calcaratum*: Ege adalarında endemik olarak yetişen bir türdür.

Türkiye’de doğal olarak yetişen türlerden bir tanesi de Batı Anadolu endemiği olarak tanımlanan, ancak yayılışının Konya’ya kadar da olabildiği belirtilen *Origanum sipyleum* L. ’dur (Şekil 1.4). Mercanköşk veya güveyi otu adıyla da bilinen bitkiye (Tanker ve ark., 1998; www.eski.tubitak.gov.tr/tubives/) Spil kekiği de denmesinin sebebi ilk olarak Manisa iline bağlı Spil dağı’nda tanımlanmasındandır (Davis et al., 1988). *O. sipyleum* 80 cm’ye kadar boylanabilen yarı çalı, bazal kısımları tüylü, diğer kısımları tüysüz, gövde başına 35 cm olabilen 26 dal çifti barındıran bir toprak üstü morfolojiye sahiptir. Dallar genellikle birçok küçük yaprak çifti taşır, ikinci dereceden dalları genellikle mevcuttur. Yapraklar petiolattan yarı sesile genellikle yeşilimsi mavidir. Kaliks 4 mm ve iki dudaklı, korolla pembe, 7-11 mm’dir. Yaşam alanı kalkerli kayalar ve yamaçlar, çam koruluğu, makilik ve meşelik alanlar ile steplerdir (100-1500 m) (Davis et al., 1988).



Şekil 1.4. : *Origanum sipyleum* L. (Manisa/Spil Dağı-700 m; Foto: Ali Çakır, 2009)

Bitkinin yaşam süresi Nisan-Mayıs ile Ekim ayları arasında olup, uygun iklim koşulları altında 3-4 yıldır. Vejetatif kısımları geleneksel olarak gıda katkı maddesi, baharat ve bitki çayı olarak kullanılmaktadır (Özçelik, 2000; Özkan ve ark., 2007). Ayrıca bitkinin biyokimyasal ekstraktları diğer çoğu *Origanum* türünde olduğu gibi (Loizzo et. al., 2009; Zheng et. al., 2009; Özkan ve ark., 2010) uçucu yağlarının içeriğinde bulunan etken maddelerin antifungal (Paster et al., 1993) ve antibakteriyel (Vokou et al., 1993) etkileri sebebi ile tıbbi öneme de sahiptir (Nekiboğlu ve ark., 2007; Özkan ve ark., 2007).

Uçucu yağlar; nadiren renkli (örn: Tıbbi papatya ve karanfil yağı gibi), sudan farklı yoğunlukta ve bu nedenle suda çözünmeyen, ancak alkol, eter gibi organik çözücülerde çözünebilen uçucu ve akışkan özellikte bileşiklerdir; eterik yağ olarak da adlandırılırlar (Baytop ve Başer, 1995). Uçucu yağ özelliğini göstermelerinin sebebi ısıtıldığında buharlaşabilmeleridir (Tanker ve ark., 1990; Hay and Waterman, 1993; Calsamiglia et al., 2007). Bitki dünyasında uçucu yağlara çok sık rastlanır, hatta hemen hemen tüm bitkilerin uçucu yağ içerdikleri söylenebilir (Hay and Svoboda, 1993). Ama tıbbi bitkilerle tedavide (fitoterapi) kullanılabilmesi için, uçucu yağ drogları olarak tanımlanacak bitkilerin, bu hoş kokulu yağları en azından % 0,1-10 dolaylarında içermeleri gerekir (Baytop,

1999). Bir bitkinin tümü veya çeşitli organları, birbirine benzemeyen etken maddeler içerir. Tıbbi bitkilerle tedavi alanında bu organlar, **bitkisel droglar** olarak tanımlanır (Ceylan, 1987; Lattoo et al., 2006; Çelik, 2007). Uçucu yağlar, bitkinin özel yağ hücrelerinde, yağ geçitlerinde, salgı tüylerinde ve salgı ceplerinde çok küçük damlacıklar halinde birikirler (Yentür, 1984; Iijima et al., 2004). Bu yağlar çok değişik maddelerin bileşiminden oluşurlar. Öyle ki, bir uçucu yağ türünde 100 ayrı madde saptanabilir (Ceylan, 1987; Demarne and Van der Walt, 1993; Williams and Harborne, 2002). Her uçucu yağ taşıyan bitkinin kendine özgü kokusu ve aromaterapötik özellikleri, o uçucu yağı oluşturan maddelerin kombinasyonu ve konsantrasyonlarına bağlıdır. Uçucu yağların bileşiminde bulunan başlıca maddeler *fenoller*, *furanokumarin*, *monoterpen-esterler*, *monoterpen-ketonlar* ve *monoterpen oksitleri*' dir (Dorman and Deans, 2000; Duru ve ark., 2004; Ratnasooriya et al, 2005)

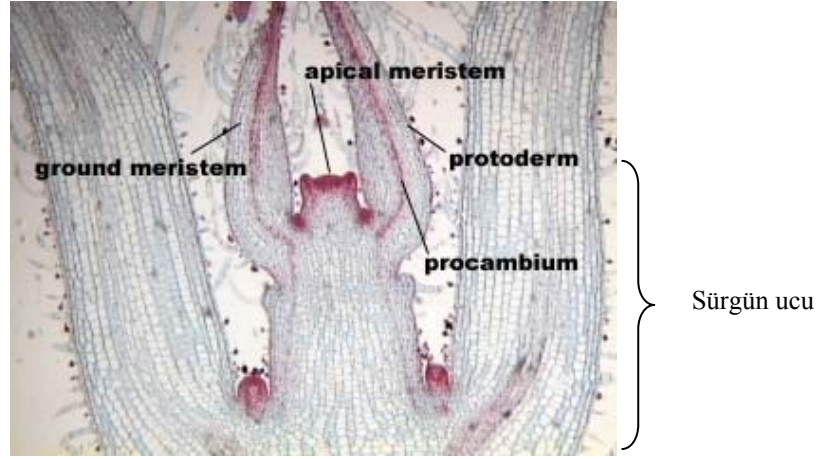
Tıbbi ve aromatik bitkilere çok talep olmasına karşılık ancak bazılarının tarımı yapılabilmektedir (örn: *Origanum onites*) (Ulukapı ve ark., 2008). Dolayısıyla bu bitkilerin temin edilmesi genellikle doğadan toplama yoluyla gerçekleşmektedir. Bu şekilde, insan eliyle yoğun bir şekilde toplanıyor olmaları doğal bitkilerde neslin devamını tehlikeye atmaktadır. Bitkilerin, bu şekilde karşı karşıya kaldığı, gen kaynağını kaybetme tehlikesi karşısında son yıllarda bu türleri korumak adına birçok çalışma geliştirilmiştir. Bu çalışmalara örnek olarak, tehdit altındaki türler için çeşitli tehlike seviyeleri belirleyen ve içinde buldukları bu tehlike kategorilerine göre ilgili türleri koruma altına alan 'Dünya Doğayı Koruma Birliği (IUCN) 'nin faaliyetlerini verebiliriz (IUCN, 2010).

Koruma altına alınmanın ötesindeki bir yaklaşım da bu türlerin çoğaltılmasının sağlanması yönündedir. Bu amaçla yürütülen *ex situ* (tarla koşullarında kültüre alma) çalışmalar bilinmektedir (Ulukapı ve ark., 2008; Moreira et al., 2009). Fakat geleneksel yöntemlerle gerçekleştirilen *ex situ* çoğaltım hem zaman alan zahmetli bir işlemdir, hem de bu şekilde üretilen bitkiler, özellikle ekonomik öneme sahip tıbbi bitkiler için önemli bir parametre olan toplam biyo-kütlelerinin düşük oluşu yönüyle yetersiz kalmaktadır (Sudha et al., 2005; Dhaka and Kathori, 2005). Alternatif olarak son zamanlarda özellikle endemik ve tıbbi bitkilerin *in vitro* koşullarda, bitki doku kültürü yöntemleri

kullanılarak çoğaltılması gündeme gelmiştir (Shimomura et al., 1997; Subotic et al., 2009). Doku kültürleriyle çoğaltım, mevsimsel değişikliklerden bağımsızlık, kısa sürede daha fazla sayıda bitki sayısına ulaşım gibi avantajlar sunmaktadır (Wawrosch et al., 2001; Stanilova et al., 2009) ve bu yöntemlerden biri de mikroçoğaltımdır (Rout et al., 2000; Murthy et al., 2010).

Mikroçoğaltım veya diğer adıyla mikropropagasyon (ya da klonal propagasyon) *in vitro* koşullar (laboratuvar koşulları) altında gerçekleştirilen bir vejetatif bitki üretim tekniğidir (Malik et al., 2005; Keng et al., 2009). Genel olarak anaç bitkinin herhangi bir parçasından alınan bir eksplanttan yeni bitkiciklerin oluşmasını (rejenerasyonunu) sağlamak olarak özetlenebilir. Bu oluşumda eksplantın üzerinde kallus oluşuyor ve bitkicikler bu kallus ara fazından rejenere oluyorsa **dolaylı** (indirekt) **rejenerasyondan** (He et al., 2006; Akçam Oluk ve ark., 2010), kallus gelişmeden, doğrudan anaç eksplantın üzerinden rejenerasyon gerçekleşiyorsa **doğrudan** (direkt) **rejenerasyondan** sözedilir (Brown and Thorpe, 1995; Wawrosch et al., 2001; Akçam Oluk ve Orhan, 2009).

İndirekt rejenerasyonda ortaya *epigenetik* veya *genetik* değişiklik çıkma olasılığı bulunduğu için (Evans et al., 1984) anaç bitkinin genomik açıdan tıpatıp benzeri yavrular elde etmek isteniyorsa direkt rejenerasyon (vejetatif üretim) hedeflenir (Martin et al., 2006; Chaudhuri et al., 2007). İlk zamanlarda doğadan toplanan ve steril olmayan örnekler kullanıldığından, virüsten arı kültürler elde etmek için eksplant olarak ~ 0.2 - 5 mm'lik apikal meristem (Şekil 1.5) tercih edilmiştir (Loo, 1945; Fuglie et al., 1999). Ancak apikal meristem manipülasyonunun zor olması ve son zamanlarda yapılan çalışmalarda, eksplant kaynağı olarak, *in vitro* tohum çimlendirilmesiyle elde edilen aseptik fidelerin kullanılması nedeniyle, günümüzde, eksplant olarak genellikle bu fidelerden alınan ~ 0.5 - 1.5 cm'lik sürgün ucu (Şekil 1.5) tercih edilmektedir (Verma and Singh, 2007; Goel et al., 2009). Bunun yanı sıra nodal veya internodal eksplantların kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır (Chaudhuri et al., 2007; Murthy et al., 2010).



Şekil 1.5. Gövdede sürgün ucu ve apikal meristem (http://www.progressivegardens.com/knowledge_tree/meristem.jpg'den düzenlenmiştir)

Klonal propagasyonda sürgün çoğaltımının teşviki için çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) kullanılabilir (Wawrosch et al., 2001). Bu bileşiklerden genellikle sitokininler (6-BAP, Kinetin, Zeatin, Thidiazuron vs.) ya tek başlarına (Bansal et al., 2006), ya da belli orandaki oksinlerle [Indol 3-asetik asit (IAA), Indol 3- butrik asit (IBA), α - Naftalenasetikasit (NAA)] kombinasyon halinde kullanılırlar (Tokuhara and Mii, 1993; Tsay et al., 2006). Mikroçoğaltım işleminde kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinden özellikle sitokininlerin aynı zamanda uçucu yağ miktarında ve uçucu yağların kimyasal içeriklerinde farklılıklara sebep olduğu da belirtilmektedir (Stoeva and Iliev, 1997; Nayak, 2009)

Biz de bu çalışmamızda, yukarıda genel özelliklerini açıklamaya çalıştığımız, Batı Anadolu endemiği ve aynı zamanda tıbbi bir bitki türü olan *Origanum sipyleum* L. bitkisinin aseptik sürgün uçlarından, *in vitro* mikro çoğaltımını ve mikroçoğaltılmış bitkilerde uçucu yağ içeriğini araştırmayı planladık.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Bitkisel Materyal

Bitkisel materyal olarak tez çalışmamızın *in vitro* çimlenme denemelerinde *Origanum sipyleum* L. bitkisinin tohumları, mikroçoğaltım denemelerinde eksplant kaynağı olarak *in vitro* çimlenmiş (aseptik) bitkicikler; uçucu yağ analizlerinde ise adı geçen bitkinin doğadan toplanan toprak üstü yeşil kısımları ve çiçek durumları ile *in vitro* mikro çoğaltılarak toprağa aktarılmış fideler kullanılmıştır. Gerek tohumlar, gerekse de uçucu yağ analiz işlemlerinde kullanılan doğal bitki toprak üstü kısımları ve çiçek durumları Ekim ayında Manisa-Spil dağı'ndan (700 m) toplanmıştır.

2.2. Denemelerde kullanılan besi ortamları, cam eşya ve sterilizasyonları

Çimlenme denemelerinde besi ortamı olarak yarım ($\frac{1}{2}$) (Y1) ve tam (T1) kuvvet Murashige-Skoog (MS) (1962) (Çizelge 2.2.1), yarım ($\frac{1}{2}$) (Y2) ve tam (T2) kuvvet modifiye Murashige-Skoog (MMS) (Akçam ve Yürekli, 1993) (Çizelge 2.2.2) ve ayrıca 1 litre suda 6-7 g agar çözülerek hazırlanan sulu agar (A) kullanılmıştır. MS besi ortamının modifikasyonu, bitkinin doğal yaşam koşulları göz önünde bulundurularak; standart besi ortamında 440 mg/l olan CaCl_2 miktarının % 25 arttırılarak 550 mg/l' ye yükseltilmesi ile gerçekleştirilmiştir (Akçam ve Yürekli, 1993). Cam eşya olarak, çimlenme denemelerinde 100 ml' lik erlenler; mikroçoğaltım denemelerinde ise başlangıçta yine 100 ml' lik erlenler ve ilerleyen altkültürlerde bitkilerin gelişimlerine bağlı olarak 1 litrelik kavanozlar kullanılmıştır. Besi ortamları 100 ml' lik erlenlere 20'şer, 1 litrelik kavanozlara 50'şer ml olarak servis edilmiştir. Cam eşya ve besi ortamlarının sterilizasyonu, besi ortamları hazırlanıp cam kaplara servis edildikten sonra birlikte olacak şekilde ve 121 ° C sıcaklık ve 1.1 atm basınç altında 20 dk otoklavlanarak gerçekleştirilmiştir.

Mikroçoğaltılmış bitkilerin *in vitro* köklendikten sonra dış ortam koşullarına alıştırma aşamasında 1:1:1 torf: kum: perlit veya 1: 3 torf: perlit içeren ağzı

kapaklı maçenta kapları, seraya aktarılmalarında ise 1:1:1 torf: kum: perlit içeren plastik violler kullanılmıştır.

Her bir uygulama için 20'şer deney kabı kullanılmış ve denemeler üç kez tekrar edilmiştir.

Çizelge 2.2.1. Murashige -Skoog (MS) (1962) besi ortamı

İnorganik bileşikler	Miktar(mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
Na ₂ -EDTA	37,23
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,95
Organik bileşikler	Miktar(mg/l)
Myo-inositol	100
Nikotik asit	0,5
Pridoksin HCl	0,5
Tiamin HCl	0,5
Glisin	2,0

Çizelge 2.2.2. Modifiye edilmiş Murashige - Skoog (MMS) (Akçam ve Yürekli, 1993) besi ortamı

İnorganik bileşikler	Miktar(mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl₂ (modifiye)	550
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
Na ₂ -EDTA	37,23
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,95
Organik bileşikler	Miktar(mg/l)
Myo-inositol	100
Nikotinic asit	0,5
Pridoksin HCl	0,5
Tiamin HCl	0,5
Glisin	2,0

2.3. Tohumların Çimlendirilmesi

In vitro çalışmalarda kullanılan tohumlar yüzey sterilizasyonlarının gerçekleştirilmesi için ilk olarak % 70' lik (v/v) etanolde 30 saniye bekletilmiş ve ardından steril saf suyla üç kez çalkalanmış, daha sonra, % 5 NaOCl içeren % 20 (v/v)' lik ticari çamaşır suyunda 15 dakika bekletilerek ardından yine üç kez saf ve steril sudan geçirilmişlerdir. Sterilizasyon işleminden sonra tohumlar A, Y1, Y2 ve T1, T2 besi ortamı içeren erlenlere 10 tohum/erlen olacak şekilde ekilmişler ve iki farklı sıcaklığa (18 °C ve 25 °C) maruz bırakılmışlardır. İlk dört gün karanlıkta tutulan kültürler bu sürenin sonunda 16/8 (aydınlık/karanlık) fotoperiyod şartlarına alınmıştır.

2.4. Tohumların Çimlenme Oranı ve Morfolojik Ölçümleri

Farklı sıcaklık ve farklı besin ortamlarında çimlendirilen tohumların çimlenme oranı, 20. günde çimlenen tohumlar sayılarak, % değerlerinin hesaplanması ile elde edilmiştir. Bitkilerde morfolojik ölçümler olarak kabul edilen kök-gövde boyu ile kök-gövde taze ve kuru ağırlık belirlenmesi 20 günlük fidelerin hasatıyla yapılmıştır. Taze ağırlığı saptanan materyal 80 °C' lik etüvde 96 saat bekletildikten sonra kuru ağırlık ölçümü gerçekleştirilmiştir.

2.5. Mikro Çoğaltım, Köklendirme ve Aklimatizasyon

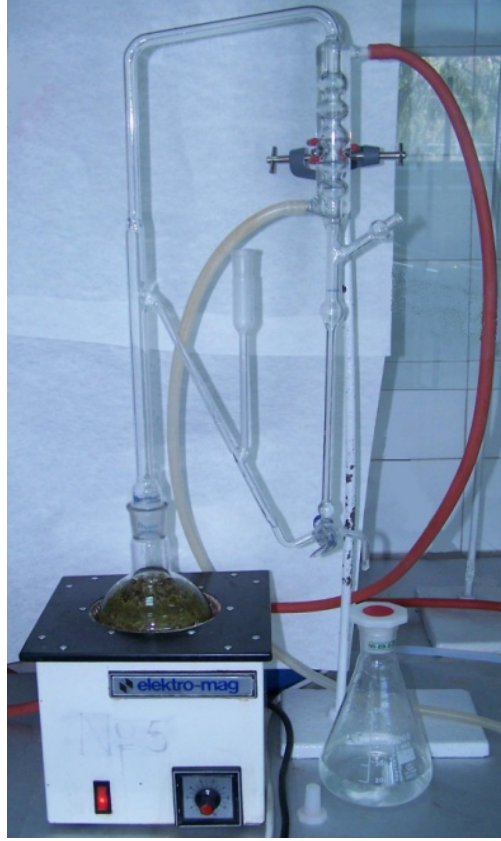
Mikroçoğaltım için, eksplant olarak 20 günlük fidelerden kesilip alınan 5 mm' lik ortalama 3 tepe tomurcuğu 1 mg/l 6-BAP + T2 ortamı içeren erlenlerde inkübe edilmiştir. Kültürler 20 ± 2 °C sıcaklık ve beyaz florasan ışığı (4000 lux) ile aydınlatılan 16/8-ayd/kar ışık periyoduna sahip büyüme odasına yerleştirilmiştir. Beş hafta sonra, her eksplant için sürgün sayısı ve sürgün boyları kaydedilmiştir. İlk kültürü takiben üretilen sürgünler 3 haftada bir 5 kez alt kültüre alınmıştır.

5 altkültürün sonunda *in vitro* üretilen sürgünler köklenmeleri için 0,5 ve 1 mg/l *indolbütirik asit* (IBA) içeren T2 ortamına, ortalama 3 sürgün/erlen olacak şekilde aktarılmıştır. 3 haftalık alt kültür süresi sonunda, her sürgün için köklenme oranı ve kök boyu hesaplanmıştır. Köklenme için uygulanan IBA' nın, sürgün sayısı ve sürgün boyu üzerinde değişiklikler meydana getirdiğinin gözlenmesi üzerine de, aynı sürenin (3 haftalık alt kültür süresi) sonunda ortama konan her sürgün için sürgün sayısı ve sürgün boyu hesaplanmıştır.

Üç haftanın sonunda köklenen fideler şaşırtma (aklimatizasyon) işlemi için 1:1:1 oranında torf: kum: perlit ve 1: 3 oranında torf: perlit içeren ağzı kapaklı maçentalara aktarılmıştır. Onuncu günün sonunda kültür kaplarının kapakları açılmış ve hayatta kalan bitkicikler on gün daha nem oranının % 90 olduğu ortam şartlarında tutulmuştur. Toplam 20 günün sonunda canlılıklarını koruyan fideler içinde 1:1:1 oranında toprak: torf: perlit bulunan plastik viollere alınarak sera koşullarına yerleştirilmişlerdir.

2.6. Uçucu Yağ Analizleri

Hava kurusu bitkisel materyale, su buhar distilasyonu yöntemi ile, Clevenger aparatı (Şekil 2.6.1) ve 200 ml saf su kullanılarak, 6 saat boyunca hidrodistilasyon işlemi uygulanmıştır. Uçucu yağlar aparata ilave edilen bir toplama kabında toplanmış ve *n*-hexane (Merck 109687) ile ekstre edilerek su fazından elde edilmişlerdir. Sonra, hidrodistilasyon işlemi ile bitkisel materyallerden elde edilen *n*-hexane ekstraları, hemen ardından sodium sülfat ile muamele edilerek su fazından granül (zerrecik) formuna dönüştürülmüşlerdir. Bu işlemlerin sonunda bitkisel materyallerin toplam yağ miktarları ve uçucu yağ verimleri hesaplanmıştır.



Şekil 2.6.1. Clevenger aparatı ile hidrodistilasyon işlemi.

2.7. GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi)

Analizleri

Kurutulmuş yağlar, *n*-hexane (HPLC grade-Merck 109687) içerisinde çözüldükten sonra, GS-MS analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizler, EI iyonizasyon tekniği ile çalışan (70 eV) Agilent 5973 kütleye duyarlı dedektör eklenmiş, Agilent 6890 GC sistemi ile gerçekleştirilmiştir. GC analizleri, HP-Innovax (19091N-216) kapillar kolonu (60m x 0.32 mm, 0.50 µm film kalınlığında) ile donatılmış GC-6890 Agilent aygıtı ile tamamlanmıştır (Şekil 2.7.1). Etüv'ün sıcaklığı 70 °C' den başlayarak 210 °C' ye ulaşınca kadar dakikada 7 °C artacak ve 210 °C' de 10 dakika kalacak şekilde ayarlanmıştır. Enjektör ve dedektör sıcaklığı, sırasıyla 70 °C ve 270 °C'de tutulmuştur. Dedektör çifti çeliktendir. Taşıyıcı gaz olarak, akış hızı 35.0 ml/dk, enjeksiyon miktarı 1 mL olan helyum kullanılmıştır. Çalışmalar havasız koşullarda ve 2.26 psi basınç altında gerçekleştirilmiştir. Ayrılma oranı ve ayrılma akışı sırasıyla 1/50 ve 34.8 ml/dk iken, basıncın nominal ilk hızı 0.7 ml/dk, ortalama hız ise 22 cm/saniye olarak ölçülmüştür.



Şekil 2.7.1. Agilent 6890 GC sistemi (<http://www.gclctoronto.com/agilent6890.htm>)

2.8. Eterik Yağ Bileşenlerinin Tanımlanması

Bileşenlerin tanımlanması; gaz kromatografileri ile standartların (Supelco 49452-U) alıkonma zamanlarının (RT) kıyaslanması ve kütle spektrum piklerinin Nist-Wiley veri tabanı kütüphanesi ve literatürler ile birlikte kullanımına dayalı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.BULGULAR

Origanum sipyleum bitkisinin farklı sıcaklıkta farklı besi ortamlarına yerleştirilen tohumlarının;

- 20. günde çimlenme oranları (%),

- ortaya çıkan fidelerin kök-gövde boyları ile taze ve kuru ağırlıkları,

-bu fidelerin eksplant kaynağı olarak kullanılmasıyla bitkicik mikroçoğaltımı,

- mikroçoğaltılan bitkiciklerin köklendirme, aklimatizasyon (iklimlendirme) ve kimyasal içeriklerine ilişkin bulgularımız aşağıdaki gibidir.

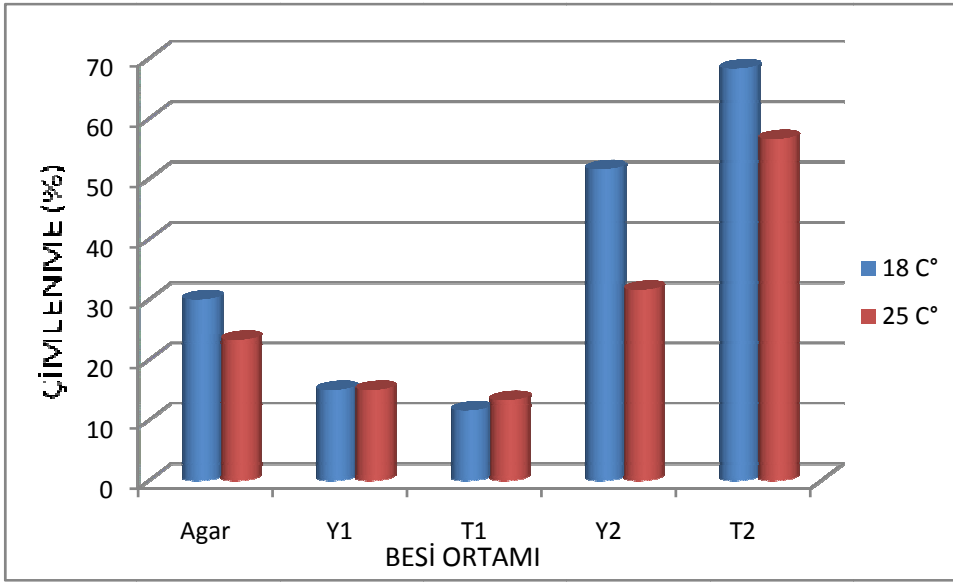
3.1. Çimlenme Oranına İlişkin Bulgular

Sıcaklık ve farklı besin ortamlarının *Origanum sipyleum* bitkisi tohum çimlenme oranına ilişkin etkilerinin irdelenmesiyle elde ettiğimiz bulgular aşağıdaki gibidir.

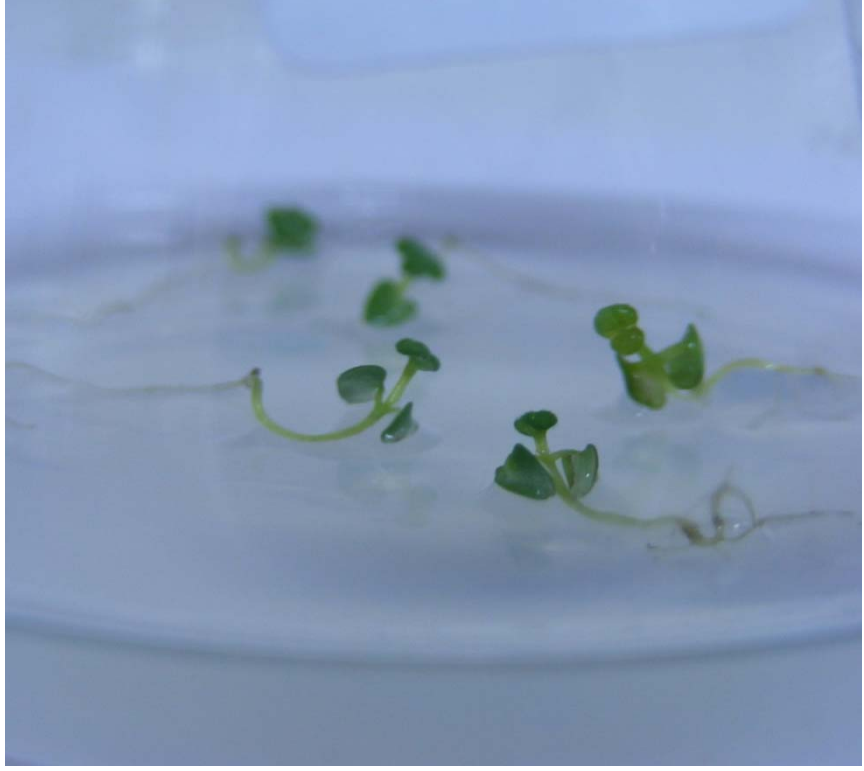
20. günde en yüksek çimlenme % 68,3 ile 18 °C' de ve T2 besi ortamında, en düşük çimlenme ise % 11,6 ile 18 °C' de ve T1 besi ortamında gözlenmiştir (Çizelge 3.1.1; Şekil 3.1.1, 3.1.2.).

Çizelge 3.1.1. 20. günün sonunda *Origanum sipyleum* tohum çimlenme oranları (%)

Sıcaklık Besî ortamı	18 °C	25 °C
Agar	30 ± 0,1	23,3 ± 0,1
Y1	15 ± 0,1	15 ± 0,1
T1	11,6 ± 0,1	13,3 ± 0,1
Y2	51,6 ± 0,1	31,6 ± 0,1
T2	68,3 ± 0,1	56,6 ± 0,1



Şekil 3.1.1. 20. günün sonunda *Origanum sipyleum* tohum çimlenme oranları (%)



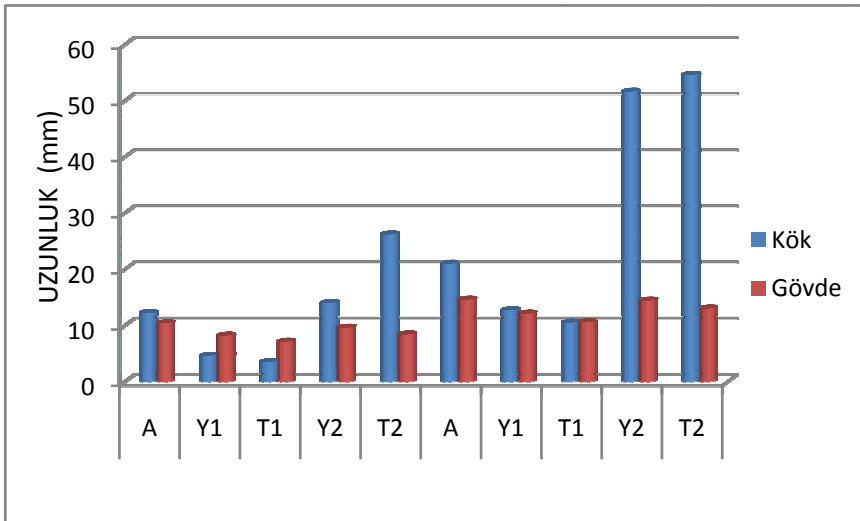
Şekil 3.1.2. 18°C’ de T2 besi ortamında yetişen 20 günlük *Origanum sipyleum* fideleri.

3.2. Kök ve Gövde Boylarına İlişkin Bulgular

Elde edilen sonuçlara göre , en uzun gövde boyu 25°C’ de ve A ortamında (14,6 mm), en kısa gövde boyu 18°C’de T1 besi ortamında (7,1 mm) kaydedilmiştir (Çizelge 3.2.1; Şekil 3.2.1). En uzun kök boyu ise 25°C’ de T2 besi ortamında (54,6 mm) en kısa kök boyu da 18°C’de ve T1 ortamında (3,5 mm) belirlenmiştir (Çizelge 3.2.1; Şekil 3.2.1).

Çizelge 3.2.1. Fidelerin 20. günde kök-gövde boyları (mm)

Besim Ortamı	18 °C		25 °C	
	Kök	Gövde	Kök	Gövde
Agar	12,2 ± 0,1	10,4 ± 0,2	21 ± 0,1	14,6 ± 0,3
Y1	4,6 ± 0,1	8,2 ± 0,1	12,7 ± 0,4	12,1 ± 0,1
T1	3,5 ± 0,2	7,1 ± 0,3	10,5 ± 0,2	10,6 ± 0,3
Y2	14 ± 0,1	9,6 ± 0,1	51,6 ± 0,1	14,4 ± 0,1
T2	26,2 ± 0,1	8,4 ± 0,1	54,6 ± 0,1	13 ± 0,1



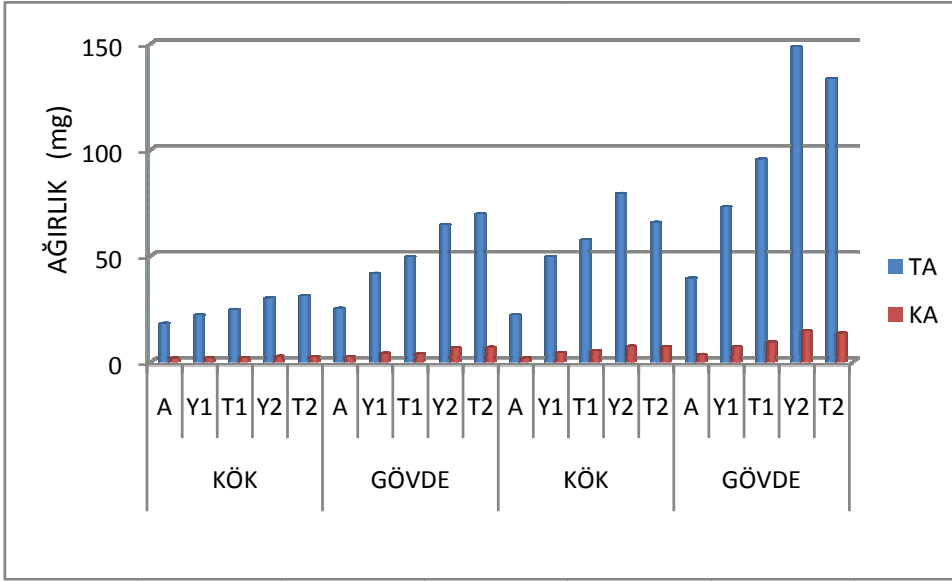
Şekil 3.2.1. Yirmi günlük fidelerin kök-gövde boyları

3.3. Fide Taze ve Kuru Ağırlıklarına İlişkin Bulgular

Elde edilen sonuçlara göre, 20. günün sonunda en yüksek kök ($79,2 \pm 0,3$ mg) ve gövde ($148,5 \pm 0,1$ mg) taze ağırlığı $25^{\circ} C'$ de ve Y2 besin ortamında, en düşük kök ($18 \pm 0,2$ mg) ve gövde ($25,1 \pm 0,1$ mg) taze ağırlığı $18^{\circ} C'$ de ve A ortamında saptanmıştır (Çizelge 3.3.1; Şekil 3.3.1). Aynı şekilde en yüksek kök ($7,2 \pm 0,1$ mg) ve gövde ($14,5 \pm 0,1$ mg) kuru ağırlığı $25^{\circ} C'$ de ve Y2 besin ortamında, en düşük kök ($1,6 \pm 0,1$ mg) ve gövde ($2,3 \pm 0,1$ mg) kuru ağırlığı $18^{\circ} C'$ de ve A ortamında gözlenmiştir (Çizelge 3.3.1; Şekil 3.3.1).

Çizelge 3.3.1. 20 günlük fidelerin kök ve gövde taze (TA) ve kuru (KA) ağırlıkları (mg)

Besin Ortamı	18 °C				25 °C			
	Kök		Gövde		Kök		Gövde	
	TA	KA	TA	KA	TA	KA	TA	KA
Agar	18 ± 0,2	1,6 ± 0,1	25,1± 0,1	2,3 ± 0,1	22 ± 0,1	1,7 ± 0,1	39,3± 0,1	3,3 ± 0,1
Y1	22 ± 0,4	1,8± 0,1	41,5 ± 0,3	3,9± 0,2	49,5 ± 0,3	4,2± 0,1	72,9± 0,3	6,9± 0,1
T1	24,5 ± 0,1	1,9± 0,2	49,5 ± 0,3	3,6± 0,1	57,5 ± 0,3	5,1± 0,2	95,45 ± 0,1	9,2± 0,4
Y2	30 ± 0,1	2,5 ± 0,1	64,6 ± 0,2	6,5 ± 0,1	79,2 ± 0,3	7,2 ± 0,1	148,5 ± 0,1	14,5 ± 0,1
T2	31 ± 0,1	2,3 ± 0,3	69,6 ± 0,3	6,7 ± 0,2	65,6 ± 0,2	6,9 ± 0,1	133,4 ± 0,1	13,4 ± 0,1



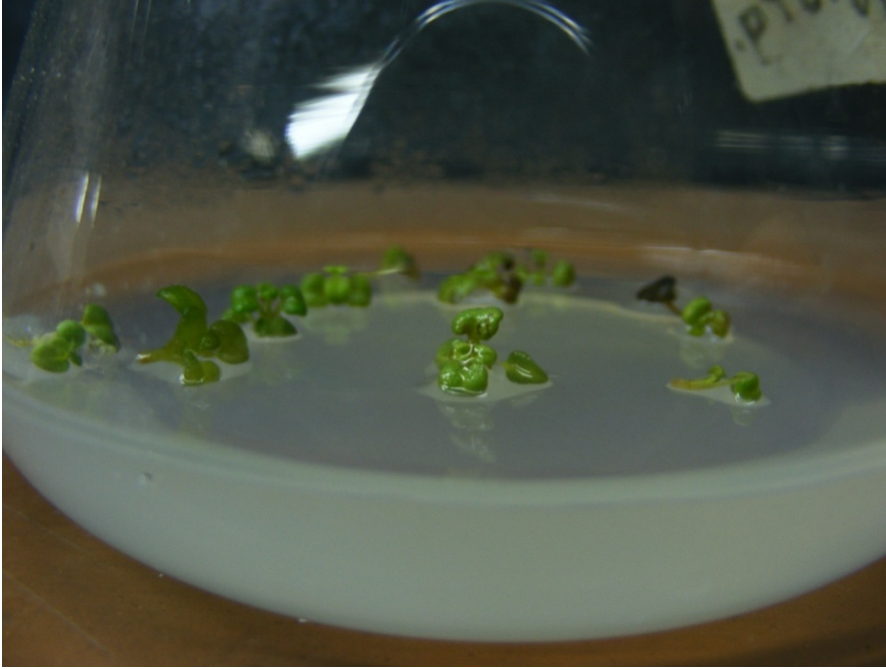
Şekil 3.3.1. 20 günlük fidelerin kök-gövde taze ve kuru ağırlıkları

3.4. Mikroçoğaltımla İlgili Bulgular

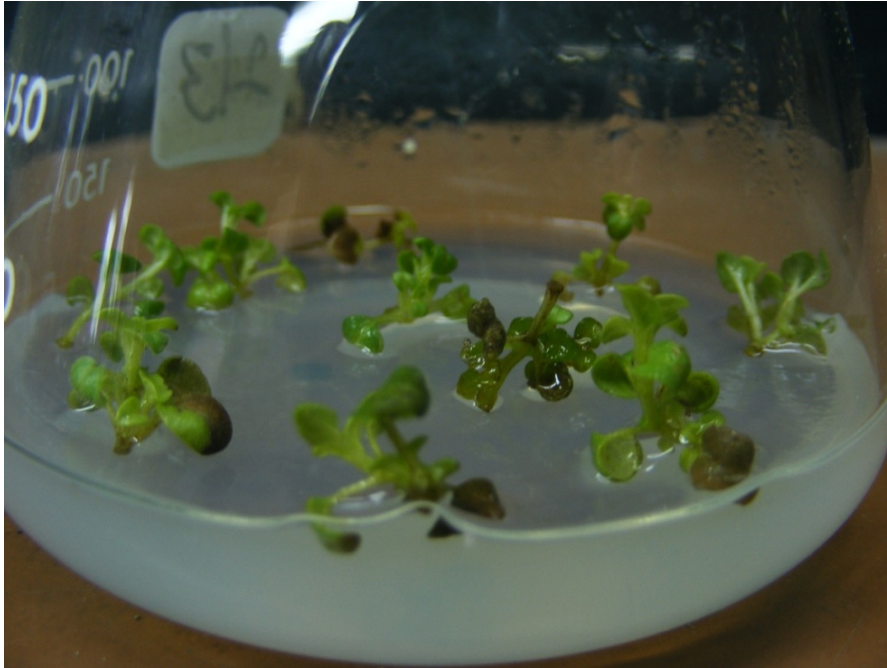
20 günlük fidelerden (Şekil 3.4.1) kesilerek kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarında (Şekil 3.4.2), inkübasyonun üçüncü haftasında, yanal tomurcukların uyandığı ve geliştiği gözlenmiştir (Şekil 3.4.3).



Şekil 3.4.1. 25° C' de T2 besi ortamında yetişen 20 günlük *Origanum sipyleum* fideleri



Şekil 3.4.2. Mikroçoğaltım işlemi için alınan ve T2+1 mg/l BAP ortamında inkübe edilen sürgün uçları.



Şekil 3.4.3. 5 haftalık ilk altkültürün 3. haftasında sürgün ucu eksplantlarında BAP etkisi ile yanıl tomurcukların uyanması.

İlk altkültürün (yaklaşık 5 hafta) sonunda eksplantlardan gelişen ortalama sürgün sayıları hesaplanmış ve sürgün boyları ölçülmüştür. Yapılan hesaplama ve

ölçümler sonucunda her bir eksplant üzerinde sürgün boyu yaklaşık $1,8 \pm 0,4$ cm olan ortalama $3,7 \pm 0,3$ sürgün tespit edilmiştir (Çizelge 3.4.1; Şekil 3.4.4).

Çizelge 3.4.1. Mikroçoğaltım işleminde T2+1 mg/l BAP ortamında ilk ve ikinci altkültürler sonunda elde edilen sürgün sayısı ve boyları

Altkültür	Sürgün sayısı/ explant	Sürgün boyu (cm)
1.	$3,7 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,4$
2.	$7,8 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,1$



Şekil 3.4.4. Beş haftalık ilk altkültür süresi sonunda yanal tomurcuklardan gelişen fideler (A, B).

Birinci altkültür işlemini takip eden ikinci üç haftalık alt kültür sonunda ise her eksplant üzerinde sürgün boyu $1,2 \pm 0,1$ cm olan $7,8 \pm 0,4$ adet sürgün ortaya çıkmıştır (Çizelge 3.4.1; Şekil 3.4.5).



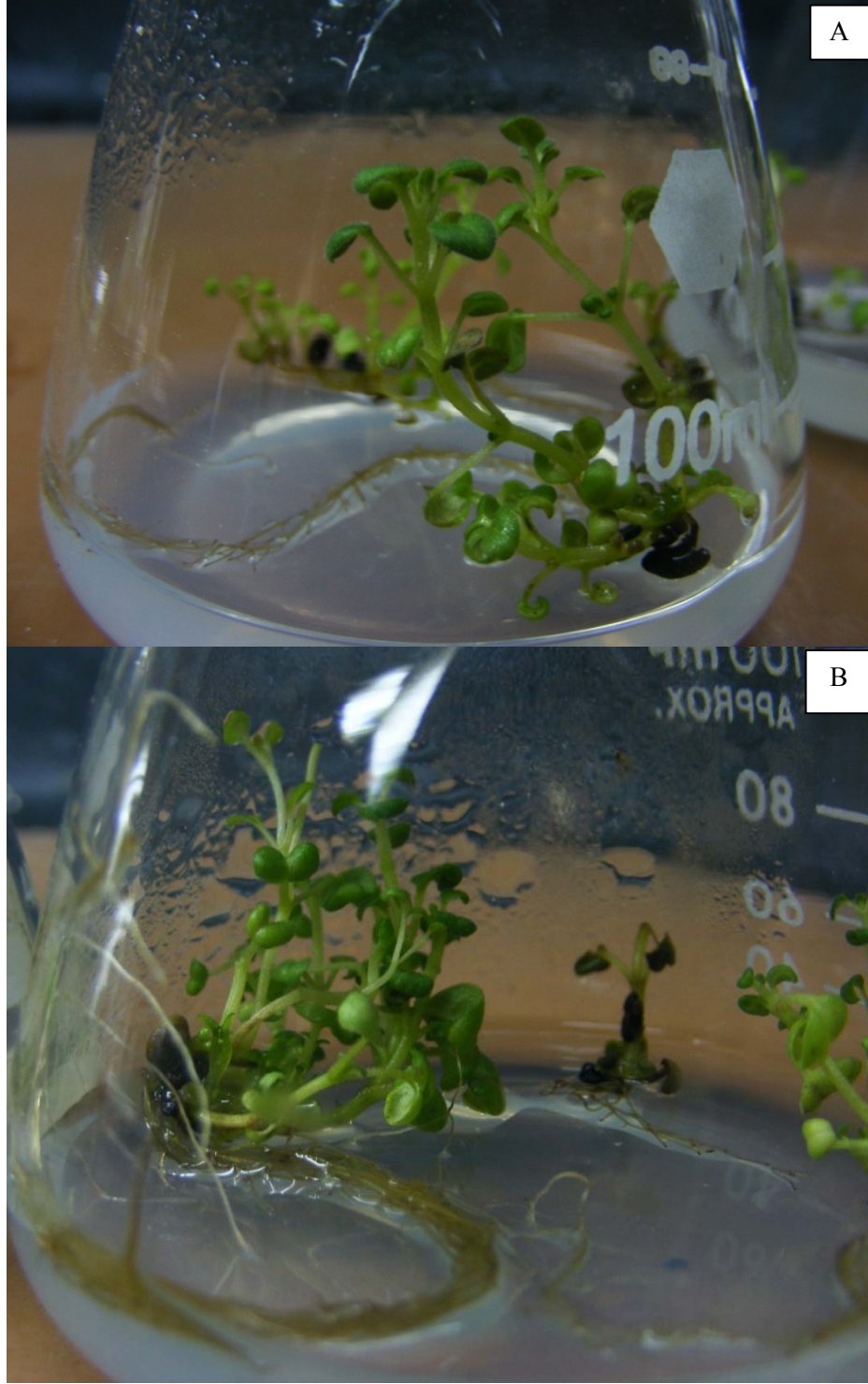
Şekil 3.4.5. Üç haftalık ikinci alt kültür sonunda mikroçoğalmış fideler

3.5. Köklendirme Aşamasına İlişkin Bulgular

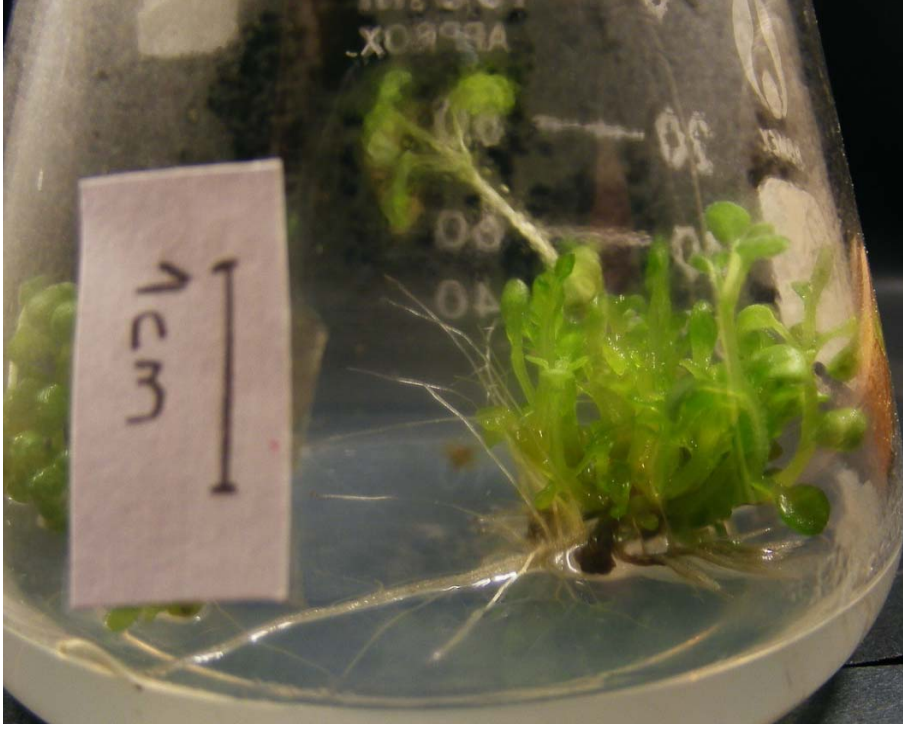
Mikro çoğaltım işleminden sonra köklenmeleri amacıyla 0,5 mg/l ve 1 mg/l IBA içeren T2 ortamına alınan bitkilerde 0,5 mg/l IBA' nın köklenme üzerine 1 mg/l' IBA'ya oranla daha etkin olduğu gözlenmiştir. 0,5 mg/l IBA içeren T2 (köklendirme) ortamındaki 3 haftalık altkültürün sonunda bitkilerin % 96' sında ve $5,5 \pm 0,2$ cm uzunluğunda kökler gelişirken, 1 mg/l IBA içeren ortamdaki bitkilerin sadece % 12' sinde köklenme meydana gelmiş ve kök boyu $1,6 \pm 0,1$ cm olarak ölçülmüştür (Çizelge 3.5.1; Şekil 3.5.1 ve 3.5.2).

Çizelge 3.5.1. T2 ortamına eklenen IBA'in 3 hafta sonunda mikropropage fidelerin köklenmeleri üzerine etkileri

Besi ortamı (T2)	Köklenen bitkilerin %'si	Kök boyu (cm)	Sürgün sayısı / eksplant	Sürgün boyu (cm)
0,5 mg/l IBA	96	5,5 ± 0,2	23,7 ± 0,3	0,8 ± 0,3
1 mg/l IBA	12	1,6 ± 0,1	-	-

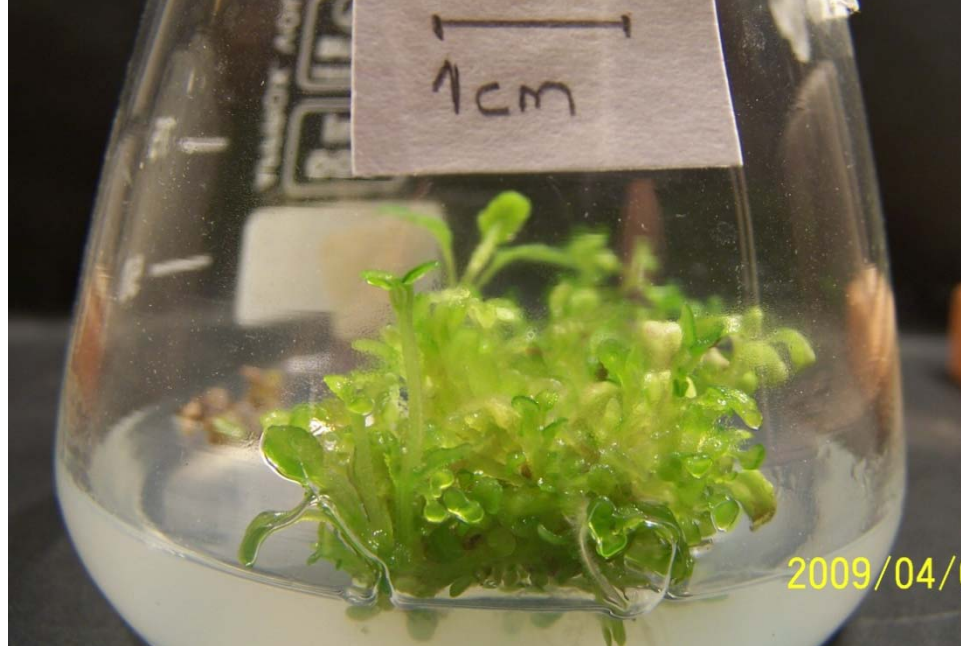


Şekil 3.5.1. 0,5 mg/l IBA uygulanan bitkilerde 3 hafta sonundaki kök gelişimi (A, B)



Şekil 3.5.2. 1 mg/l IBA uygulanan bitkilerde 3 hafta sonundaki kök gelişimi

Köklenmenin teşvik edilmesi amacıyla uygulanan 0,5 mg/l IBA' nın ayrıca fidelerin mikropropagasyonunu da teşvik ettiği ve 3 haftalık altkültürün sonunda her bir fideden $0,8 \pm 0,3$ cm boyunda $23,7 \pm 0,3$ adet sürgün ortaya çıktığı gözlenmiştir (Çizelge 3.5.1 ; Şekil 3.5.3).



Şekil 3.5.3. Köklendirme amaçlı uygulanan 0,5 mg/l IBA' nın sürgün çoğalımı üzerine etkisi

3.6 Aklimatizasyon (şşırtma) Aşamasına İlişkin Bulgular

Köklenen mikroçoğaltılmış fideler aklimatizasyon amacıyla iki farklı yetiştirme (transplantasyon) ortamı içeren ağzı kapaklı maçenta kaplarına aktarılmıştır. Yetiştirme ortamlarından kum: torf: perlit (1:1:1 v/v) karışımında fideler % 98, torf: perlit (1:3 v/v) karışımında ise % 48 oranında aklimatize olmuşlardır (Çizelge 3.6.1; Şekil 3.6.1).

Çizelge 3.6.1. Aklimatizasyon işlemine ilişkin elde edilen veriler

Transplantasyon ortamı bileşenleri	Aklimatize olan bitkilerin %'si
Kum : torf : perlit(1:1:1 v/v)	98
Torf : perlit (1:3 v/v)	48



Şekil 3.6.1. Kum : torf : perlit (1:1:1 v/v) içeren Macenta kabında aklimatize edilen fideler.

Aklimatize olan fideler daha sonra yine kum : torf : perlit (1:1:1 v/v) içeren viyollerde sera koşullarına alınmış ve sera koşullarına alınan bitkilerin hayatta kalma oranı beş haftanın sonunda % 76 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.6.2).

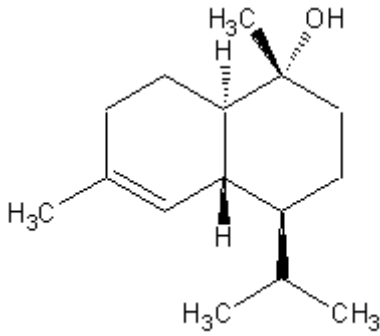


Şekil 3.6.2. Sera koşullarında hayatta kalan mikropropage bitkiler (A,B).

3.7. Uçucu Yağ Analizlerine İlişkin Bulgular

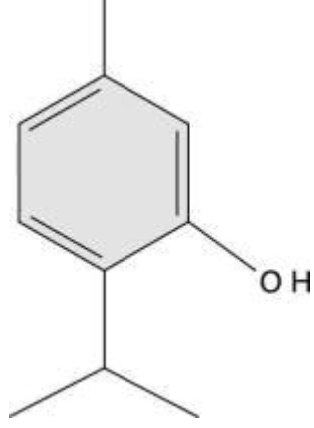
Doğal ortamdan toplanan bitkilerin toprak üstü kısımları (DB), çiçekleri (Ç) ve mikroçoğaltılmış bitkilerin vejetatif kısımları (MB)'nin uçucu yağ analizleri GC/MS yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem sonucunda *Origanum sipyleum* L. bitkisinin uçucu yağında on sekiz bileşen karakterize edilmiştir. Tanımlanan bu bileşikler doğal bitkilerin uçucu yağının %71,63' ünü, mikroçoğaltılmış bitkilerin uçucu yağının % 99,22' sini ve çiçek uçucu yağının % 90,52' sini oluşturmaktadır. Hem doğal bitkinin kısımları (DB ve Ç) arasında, hemde mikro çoğaltılmış bitkilerde (MB) uçucu yağ bileşenleri açısından farklılıklar gözlenmiştir.

Yapılan analizler sonucunda doğal bitkilerin vejetatif kısmının uçucu yağ ana bileşeninin **α -cadinol** (% 23,41) (şekil 3.7.1),



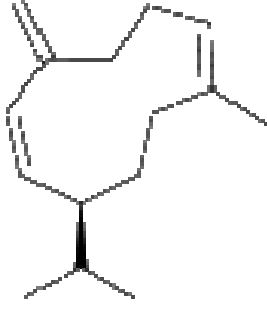
Şekil 3.7.1. α -Cadinol

mikroçoğaltılmış bitkilerin uçucu yağ ana bileşeninin **timol** (% 48,55) (şekil 3.7.2),



Şekil 3.7.2. Thymol

ve doğal bitkilerin çiçeklerinden elde edilen uçucu yağın ana bileşeninin **Germacrene-D** (% 20,13) (şekil 3.7.3) olduğu saptanmıştır.



Şekil 3.7.3. Germacrene-D

Bitkilerin uçucu yağ analizlerinin sonuçları çizelge 3.7.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.7.1. *Origanum sipyleum* L.'un uçucu yağ bileşenleri (MB: Mikropropage Bitki, DB: Doğadan toplanan bitkinin toprak üstü kısmı, Ç: Doğadan toplanan bitkinin çiçekleri, RRI: Relative Retention Indices).

	RRI [§]	Bileşik	MB yağı (%)	DB yağı (%)	Ç yağı (%)	Tanımlama Metodları
1	1466,67	β - Pinen	-	1,34	-	GC, GC/MS
2	1511,70	α - Copaen	1,41	-	6,22	GC, GC/MS
3	1544,68	Linalool	1,28	-	7,95	GC, GC/MS
4	1555,32	β -Cubabene	-	-	2,69	GC, GC/MS
5	1598,40	Tymyl methyl ether	2,24	-	-	GC, GC/MS
6	1610,93	Carvacrol methyl ether	4,67	-	-	GC, GC/MS
7	1612,02	Terpinen-4-ol	-	3,24	3,38	GC, GC/MS
8	1622,95	<i>trans</i> -Caryophyllene	3,17	1,57	5,91	GC, GC/MS
9	1696,72	α -Humulen	0,57	-	-	GC, GC/MS
10	1701,69	α -Terpineol	-	-	7,42	GC, GC/MS
11	1710,73	1- Borneol	2,00	3,49	2,27	GC, GC/MS
12	1735,00	Germacrene- D	9,01	8,82	20,13	GC, GC/MS
13	1758,76	Bicyclogermacrene	5,37	5,29	8,77	GC, GC/MS
14	1772,88	δ - Cadinene	2,80	2,98	8,56	GC, GC/MS
15	2137,87	(+)- Spathulenol	6,69	6,67	-	GC, GC/MS
16	2171,49	Thymol	48,55	3,38	7,33	GC, GC/MS
17	2199,57	Muralol	-	6,87	-	GC, GC/MS
18	2244,03	α - Cadinol	11,46	23,41	9,89	GC, GC/MS
Total Uçucu yağ			99,22	71,63	90,52	

4. TARTISMA VE SONUÇLAR

Günümüzde gerek besin katkı maddesi olarak kullanılan, gerekse de içeriğindeki etken maddeler nedeniyle tıbbi öneme sahip ticari bitki türlerinin doğadan toplanma yoluyla elde edilmesi, bu bitkilerin doğadaki popülasyonlarını tehlikeye atmaktadır. Bu tehlikenin boyutu endemik bitki türleri açısından daha da endişe vericidir. Hem bu tehlikenin ortaya çıkışı, hemde hızla artan dünya nüfusu karşısında yeni üretim tekniklerine gereksinim duyulması, araştırmacıları alternatif üretim teknikleri için yeni prosedürler ortaya koyma yoluna yönlendirmiştir. Bunun sonucunda da, hem ekonomik öneme sahip, hem de endemik bitki türlerinin gen kaynaklarının korunmasını (Fay, 1992) ve ticari amaçlı klonal çoğaltımını (Debergh and Maene, 1981) amaçlayan doku kültürü çalışmaları son yıllarda dünya literatürlerinde sıkça yer almaya başlamıştır (Chaturvedi et al.,2007).

Bizim çalışmamızda da, Türkiye için endemik olan ve ucucu yağlarının içeriğinde bulunan etken maddeler sebebi ile aynı zamanda tıbbi öneme sahip *Origanum sipyleum* L. bitkisinin *in vitro* tohum çimlenme şartları, doku kültürü tekniklerinden meristem kültürü yolu ile mikro çoğaltım protokolü ve ayrıca hem doğal bitkide hem de mikropropage bitkilerde uçucu yağ verimi ve uçucu yağ bileşenleri araştırılmıştır.

Çalışmamızda ilk olarak sterilize fide elde etmek amacıyla doğadan toplanan bitkinin tohumları çimlendirilmiştir. Çimlenme denemeleri düzenlenirken de endemik olan bitkisel materyalimizin tohum çimlenmesi üzerine farklı sıcaklık ve besi ortamlarının etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla agar, yarım kuvvet MS (Y1), tam kuvvet MS (Y2), yarım kuvvet modifiye MS (T1) ve tam kuvvet modifiye MS (T2) besi ortamlarına ekilen ve iki farklı sıcaklık (18 ve 25° C) şartlarında kültüre edilen tohumlarda ilk çimlenme, tüm gruplarda, 7. günde (bir haftanın sonunda) ortaya çıkmış ve 20. günde sona ermiştir.

Sonuçlarımıza bakıldığında 20. günde en yüksek çimlenme oranının % 68,3 ile CaCl₂ içeriği arttırılmış olan modifiye tam kuvvet MS (Akçam ve Yürekli, 1993) (T2) besi ortamında ve 18 °C sıcaklıkta gerçekleştiği

görülmektedir. Bu sonuç, ortamdaki nispeten yüksek CaCl_2 varlığının bitkinin çimlenme oranını arttırdığı şeklinde yorumlanabilir. Konuyla ilgili literature bakıldığında, farklı bitki türlerinin tohum çimlenmeleri üzerine CaCl_2 'ün bu tür bir etkisinden söz edildiği görülmektedir (Tobe et al., 2004). CaCl_2 'ün bu etkiyi ortamda bulunan sodyum, potasyum ve magnezyum klorürlerin toksik etkisini hafifleterek (ya da ortadan kaldırarak) gerçekleştirdiği ileri sürülmektedir (Tobe et al., 2003). Adı geçen tuzların (sodyum, potasyum ve magnezyum klorür) *Aristida adscensionis* ve *Bassia dasyphylla* bitkilerinde radikula çıkışında toksik oldukları belirtilmektedir (Tobe et al., 2003). Diğer farklı bitki türlerinde bu durum, yani tuzların toksik etkisi, henüz radikül ortaya çıkmadan da gerçekleşebilmektedir (Hosseini et al., 2002).

En son çimlenmenin kaydedildiği 20. günde yapılan kök-gövde boyu ile taze ve kuru ağırlık ölçümlerinden de anlaşıldığı üzere, ortamda CaCl_2 'ün nispeten fazla bulunuşu, tohumların çimlenmesiyle ortaya çıkan fidelerin gelişimini de olumlu yönde etkilemiştir (Çizelge 3.2.1 ve 3.3.1). Nitekim bitkinin doğal yetişme ortamı (habitat) olarak kalkerli kayaçlarca zengin bölgeleri seçiyor olması da bu sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Ayrıca Sahi (2009) çalışmasında CaCl_2 ' un bitki gelişimi üzerine olumlu etkisinden söz etmiş, yine Cramer et al. (1990) ve Jaleel et al. (2007) de çalışmalarında kök büyümesi üzerine Ca 'un düzenleyici etkisini rapor etmişlerdir.

Ortam sıcaklığı yönünden bakıldığında, en fazla çimlenme $18\text{ }^\circ\text{C}$ 'de kaydedilirken, en iyi fide gelişimi $25\text{ }^\circ\text{C}$ 'de belirlenmiştir (Şekil 3.1.2. ve 3.2.2.). Bu sonuçlar da bize *Origanum sipyleum* bitkisinin çimlenme için nispeten düşük sıcaklığa ihtiyaç duyduğunu, ancak fide gelişimi yönünden mezofit olduğunu düşündürmektedir.

Mikro çoğaltım denemelerinde, bitkinin 20 günlük fidelerinin $0,5\text{ cm}$ 'lik tepe tomurcukları 1 mg/l BAP içeren T2 ortamına yerleştirilmişlerdir. Bu ortamdaki beş haftalık birinci kültür periyodu sonunda, her bir tepe tomurcuğundan her biri $1,8\text{ cm}$ boyunda $3,7$ adet, sürgün ortaya çıktığı gözlenmiştir (Çizelge 3.4.1.). İlk altkültürü takiben yapılan üç haftalık ikinci altkültür sonunda ise sürgün sayısının arttığı ve her biri $1,2\text{ cm}$ boyunda $7,8$ adet

sürgün oluştuğu bulunmuştur. Sonraki üç haftalık alt kültürler (~ 5 ay) boyunca sürgün çoğalım oranı her eksplant için ortalama 8 sürgün olarak hesaplanmıştır. Bizim sonuçlarımızı destekler nitelikte, Ueno ve Shetty (1998), Socorro et al.,(1998) ve Moreno-Fortunato ve Avato (2008) adlı araştırmacılar da sitokininlerden benzyl amino purin'in, aynı miktarının (1 mg/l BAP), farklı *Origanum* türlerinin, doku kültürlerinde ve çoklu sürgün üretiminde etkin olduğunu rapor etmişlerdir.

Yedinci altkültürün (~ 5 ay) sonunda mikroçoğaltılmış fideler 0,5 ve 1 mg/l IBA T2 besi ortamına aktarılmışlardır. Oksinlerin, çeşitli bitki türlerinde köklenmeyi teşvik edici ajanlar olarak çalıştığı bilinmektedir (Thomas ve Philip, 2005). Goleniowski ve ark. (2005), sürgün çoğaltım ortamında birlikte yer alan BA (0,28 μ M) ve NAA (0,53 μ M)'nin *O.vulgare* 'de kendiliğinden köklenmeye yol açtığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda, 0,5 mg/l IBA içeren besi ortamında 3 haftalık altkültürün sonunda, fidelerin % 96 sının köklendiği gözlenmiştir. 1 mg/l IBA içeren besi ortamındaki fidelerin ise sadece % 12 sinde köklenme kaydedilmiştir. Bu sonuçlardan, 1 mg/L BAP varlığında mikroçoğalmış *Origanum sipyleum* fidelerinin köklenmesinde, 0,5 mg/L IBA'nın daha etkili olduğu anlaşılmaktadır.

Öte yandan köklenmenin teşvik edilmesi için uygulanan 0,5 mg/l IBA nin köklenme ortamındaki fidelerin sürgün sayısını, her eksplant için ortalama 23.7 sürgün olacak şekilde arttırdığı gözlenmiştir. IBA nin sürgün çoğalımı üzerine benzer etkileri çeşitli çalışmalarla ifade edilmiştir (Zhu et al., 2005; Azad et al., 2006). IBA (Zhu et al., 2005) ve BAP (Kadota and Niimi, 2003)'in devam eden alt kültürler boyunca sürekli olarak kullanımı, sürgün sayısında artışa yolaçmakla birlikte, ortaya çıkan sürgünlerde “hiperhidrisite” denen aşırı sulu ve kırılğan yapıya da sebep olmaktadır. Ayrıca artan altkültür sayısının da bu duruma katkısının bulunduğu ve narin yapılı sürgün sayısı artışının “rejuvenasyon” olarak adlandırılan birtakım fizyolojik değişikliklerle açıklanabileceği belirtilmektedir (Webster and Jones, 1989).

Bu nedenle, köklenmiş fideler (Şekil 3.6.1.), iklimlendirme aşamasından önce, herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besi ortamında bir kez

alt kültüre alınmışlardır. Park ve ark. (2008) da tekrarlı altkültürlerden sonra fidelerin, reinvigorasyon (serpilme) için, hormonsuz ortama aktarılmasının yararlı olduğunu rapor etmektedir. Bu (hormonsuz) ortamda geçirdikleri 3 haftalık 1 altkültürden sonra köklenmiş fideler torf: kum: perlit (1:1:1 v/v) ve torf: perlit (1:3 v/v) içeren ağzı kapaklı kültür kaplarına (maçenta) aktarılmışlardır. Bu haliyle büyüme odasında 10 gün kalan kültürlerin bu süre sonunda kapakları açılmış ve 10 gün daha neme doygun büyüme odasında tutulmuşlardır (aklimatizasyon). Aklimatizasyon esnasında benzer uygulama farklı araştırmacılar tarafından da önerilmektedir (Espinosa et al., 2006; Pola et al., 2007). Toplam 20 günlük sürenin sonunda fidelerin torf: kum: perlit (1:1:1 v/v) karışımında (% 98), torf: perlit (1:3 v/v) karışımına (% 48) göre daha fazla hayatta kaldıkları saptanmıştır. Literatüre bakıldığında bitkilerin tarla koşullarına şaşırtılmalarında benzer substratların kullanıldığı görülmektedir (Zhang et al., 2007). Bu nedenle fideler aynı sürenin (20 gün) sonunda torf: kum: perlit (1:1:1 v/v) içeren viyollerde seraya aktarılmıştır. Fidelerin sera şartlarında geçirdikleri 5 haftanın sonunda % 76 oranında hayatta kalmayı başardıkları ve gelişim ve morfolojik karakteristikleri açısından anaç bitkilere benzedikleri gözlenmiştir.

Bitkinin gerek doğadan toplanan, gerekse mikropropagasyonla elde edilen bireylerinde uçucu yağ içeriğinin belirlenmesi için yapılan analizler sonucunda onsekiz bileşen tanımlanmıştır. Bitkilerin uçucu yağ ana bileşeninin α -cadinol olduğu saptanmış ve doğal bitkilerdeki α -cadinol miktarının (% 23.41), mikro çoğaltılmış bitkilerinkinden (% 11.46) yaklaşık iki kat fazla olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.7.1). α -cadinol miktarları arasındaki bu fark, Alves-Pereira ve Fernandes-Ferreira (1998)'nin da çalışmalarında vurguladığı üzere, her iki gurup bitkisel materyalin denemelerde kullanıldıkları anda farklı gelişim fazında olmalarından kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Analiz sonuçlarına göre α -cadinol'un yanı sıra ikinci ana bileşenin timol olduğu ve mikro çoğaltılmış bitkilerin timol içeriğinin (% 48.55), doğal bitkilerin toprak üstü kısımlarındakinden (% 3.38) yaklaşık 15 kat, çiçektekinden (% 7.33) yaklaşık 6 kat (Çizelge 3.7.1) ve yine Başer (2002) 'in 12 farklı lokaliteden topladığı örneklerle yaptığı çalışmadan elde ettiği sonuçlardan 3 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Timol içeriğindeki bu artış mikroçoğaltım aşamasında kullanılan sitokininin etkisinden kaynaklanıyor olabilir. Mikroçoğaltılmış bitkilerde

sitokininin sözü geçen bileşiğin biyosentezini teşvik ettiği çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (El-Keltawi and Croteau, 1987; Farooqi et al., 1993).

Farklı *Origanum* türleri ile yapılan çalışmalarda (Ieswaart, 1980) rapor edilen **karvakrol**, bizim çalışmamızda kullandığımız, ne doğal bitkilerin toprak üstü kısımları ve çiçeklerinde, ne de mikro çoğaltılmış bitkilerde bulunmamıştır. Fakat Özkan ve ark. (2007), aynı türün Konya'dan toplanan örnekleri ile yaptıkları çalışmada, bu bileşiğin iz miktarda (% 0.6) bulunduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca Başer (2002)' de çalışmasında bu bileşiğin varlığını rapor etmiştir. Adı geçen çalışmalarda bahsedilen aynı türün farklı ekotiplerindeki (ekolojik izolasyon sonucu bir türün farklı populasyonlarının farklı evrimsel etkiler altında farklılaşması sonucu oluşan ırkları; ekolojik ırk.) karvakrol içeriğindeki değişiklik, bitkilerin yetiştiği yerdeki coğrafi ve ekolojik farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir (Başer, 2002). Konya ilinden toplanan *O. sipyleum*' a benzer olarak, Socorro et al. (1998) da doğal ve mikro çoğaltılmış *O. bastetatum* ile yaptıkları çalışmada iz miktarda (% 0.7 den az) karvakrol varlığını rapor etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda elde edilen mikro çoğaltılmış bitkilerin uçucu yağında saptanan α -Humulen (% 0.57), ve doğal bitkilerin çiçeklerinden elde edilen uçucu yağda saptanan β -cubabene (% 2.69)'e (Çizelge 3.7.1), yukarıda sözü geçen lokalitelerden toplanan bitkiler de dahil (Başer, 2002; Özkan ve ark., 2007), topladığımız doğal bitkilerin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağda rastlanmamıştır. Farklı çalışmalarda örneği kurutma koşulları, distilasyon teknikleri, coğrafi ve iklimsel koşullar, genetik karakteristik ve büyüme fazı gibi parametrelerin de, bitki uçucu yağ verimi ve uçucu yağ içeriğindeki değişikliklerde rol oynadığı rapor edilmiştir (Vokou, Kokkini, and Bessiere, 1988, 1993; Tucker and Maciarelo, 1994; Kokkini,1996).

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye'ye endemik olan bir bitkinin *in vitro* şartlarda klonal çoğaltımı için gerekli şartlar ve ayrıca *in vitro* elde edilen bu bitkilerin dış ortama uyum için ihtiyaç duydukları çevresel koşullar belirlenerek tekrar edilebilir bir protokol ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca yapılan uçucu yağ analizi ile de bitkinin uçucu yağ içeriği, uçucu yağ bileşenleri ve bu bileşenlerin uçucu

yağdaki miktarları belirlenmiştir. Gerek mikroçoğaltılmış gerekse doğadan topladığımız bitkisel örneklerin uçucu yağ içeriği analizinden ortaya çıkan bize göre en önemli sonuç, mikroçoğaltılmış bitkilerde timol biyosentezinin kaydedeğer ölçüde artmış olmasıdır. Thymol, bilindiği gibi, yemeklerde baharat olarak kullanılmasının yanı sıra, antifungal yönüyle tıbbi preparatlarda da rağbet görmektedir (Filoche et al., 2005). Thymolle ilgili sonuçlarımızdan hareketle, sitokininle indüklenmiş mikropropagasyon protokolünün aynı zamanda, *Origanum*'un diğer türlerine nazaran düşük etken madde (uçucu yağ) içeriğine sahip olduğu belirtilen, *O. sipyleum*'un thymol içeriği açısından zengin hatlarını elde edebilmek için uygun olduğu da söylenebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akçam, E., Yürekli, A.K.**, 1993, Callus culture studies on *Origanum spyleum* L. species. J. Fac. Sci. Ege Univ. 15(1): 21-25 pp.
- Akçam Oluk E, Demiray H, Gürel E.**, 2003, Alkaloid production from cell suspension cultures obtained from osmotic-stressed callus lines of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), Plant Cell Biotech and Mol Biol, 4(1-2):91-94 pp.
- Akçam Oluk, E, Orhan, S.**, 2009, Thidiazuron induced micropropagation of *Hypericum triquetrifolium* Turra, African J Biotech, 8(15):3506-3510 pp.
- Akçam Oluk, E., Orhan S., Karakaş Ö., Çakır A. and Gönüz A.**, 2010, High efficiency indirect shoot regeneration and hypericin content in embryogenic callus of *Hypericum triquetrifolium* Turra, African Journal of Biotechnology, 9(15): 2229-2233 pp.
- Akgül, A.**, 1989, Türkiye nin Baharatları.II. Labiatae Familyası,Gıda 14(4): 229-233 s.
- Akgündüz, E., Çekiç, O., Özudoğru, E., Erdoğan, S., Karauz, E.S., Tezel, D., Toru, E.**, 2009, Türkiye Biyolojik Çesitliliğinin Coğrafi Bilgi Sistemleri Yardimiyla Izlenmesi: Nuh'un Gemisi Biyolojik Çesitlilik Veritabani, TMMOB Coğrafi Bilgi Sistemleri Kongresi 2009, 5 s.
- Akman, Y. ve Ketenoğlu, O.**, 1986, The Climate and Vegetation of Turkey, in *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*. I. C. Hedge (Ed.), **89B**, 123.
- Alves-Pereira, I.M.S., and Fernandes-Ferreira, M.**, 1998, Essential Oils and Hydrocarbons From Leaves and Calli of *Origanum vulgare* ssp. Virens, *Phytochemistry*, 48(5): 795 -799 pp.
- Arslan, M., Ayanoglu, F., Sarihan, E.O.**, 2005, Farkli Kekik (*Origanum*) Turlerinin Dogu Akdeniz Kosullarinda Herba Verimleri, Eterik Yag Oranlari ve Yag Bilesenleri, Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, 1: 505-510 s.
- Avcı, M.**, 1993, Turkiyenin Flora Bolgeleri ve Anadolu Diagonaline Coğrafi Bir Yaklasim,Turk Coğrafya Dergisi 28: 225-248 s.
- Azad, M.A.K., Yokota ,S., Ishiguri, F., Yoshizawa, N.**, 2006, Plant regeneration from mesophyll protoplasts of a medicinal plant, *Phellodendron amurense* rupr, *In vitro: Cell Dev. Biol. Plant*, 42(6): 502 -506 pp.
- Bansal, K.C., Singh, A.K., Sharma, M., Varshney, R., and Agarwal, S.S.**, 2006, Plant regeneration from alginat-encapsulated shoot tips of *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn, a medicinally important plant species, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 42:109 -113 pp.
- Baser, K.H.C.**, 2002, Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey *Pure Appl. Chem.*, Vol. 74(4): 527–534 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Başer, K. H. C., Kırmıner, N., Tümen G.,** 1995, The Essential Oils of Turkish *Origanum* Species: A Treatise, 13th International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils 2: 200-210 pp.
- Baytop, T.,** 1999, Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İstanbul 550 s.
- Baytop, T. ve Başer, K.H.C.,** 1995 On Essential Oils and Aromatic Waters Used as Medicine in İstanbul Between 17 th. and 19 th. Centuries-Başer, K.H.C., (ed.): Flavours Fragrances and Essential Oils-Proceedings of the 13 th. International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils.
- Brown, D.C.W., Thorpe, T.A.,** 1995, Crop improvement through tissue culture. World J. Microbiol. Biotechnol. 11: 409 -415 pp.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L., and Ferret, A.,** 2007, Invited Review:Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 90: 2580 -2595 pp.
- Chaturverdi, H.C., Jain, M.,and Kidwai, N.R.,** 2007, Cloning of Medicinal Plants Through Tissue Culture, Indian Journal of Experimental Biology, 45: 937-948 pp.
- Ceylan, A.,** 1987, Tıbbi Bitkiler 2 (Uçucu Yağ İçerenler), Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, İzmir, 481:188.
- Cramer, G.R., Epstein, E., and Lauchli, A.,** 1990, Effect of sodium, potassium and calcium on salt stressed barley: Growth analysis, *Physiologiae Plantarum*, 80: 83–88 pp.
- Çelik, G.Y., ve Çelik, E.,** 2007, Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 5(2): 1-6 s.
- Demarne, F., and Van der Walt, J.J.A.,** 1993, Composition of essential oil of *Pelargonium citronellum* (Geraniaceae), Journal of Essential Oil Research, 5:233-238 pp.
- Da Silva, J. A. T.,** 2003, Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology, African Journal of Biotechnology 2 (12): 683-691 pp.
- Davis, P. H., Mill, R. R. Tan, K., (Eds.),** 1988, Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Supplement),Vol. 10, University Press, Edinburgh.
- Davis, S. D., Heywood V. H. and Hamilton, A. C.,** 1994, Centres of Plant Diversity, 1: 2-7 pp.
- Debergh, P.C., and Maene, L.J.,** 1981, A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture, *Scientia Horticulturae* 14: 335-345 pp.
- Dhaka, N., and Kothari, S.L.,** 2005, Micropropagation of *Eclipta alba* (L.) Hassk- An Important Medicinal Plant, Plant, Invitro Plant, 41(5):658-661 pp.
- Dorman, H.J.D., and Deans, S.G.,** 2000, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, Journal of Applied Microbiology, 88: 308-316 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Duru, M.E., Öztürk, M., Ugur, A., Ceylan, Ö.,** 2004, The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey, *Journal of Ethnopharmacology* 94: 43–48 pp.
- El-Gengaihi, S., Taha, H. S. and Kamel, A. M.,** 2006, In vivo and in vitro Comparative Studies of *Origanum* species. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol. 4 (3&4): 127 -134 pp.
- El-keltawi, N. E., and Croteau, R.,** 1987, Influence of Foliar Applied Cytokinins on Growth and Essential Oil Content of Several Members of The Lamiaceae, *Phytochemistry*, 26(4): 891-895 pp.
- Espinosa, A.C., Pijut, P.M., Michler, C.H.,** 2006, Adventitious shoot regeneration and rooting of *prunus serotina* in vitro cultures, *Hort Science*, 41(1):193-201 pp.
- Evans, D.A., Sharp, W.R., and Medina-Filho, H.P.,** 1984, Somatoclonal and Gametoclonal Variation, *Amer. J. Bot.*, 71(6): 759-774 pp.
- Farooqi, A.H.A., Sharma, S., Naqvi, A.A., and Khan, A.,** 1993, The Effect of Kinetin on Flower and Oil Production in *Rosa damascena*, *Journal of Essential Oil Research*, 5:305–309 pp.
- Fay, M.F.,** 1992, Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods, In: *Vitro Cellular and Developmental Biology*. pp. 1-4. 28 pp.
- Filоче, S.K., Soma, K., Sissons, C.H.,** 2005, Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate, *Oral Microbiol Immunol* , 20: 221-225 pp.
- Fuglie, K.O., Zhang, L., Salazar, L. and Walker, T.,** 1999. Economic Impact of virus-free sweetpotato planting material in shandong province, China, CIP program report, 1997-1998.
- Gairi, A., and Rashid, A.,** 2004, TDZ induced somatic embryogenic in non-responsive caryopsis of rice using shot treatment with 2,4-D. *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.*, 76: 29-33 pp.
- George, E. F., Hall, M. A., De, Klerk J.,** 2008, Plant Propagation by Tissue Culture, Chapter 1: Plant Tissue Culture Procedure – Background, 3rd Edition, 1-28 pp.
- Goleniowski, M.E., Flamarique, C., Bima, P.,** 2003, Micropropagation of Oregano (*Origanum vulgare* x 3 APPLII) from meristem tips, *In vitro: Cell Dev. Biol. Plant*, 39: 125 -128 pp.
- Guo, Y. T., and Wang, J. W.,** 2008, Stimulation of taxane production in suspension cultures of *Taxus yunnanensis* by oligogalacturonides, *African Journal of Biotechnology*, 7 (12): 1924 -1926 pp.
- Hagimori, M., Matsumoto, T., and Obi, Y.,** 1982, Studies on the production of *Digitalis* Cardenolides by plant tissue culture, *Plant Physiol.* 69:653-656 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hay, R.K.M., and Svoboda, K.P.,** 1993, Introduction. In: Hay, R.K.M., and Waterman, P.G., (eds). Volatile oil crops: their biology, biochemistry, and production. Longman, UK, 5-19 pp.
- Hay, R.K.M., and Waterman, P.G.,** 1993, Introduction. In: Hay, R.K.M., and Waterman, P.G., (eds). Volatile oil crops: their biology, biochemistry, and production. Longman, UK, 1-4 pp.
- He, W.T., Hou, S.W., and Wang, C.Y.,** 2006, Callus Induction and High-Frequency Plant Regeneration from Hypocotyl and Cotyledon Explants of *Arctium lapa* L., *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 42: 411 -414 pp.
- Hosseini, M.K., Powell, A.A. and Bingham, I.J.,** 2002, Comparison of the seed germination and early seedling growth of soybean in saline conditions, *Seed Science Research*, 12: 165–172 pp.
- Ibitoye, D. O., Akin-Idowu, P. E., and Ademoyegun, O. T.,** 2009, Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops, *African Journal of Biotechnology*, 8 (16): 3782-3788 pp.
- Ietswaart, J.H.,** 1980, in *A Taxonomic Revision of The Genus Origanum (Labiatae)*, Leiden University Press, The Hague, p 15
- Ietswaart, J.H.,** 1982. *Origanum*. In: Davis, P. H., ed. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburg University Press, vol 7, Edinburg, 297- 313 pp.
- Iijima, Y., Davidovich-Rikanati, R., Fridman, E., Gang, D.R., Bar, E., Lewinsohn, E., and Pichersky, E.,** 2004, The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the pelate glands of three cultivars of basil, *Plant Physiology*, 136: 3724-3736 pp.
- IUCN,** 2010 , *Dünya Doğayı Koruma Birliği 2010 Yılı Raporu*, 35 s
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Sankar, B., and Panneerselvam, R.,** 2007, Calcium chloride effects on salinity induced oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus*, *Comptes Rendus Biologies*, 330: 674–683 pp.
- Kadota, M., Niimi, Y.,** 2003, Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar stocks, *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 72: 261 -265 pp.
- Kaya, Y., ve Aksakal, Ö.,** 2005, Endemik Bitkilerin Dünya ve Türkiyedeki Dağılımı, *Erzincan Eğitim Fakültesi Dergisi* 7(1):85-99.
- Keng, C. L., Yee, L. S., and Pin, P. L.,** 2009, Micropropagation of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. an important medicinal plant, *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 3(3), pp. 105 -111 pp.
- Kitiki, A.,** 1996 Status of Cultivation and Use of Oregano in Turkey, *Proceeding of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, Valenzano (Bari)*, p: 122-132 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kokkini, S.**, 1996, Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. In Proceedings of the IPGRI international workshop on oregano, CIHEAM, Valenzano, Bari, Italy, 2–13 pp.
- Lattoo, S.K., Dhar, R.S., Dhar, A.K., and Sharma, P.R., Agarwal, S.G.**, 2006, Dynamics of essential oil biosynthesis in relation to inflorescence and glandular ontogeny in *Salvia sclarea*, *Flavour and Fragrance Journal*, 21: 817-821 pp.
- Loo, S.W.**, 1945, Cultivation of excised stem-tips of asparagus in vitro, *Am. J. Bot.*, 32: 13-17 pp.
- Loizzo, M. R., Menichini, F., Conforti, F., Tundis, R., Bonesi, M., Saab, A. M., Statti, G. A., de Cindio, B., Houghton, P. J., Menichini, F., Frega, N. G.**, 2009, Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils, *Food Chemistry* 117: 174–180 pp.
- Malik, S.K., Chaudhury, R., Kalia, R.K.**, 2005, Rapid *in vitro* multiplication and conservation of *Garcinia indica*: A tropical medicinal tree species. *Scientia Horticulturae*. 106:539 -553 pp.
- Martin, K.P., Nishita, I.K., Ligimol., Beegum, A.S., and Madhusoodanan, P.V.**, 2006, Micropropagation and encapsulation of Medicinally Important *Chonemorpha grandiflora*, *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant*, 42: 385 -388 pp.
- Mohamed, M. A. H., Alsadon, A. A., and Al Mohaidib, M. S.**, 2010, Corn and potato starch as an agar alternative for *Solanum tuberosum* micropropagation, *African Journal of Biotechnology*, 9 (1): 012-016 pp.
- Moreira, O., Martins, J., Silva, L., and Moura, M.**, 2009, Propagation of the endangered Azorean cherry *Prunus azorica* using stem cuttings and air layering, *Arquipélago*, Life and Marine Sciences, 26: 09-14 pp.
- Moreno-Fortunato, I., Avato, P.**, 2008, Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 93(2): 139 -149 pp.
- Murashige, T., Skoog, F.**, 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473 -497 pp.
- Murthy S. R. K., Kondamudi R. and Vijayalakshmi V.**, 2010, Micropropagation of an endangered medicinal plant *Ceropegia spiralis* L., *Journal of Agricultural Technology*, 6(1): 179-191 pp.
- Nakiboğlu, M., Öztürk Ürek, R., Ayar Kayalı, H. and Tarhan, L.**, 2007, Antioxidant capacities of endemic *Sideritis sipylea* and *Origanum sipyleum* from Turkey, *Food Chemistry*, 104: 630-635 pp.
- Nayak, S., Kuanar, A., Mohanty, S., Panda, M.K.**, 2009, Essential oils from leaves of micropropagated turmeric, *Current Science*, 96(9):1166-1167 pp.
- Özçelik, H.**, 2000, Studies on protections of endemic and rare plants of Lakes region. *Bull. Pure Appl. Sci.* 19B: 93 -116 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Özkan, G., Baydar, H., and Erbas, S.,** 2010, The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites* L.), *J Sci Food Agric* 2010; 90: 205–209 pp.
- Özkan, G., Sagdic, O., Ekici, I., Öztürk, I., Özcan, M. M.,** 2007, Phenolic compounds of *Origanum sypyleum* L. extract and its antioxidant and antibacterial activities. *J. Food Lipids*, 141(2): 157 -169 pp.
- Park, S.Y., Kim, Y.W., Moon, H.K., Murthy, H.N., Choi, Y.H., Cho, H.M.,** 2008, Micropropagation of *Salix pseudolasiogyne* from nodal explants, *Plant Tiss Org Cult*, 93:341-346 pp.
- Paster, N., Menasherov, M., Shaaya, E., Juven, B., Ravid, U.,** 1993, The use of essential oils applied as fumigants to control mycotoxigenic fungi attacking stored grain. *Hassadeh*. 74: 25 -27 pp.
- Pola, S., Saradamani, N., Raman, T.,** 2007, Enhanced shoot regeneration in tissue culture studies of Sorghum bicolor, *J Agricultural Technology*, 3(2): 275-286 pp.
- Rashid, H., Chaudry, Z., Abbas, S., Yasmin, A., Ahmed, H., and Anjum, M.A.,** 2010, Tissue culture studies in tomato (*Lycopersicon esculentum*) var. Moneymaker, *Pak. J. Bot.*, 42(1): 155-163 pp.
- Ratnasooriya, W.D., Jayakody, J.R.A.C., Premakumara, G.A.S., Ediriweera, E.R.H.S.S.,** 2005, Antioxidant activity of water extract of *Scoparia dulcis*, *Fitoterapia* 76: 220–222 pp.
- Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P.,** 2000, In vitro manipulation and propagation of medicinal plants, *Biotechnology Advances* ,18: 91–120 pp.
- Sahi, B.G.,** 2009, Effect of cycocel spray and calcium chloride on the growth and flowering of *Zinnia Elegans* *Taeq*, *J. Duhok Univ.* 12(1): 39 -43 pp.
- Santarem E.R. and Finer J.J.,** 1999, Transformation of soybean *Glycine max* (L.) MERRILL using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium, *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant*, 35: 451 -455 pp.
- Seçmen, Ö.,** 2004, *Türkiye Florası Kitabı*, E.U. Fen Fakültesi Baskı İşleri İzmir 51 s
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Gork, G., Bekat, L., Leblebici, E.,** 1998, *Tohumlu Bitkiler Sistematigi Kitabı*, E.U. Basımevi, İzmir, 395 s
- Sezik, E., Tabata, M., Yesilada, E., Honda, G., Goto, K., Ikeshiro, Y.,** 1991, Traditional medicine in Turkey. I. Folk medicine in Northeast Anatolia. *J Ethnopharmacol* 35: 191–196 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shimomura, K., Yoshimatsu, K., Jaziri, M., Ishimaru, K.,** 1997, Traditional medicinal plant genetic resources and biotechnology applications. Plant Biotechnology and Plant Genetic resources for Sustainability and Productivity. (Series:Biotechnology Intelligence Unit),pp. 209–225 pp.
- Socorro, O., Tarrega, I., Rivas, F.,** 1998, Essential oils from wild and micropropagated plants of *Origanum bastetanum*, Phytochemistry, 48(8): 1347-1349 pp.
- Stanilova M., Georgieva K., Petkova S., Gorgorov R., Doncheva S.,** 2009, Physiological characteristic of in vitro and field cultivated *Leucosium aestivum* L. plants, General and Applied Plant Physiology, 35(3-4): 140-145 pp.
- Stoeva, T. and Iliev, L.,** 1997, Influence of some phenylurea cytokinins on spearmint essential oil composition, Bulg. J. Plant Physiol., 23(3-4): 66-71.
- Subotic A., Jevremovic S. and Grubisic D.,** 2009, Influence of cytokinins on in vitro morphogenesis in root cultures of Centaurium erythraea- Voluable medicinal plant, Scientia Horticulturae, 20(3): 386-390 pp.
- Sudha, C.G., Krishnan, P.N.,Pushpangadan, P., and Seeni, S.,** 2005, In Vitro Propagation of Decalepis aryalpathra, A Critically Endangered Ethnomedicinal Plant, Invitro Plant, 41(5): 648-654 pp.
- Taha, H. S., El-Bahr, M.K., and Seif-El-Nasr, M.M.,** 2009, *In vitro* studies on Egyptian *Catharanthus roseus* (L.) G.Don. IV: Manipulation of Some Amino Acids as Precursors for Enhanced of Indole Alkaloids Production in Suspension Cultures, Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3(4): 3137 -3144 pp.
- Taji, A.,** 2003, Plant tissue culture, GENE, 251-351
- Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun M.,** 1998, Farmasötik Botanik, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 343 s.
- Tanker, M., Tanker, N., Şarer, E., Atasu, E., Şener, B., Kurucu, S., Meriçli, F.,** 1990, Result of Certain Investigation on the Volatile Oil Centaining Plants of Turkey, Essential Oils for Perfumery and Flavours, Preceedings of an International Conference, 16-29 pp.
- Thomas, T.T., and Philip, B.,** 2005, Thidiazuron induced high-frequency shoot organogenesis from leaf-derived callus of a medicinal climber, *Tylophora indica* (Burm.F) Merrill, *In vitro: Cell Dev. Biol. Plant*, 41: 124 -128 pp.
- Tobel, K., Zhang, L., and Omasa, K.,** 2003, Alleviatory effects of calcium on the toxicity of sodium, potassium and magnesium chlorides to seed germination in three non-halophytes, Seed Science Research, 13:47–54 pp.
- Tobe1, K., Li, X., and Omasa, K.,** 2004, Effects of five different salts on seed germination and seedling growth of Haloxylon ammodendron (Chenopodiaceae) , Seed Science Research, 14: 345-353 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tokuhura, K. and Mii,** 1993, Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds, *Plant Cell Reports*, 13: 7 -11 pp.
- Tsay, H., Chen, U., Hsia,C., Yeh, M., and Agrawal,D.C.,** 2006, In vitro micropropagation and ex vitro acclimation of *Bupleurum kaoi*- an endangered medicinal plant native to Taiwan, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 42: 128 -133 pp.
- Tucker, A.O., and Maciarello, M.J.,** 1994, *Oregano*: Botany, chemistry and cultivation, In *Spices,Herbs and Edible Fungi*, ed. by Charalambous G.Elsevier, Amsterdam, 439–456 pp.
- UBCSEP (Ulusal Biyolojik Cesitlilik Stratejisi ve Eylem Planı),** 2001.
- UBCSEP (Ulusal Biyolojik Cesitlilik Stratejisi ve Eylem Planı),** 2007.
- Ueno, K., and Shetty, K.,** 1998, Prevention of hyperhydricity in oregano shoot cultures is sustained through multiple subcultures by selected polysaccharide-producing soil bacteria without re-inoculation, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 50: 119 -124 pp.
- Ulukapı, K., Demiral, S., Onus, A. N., Ülger, S.,** 2008, Bazı *Origanum* Turlerinde Dışardan GA3 Uygulamalarının *In Vivo* ve *In Vitro* Kosullarda Çimlenme Üzerine Etkilerinin Araştırılması, *Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(1):123–129 pp.
- Vokou, D., Kokkini, S., and Bessiere, J.M.,** 1988, *Origanum onites* (Lamiaceae) in Greece: distribution, volatile oil yield, and composition, *Econ Bot*, 42: 407–412 pp.
- Vokou, D., Kokkini, S., and Bessiere, J.M.,** 1993, Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochem Syst Ecol* 21: 287–295 pp.
- www.eski.tubitak.gov.tr/tubives/**
- www.ubcbotanicalgarden.org/potd/2006/08/origanum_barbara_tingey.php**
- www.gclctoronto.com/agilent6890.htm**
- www.progressivegardens.com/knowledge_tree/meristem.jpg**
- <http://www.dkm.org.tr/anadolu-caprazi/en/bolum-fotograf/DavisAnadolu-Caprazi.jpg>**
- Williams, C.A., and Harborne, J.H.B.,** 2002, Phytochemistry of the genus *Pelargonium*. In: Lis-Balchin, M.(ed.)*nGeranium and pelargonium: the genera Geranium and Pelargonium*, Taylor & Francis, London, pp. 99-115 pp.
- Wawrosch, C., Malla, P.R., and Koop, B.,** 2001, Clonal propagation of *Lilium nepalense* D.Don, a threatened medicinal plant of Nepal, *Plant Cell Rep.*, 20(4):285-288 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Webster, C.A., Jones, O.P.,** 1989, Micropropagation of apple rootstock M9: Effect of sustained subculture on apparent rejuvenation *in vitro*. J. Hort. Sci., 64: 421-428 pp.
- Yentür, S.,** 1984, Bitki Anatomisi, Istanbul Uni. Fen Fak. Yayınları, Istanbul, 563 s.
- Zhang, J., Liu, Y., and Wang, H.,** 2007, Micropropagation of Black Locust (Robinia Pseudoacacia L.) In: Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits, Part 1:193-199 pp, DOI: 10.1007/978-1-4020-6352-7_18 (Eds.:S. Mohan Jain and H. Häggman).
- Zheng, Z.L., Tan, J.Y.W., Liu, H.Y., Zhou, X.H., Xiang, X., Wang, K.Y.,** 2009, Evaluation of oregano essential oil (Origanum heracleoticum L.) on growth, antioxidant effect and resistance against Aeromonas hydrophila in channel catfish(Ictalurus punctatus), Aquaculture 292: 214–218 pp.
- Zhu, L.H., Yuan-Li, X., Welander, M.,** 2005, Optimization and growing conditions for the apple rootstock M26 grown in R_TA containers using temporary immersion principle, In: Hvoslef AK, Preil W (eds), Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation, Cost Action 843 (Project), Springer, 253-261 pp.

ÖZGEÇMİŞ

25/04/1983 tarihinde Bulgaristan-Kırcaali’de doğdu. Sırasıyla; Kadri yörükoğlu ilk öğretim okulu ve Bayrampaşa Anadolu lisesinden mezun olduktan sonra, 2002 yılında Ege üniversitesi Biyoloji bölümüne kayıt oldu. 2007 yılında Ege üniversitesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Ege üniversitesi Biyoloji bölümünde yüksek lisans eğitimine özel öğrenci statüsünde başladı ve halen ege üniversitesi biyoloji bölümünde yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.