

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MİLL. (İNGİLİZ LAVANTASI)' İN
MİKROÇOĞALTIMI VE *İN VİTRO* KOŞULLARDA ÜRETİLEN FİDELERİN
FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÜBRA SİVRİKAYA

ŞUBAT 2013
TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL. (İNGİLİZ LAVANTASI)' NİN
MİKROÇOĞALTIMI VE *IN VITRO* KOŞULLARDA ÜRETİLEN FİDELERİN
FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ**

Biyolog Kübra SİVRİKAYA

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

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04.01.2013

Tezin Savunma Tarihi : 15.02.2013

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN

Trabzon 2013

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalında

Kübra SİVRİKAYA Tarafından Hazırlanan

***LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL. (İNGİLİZ LAVANTASI)' NİN
MİKROÇOĞALTIMI VE *IN VITRO* KOŞULLARDA ÜRETİLEN FİDELERİN
FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ**

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

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ali Ömer ÜÇLER

Üye : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN

Üye : Prof. Dr. Kenan YAZICI

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Lavandula angustifolia* (İngiliz Lavantası)’nın mikroçoğaltımı ve *in vitro* koşullarda üretilen fidelerin fenolik bileşiklerin analizi” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmanın planlanması ve değerlendirilmesinde her türlü yardımını gördüğüm, sayın hocam Prof. Dr. Atalay SÖKMEN’ e çok teşekkür ederim.

Uygulamanın gerçekleştirilebilmesi için laboratuvar ve malzeme desteği sağlayan KİMYA bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Münevver SÖKMEN’ e ve fenolik bileşiklerin analizi için verilerin değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Murat KÜÇÜK’ e teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisansa başladığım ilk günden bu yana her zaman sabırla bana yardımcı olan, laboratuvar arkadaşlarım Ersan BEKTAŞ’ a, Halil İbrahim ÖZTÜRK’ e ve Mustafa CÜCE’ ye ayrıca fenolik bileşik analizi yapılmasında özverili yardımlarından dolayı Kimya Bölümü Doktora öğrencisi Gönül HATİPOĞLU’ na çok teşekkür ederim.

Hayatımın her anında maddi manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme, iyi dilekleriyle hep yanımda olan başta Mehmet TOPÇU’ ya, Ebru SİVRİKAYA EROL’ a, Songül TANRIVER ‘e, Merve GÜNAL’ a, Ebru KALAYCIĞOLU’ na ve tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Kübra SİVRİKAYA

Trabzon 2013

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL. (İNGİLİZ LAVANTASI) ‘NİN MİKROÇOĞALTIMI VE *İN VİTRO* KOŞULLARDA ÜRETİLEN FİDELERİN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Atalay SÖKMEN’in sorumluluğunda tamamladığımı, deneyleri ve analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 04/01/2013

.....
Kübra SİVRİKAYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IIX
TABLolar DİZİNİ	XI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Bitki Doku Kültürü ve Mikroçaltım.....	3
1.3. Bitki Sekonder Metobolitleri.....	7
1.4. <i>Lavandula angustifolia</i> Hakkında Genel Bilgiler	10
1.5. Kullanım Alanları.....	11
1.6. Sanayideki Kullanım Alanları.....	13
1.7. Lavantanın Mikroçoğaltımı ile İlgili Literatür Özetleri	13
1.8. Tezin Amacı.....	15
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	16
2.1. Materyal	16
2.2. Metod	16
2.2.1. Kültür Ortamının Hazırlanması.....	16
2.2.2. Kültür Ortamına İlave Edilen Bitki Büyüme Düzenleyicileri	17
2.2.2.1. Oksinler.....	17
2.2.2.2. Sitokininler.....	18
2.2.3. Tohumların Canlılık Testi.....	18
2.2.4. Kültür Ortamının Hazırlanması.....	19
2.2.5. Bitki Tohumlarının Sterilizasyonu	19
2.2.5.1. Sodyum Hipoklorit Çözeltisi Kullanılarak Yapılan Sterilizasyon	19
2.2.5.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Kullanılarak Yapılan Sterilizasyon.....	20
2.2.6. <i>İn vitro</i> ' da Tohumların Çimlendirilmesi	20
2.2.6.1. NAA Kullanılmadan Yapılan Çimlendirme	20
2.2.6.2. NAA Kullanarak Yapılan Çimlendirme	20

2.2.7.	Çimlenen Tohumlardan Alınan Sürgün Ucu Eksplantları ile <i>In Vitro</i> ' da Sürgün Oluşturma.....	21
2.2.8.	Özütlerin Elde Edilmesi	22
2.2.8.1.	HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analizi	23
2.2.8.1.	Kuru Bitki Örneklerinden Elde Edilen Uçucu Yağ Özütleri	23
3.	BULGULAR.....	24
3.1.	Tohumların Canlılık Testi.....	24
3.2.	Sterilizasyon Yöntemi Seçimi.....	24
3.3.	Doku Kültürü ile İlgili Sonuçlar	25
3.4.	Fenolik Bileşik Analizi	34
3.4.1.	HPLC ile Fenolik Bileşik Analizi	34
3.4.2.	Kuru Bitki Örneklerinden Elde Edilen Uçucu Yağ Verimleri.....	55
4.	TARTIŞMA	57
5.	SONUÇ	65
6.	ÖNERİLER.....	67
7.	KAYNAKLAR	68
	ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

LAVANDUALA ANGUSTIFOLIA MİİL. (İNGİLİZ LAVANTASI)' İN MİKROÇOĞALTIMI VE *İN VİTRO* KOŞULLARDA ÜRETİLEN FİDELERİN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN ANALİZİ

Kübra SİVRİKAYA

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Atalay SÖKMEN
2013, 75 Sayfa

Tıbbi ve aromatik özelliklere sahip olan *Lavandula angustifolia* Mill. ' e ait sürgün ucu eksplantlarının farklı besin ortamlarında büyüme özellikleri incelendi, fidelerin uçucu yağ verimleri belirlendi; ve son olarak fenolik bileşikleri analiz edildi. Çimlendirme, sürgün oluşumu ve gelişimi için en uygun besin ortamları ayrı ayrı araştırıldı. Bu bitkinin mikroçoğaltım potansiyelini gözlemlemek için Murashige ve Skoog (MS; 1962) temel besi ortamına farklı derişimlerde Benzilaminopürin (BAP), 6-Furfurilaminopürin (kinetin) gibi bitki büyüme düzenleyicileri ilave edildi. En iyi çimlenme (%65), 0,5 mg/L Naftalen Asetik Asit (NAA) içeren MS besi ortamında gerçekleştirildi. Çimlendirilmiş fidelerden elde edilen sürgün ucu eksplantları 16 farklı MS ortamına aktarıldı ve büyüme parametreleri incelendi. En iyi çoklu sürgün gelişimi 1 mg/L BAP + 0,05 mg/L NAA içeren MS besi ortamlarında gözlemlendi. Kültüre alınan eksplantlarda en uzun boylu fideler 1,5 mg/L Kinetin + 0,05 NAA mg/L içeren MS besi ortamında elde edildi. Sürgün ucu eksplantları 2 mg/L BAP + 0,05 mg/L NAA ve 2 mg/L TDZ + 0,05 mg/L içeren MS besi ortamlarında yüksek oranda kallus oluşturdu. Sürgün kültür hatlarından elde edilen özütlerden 4 fenolik bileşik (ferulik asit, gallik asit, klorojenik asit ve rozmarinik asit) HPLC ile kalitatif ve kantitatif olarak analizi edildi. En yüksek uçucu yağ verimi %3,37 oranla 1 mg/L kinetin + 0,05 NAA içeren MS ortamlarından elde edildi.

Anahtar Kelimeler: *Lavandula angustifolia*, *In vitro* bitki doku kültürleri, Fenolikler

Master Thesis

SUMMARY

MICROPROPAGATION OF *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL.(ENGLISH LAVENDER) AND THE ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS OF THE PLANTLETS WHICH ARE PRODUCED *IN VITRO* CONDITIONS

Kübra SİVRİKAYA

Karadeniz Technical University
The Graduate School and Applied Sciences
Department of Biology
Supervisor: Prof. Dr. Atalay SÖKMEN
2013, 75 Pages

Growth characteristics of the shoot-tip explants obtained from *Lavandula angustifolia*, an aromatic and medicinal plant, on various media were examined, the essential oil yields of the seedlings grown *in vitro* were determined and finally their phenolic constituents were analyzed. The most suitable media for germination, shoot formation and development were individually investigated. In order to observe the micropropagation potential of the plant studied, Murashige ve Skoog(MS; 1962) basal medium was supplemented with various concentrations of plant growth regulators; e.g. benzylaminopurine (BAP), 6-furfurylaminopürine (kinetin). The best germination (65 %) was achieved on MS medium supplemented with naphtalene acetic acid (NAA, 0,5 mg/L). The shoot tip explants obtained from the newly germinated seedlings were then transferred to sixteen different MS media where their growth parameters were individually examined. The best multiple shoot development was observed on MS basal media supplemented with BAP (1 mg/L) plus 0,05 mg/L NAA (0.05 mg/L). Amongst the all cultured explants, the tallest seedlings were obtained from the media containing Kinetin (1.5 mg/L) + NAA (0,05 mg/L). Shoot node explants formed callus at higher frequencies when they were cultured on a MS basal medium supplemented with 1 BAP (2 mg/L) + NAA (0,05 mg/ L). The extracts obtained from the shoot culture lines were analyzed qualitatively and quantitatively in terms of their four different phenolic constituents, namely ferulic acid, gallic acid, chlorogenic acid and rosmarinic acid by using HPLC. The highest essential oil yield (3.37 %, v/w) was obtained from the seedlings cultured on MS medium with kinetin 1 mg/L plus NAA (0.05 mg/L).

Key Words: *Lavandula angustifolia*, *in vitro*, micropropagation, phenolics

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1. <i>Lavandula angustifolia</i> ' nın taksonomik hiyerarşisi.....	10
Şekil 2. <i>Lavandula angustifolia</i> taksonunun Türkiye üzerindeki dağılışı.....	10
Şekil 3.a) Lavanta Bahçesi b) <i>Lavandula angustifolia</i> bitkisi	11
Şekil 4. <i>Lavandula angustifolia</i> yağı.....	12
Şekil 5. Linalil ve Linalol asetatın yapısı	13
Şekil 6. a) Çalışmada kullanılan <i>Lavandula angustifolia</i> tohumları b) <i>Lavandula angustifolia</i> tohumlarından elde edilen fideler.....	16
Şekil 7. Tetrazolyum bileşiğinin dehidrojenaz enzimiyle girdiği kimyasal tepkime	18
Şekil 8. <i>Lavandula angustifolia</i> ' nın <i>in vitro</i> da çimlene yüzdeleri	26
Şekil 9. MS-1 ve MS-2 ortamında yapılan çimlendirme sonucundaki fidelerin gelişimi.	27
Şekil 10. KS-1 ortamında oluşan tek sürgün üzerindeki nodlar KS-2 ortamında oluşan tek ya da ikili sürgünler, KS-3 ortamında gelişme olmadı, KS-4 ortamında oluşan tek sürgünler üzerindeki seyrek nodlar	28
Şekil 11. KS-5 ortamında oluşan tek ya da iki sürgün üzerindeki sık nodlar, KS-6 ortamında oluşan çoklu sürgünler KS-7 ortamında oluşan çoklu sürgünler, KS-8 ortamında oluşan tek ya da iki sürgün üzerindeki sık nodlar	28
Şekil 12. KS-9 ortamında oluşan uzun tekli sürgünler, KS-10 ortamında oluşan çoklu sürgün ve kallus oluşumu, KS-11 ortamında oluşan çoklu sürgün ve kallus oluşumu, ve KS-12 ortamında oluşan tek ya da ikili sürgünler.....	29
Şekil 13. KS-13 ortamında oluşan tek ya da ikili sürgün üzerinde seyrek nodlar, KS-14 ortamında oluşan çoklu sürgünler ve kallus oluşumu, KS-15 ortamında oluşan çoklu sürgün ve yüksek miktarda kallus oluşumu ve KS-16 ortamında oluşan kısa tek ya da ikili sürgünler	29
Şekil 14. On altı hata ait sürgün ucu eksplantlarında görülen gelişme	31
Şekil 15. <i>In vitro</i> da gelişen KS-9 hatına ait <i>Lavandula angustifolia</i> için en uzun sürgün boyu	32
Şekil 16. KS-5 nolu ortamda oluşan tek sürgün üzerindeki sık nodlar, KS-6 ortamda oluşan çoklu sürgünler, KS-7 ortamda oluşan çoklu sürgünler, KS-8 ortamında oluşan çoklu sürgünler	32
Şekil 17. KS-15/16 sürgün ortamlarında oluşan kalluslar.....	33
Şekil 18. Seride çalışılan 16 fenolik standartın kromatogramı (280 nm).....	35
Şekil 19. KS-2 hatının 280 nm' deki kromatogramı	36
Şekil 20. KS-4 hatının 280 nm' deki kromatogramı	37
Şekil 21. KS-5 hatının 280 nm' deki kromatogramı	38

Şekil 22. KS-6 hatının 280 nm' deki kromatogramı	39
Şekil 23. KS-7 hatının 280 nm' deki kromatogramı	40
Şekil 24. KS-8 hatının 280 nm' deki kromatogramı	41
Şekil 25. KS-9 hatının 280 nm' deki kromatogramı	42
Şekil 26. KS-10 hatının 280 nm' deki kromatogramı	43
Şekil 27. KS-11 hatının 280 nm' deki kromatogramı	44
Şekil 28. KS-12 hatının 280 nm' deki kromatogramı	45
Şekil 29. KS-13 hatının 280 nm' deki kromatogramı	46
Şekil 30. KS-14 hatının 280 nm' deki kromatogramı	47
Şekil 31. KS-15 hatının 280 nm' deki kromatogramı	47
Şekil 32. KS-16 hatının 280 nm' deki kromatogramı	48
Şekil 33. Farklı miktarda kinetin uygulanan KS5-KS9-KS13 hatlarının karşılaştırılmış kromatogramları	49
Şekil 34. Farklı miktarda 6-BA uygulanan KS2-KS6-KS10-KS14 hatlarının karşılaştırılmış kromatogramları.....	50
Şekil 35. Farklı miktarda TDZ uygulanan KS7-KS11-KS15 hatlarının karşılaştırılmış kromatogramları	50
Şekil 36. Farklı miktarda zeatin uygulanan KS4-KS8-KS12-KS16 hatlarının karşılaştırılmış kromatogramları.....	51
Şekil 37. 1,5 mg dört farklı hormonun uygulandığı KS9-KS10-KS11- KS12 hatlarının karşılaştırılmış kromatogramları.....	52
Şekil 38. En yüksek dört farklı hormonun uygulandığı KS09-KS10-KS11-KS12 hatlarının karşılaştırılmış kromatogramları	53
Şekil 39. En yüksek fenolik verimin elde edildiği KS9 numunesi ve 100 µM'lık standart karışımın karşılaştırılmış kromatogramları	54
Şekil 40. HPLC ile tespit edilen fenolik bileşiklerin pik yükseklikleri.....	55
Şekil 41. <i>In vitro</i> da oluşan fidelerin uçucu yağ verimleri	55
Şekil 42. Kallus oluşan eksplantlarda ki mavi pigment oluşumuna sebep olan bileşik kafeik asit izomeri 2-(3,4-dihidroksifenil) etenil ester	61

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1. MS besi ortamının içerdđi maddeler ve miktarları	17
Tablo 2. Tohumların çimlendirilmesinde kullanılan MS-1 ve MS-2 besi ortamlarının içerikleri	21
Tablo 3. Sürgün gelişimi için kullanılan besin ortamlarının kompozisyonları	22
Tablo 4. <i>Lavandula angustifolia</i> bitkisinin TTC bileşđiyle yapılan TZ testi.....	24
Tablo 5. <i>Lavandula angustifolia</i> bitkisinin tohumlarının sterilizasyon yöntemi seçimi sonuçları.....	25
Tablo 6. Kültüre alınan tohumlarda çimlenme durumları.....	26
Tablo 7. Sürgün ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda görülen gelişmeler	30
Tablo 8. HPLC analizleri için hazırlanan özütlerin verimleri	34
Tablo 9. KS-2 hatında tespit edilen fenolik bileşikler.....	36
Tablo 10. KS-4 hatında tespit edilen fenolik bileşikler.....	37
Tablo 11. KS-5 hatında tespit edilen fenolik bileşikler.....	38
Tablo 12. KS-6 hatında tespit edilen fenolik bileşikler.....	39
Tablo 13. KS-7 hatında tespit edilen fenolik bileşikler.....	40
Tablo 14. KS-8 hatında tespit edilen fenolik bileşikler.....	41
Tablo 15. KS-9 hatında tespit edilen fenolik bileşikler.....	42
Tablo 16. KS-10 hatında tespit edilen fenolik bileşikler.....	43
Tablo 17. KS-11 hatında tespit edilen fenolik bileşikler.....	44
Tablo 18. KS-12 hatında tespit edilen fenolik bileşikler.....	45
Tablo 19. KS-13 hatında tespit edilen fenolik bileşikler.....	46
Tablo 20. KS-14 hatında tespit edilen fenolik bileşikler.....	47
Tablo 21. KS-15 hatında tespit edilen fenolik bileşikler.....	48
Tablo 22. KS-16 hatında tespit edilen fenolik bileşikler.....	48
Tablo 23. KS9-KS10-KS11-KS12 hatlarının ortak olan A-H bileşenlerinin örneklere göre sıralanması	52
Tablo 24. KS-9-KS10-KS11-KS8 hatlarının ortak olan A-H bileşenlerinin örneklere göre sıralanması	53
Tablo 25. Uçucu yağ verimleri.....	56

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2, 4-D	: 2,4 Diklorofenoksiasetik asit
BAP	:6-benzil amino pürin
BBD	:Bitki büyüme düzenleyicisi
DAD	:DiodeArrayDetector
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
EtOH	: Etanol
HCl	: Hidrojen klorür
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HPLC	:Yüksek performans sıvı kromatografisi
g	: Gram
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
<i>In vitro</i>	: Hücre dışı (Laboratuar ortamında)
IAA	: İndol-3-Asetik Asit
IBA	: İndol-3-bütirik asit
Kinetin	: 6-Furfurilaminopürin
L	: Litre
Mg	: Miligram
MS	: Murashige ve Skoog besi ortamı
NAA	: Naftalenasetik asit
NaOH	: Sodyum hidroksit
TTC	: 3,5-Trifenil TetrazolyumKlorit
TZ	: Tetrazolyum Testi
TDZ	: Thidiazuron
°C	: Santigrat derece

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

İnsanoğlu varoluşundan itibaren bitkilerle sıkı bir etkileşim içerisinde olmuştur. Faydalı gördükleri bitkileri tanımış, tanıtmış ve hastalıkların tedavisinde kullanmıştır. Sahip oldukları karmaşık kimyasal yapılarından dolayı geleneksel tedavinin de temelini oluşturmuşlardır. Tarihsel süreç içerisinde özellikle de arkeolojik bulgular göz önüne alındığında, ilkçağlardan beri insanlar çevrelerindeki bitkileri kullanarak dertlerine şifa aramışlardır. Bu bilgiler çağlar boyunca kullanım şekillerindeki bazı değişiklik ve gelişmelerle birlikte nesilden nesle aktarılarak günümüze kadar ulaşmıştır (Altan ve ark.,1999; Baytop, 1999; Lev ve Amar, 2000; Tütenocak, 2002; Heinrich ve ark., 2004; Koçyiğit, 2005; Deniz ve ark., 2010).

Günümüzde bitkiler, ilaçların ham maddesi olma yönünde çok önemli bir konumdadırlar. Bitkilerle tedavi yöntemleri pek çok araştırmaya konu olmakta ve özellikle gelişmiş ülkelerde alternatif tıp adıyla şifalı bitkilerin önemi gün geçtikçe daha da artmaktadır. İnsanların sentetik ilaçlardan olan beklentisinin azalması, bitkisel kaynaklı ilaçlara olan eğilimi arttırmaktadır. Devletlerin bu alana ayırdığı ödenek her geçen gün daha da artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre dünya nüfusunun % 80'i bitkisel ilaçlarla tedavi olmaktadır. Bu amaçla 20 bin bitki ve 4 bin bitkisel drog'un kullanıldığı ve 400 tanesinin ise aktif olarak ticaretinin yapıldığı belirtilmektedir. Türkiye kodeksinde kayıtlı 140 tıbbi bitki vardır. Fakat Türkiye'de 500 kadar bitkinin tedavi amaçlı kullanıldığı bildirilmektedir (Baser, 2001; Özgüven ve ark. 2005).

Türkiye, mevcut bitkisel çeşitliliği yönünden oldukça dikkate değer ve zengin bir floraya sahiptir. Bu zenginlik; Üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bölgede bulunması, Güney Avrupa ile Güney Batı Asya arasında köprü olması, pek çok cins ve seksiyonun orijin ve farklılaşma merkezinin Anadolu oluşu, ekolojik ve fitocoğrafik farklılaşmanın sonucu olarak tür endemizmi'nin yüksek olmasına neden olmuştur (Tan 1992, Dığrak ve ark. 2002).

Son yıllarda bitkisel kökenli ilaçların tedavi amacıyla rağbet görmesi, kokulu bitkilerin parfümeri, gıda ve kozmetik sanayinin esas hammaddesini oluşturması, yeni kullanım alanlarının ortaya çıkması tıbbi ve aromatik bitkilere olan talebi arttırmıştır. Bu

bitkiler son zamanlarda gıda sektörü başta olmak üzere boya sektörü, süs bitkisi, insektisit vb. endüstri kollarında kullanılmaktadır ve kullanımları da giderek artmaktadır. İşte birçok tüketim alanı bulunan tıbbi ve aromatik bitkiler zaman içinde artarak çok önemli bir hale gelmiş, hiçbir zaman önemlerini yitirmemişlerdir. Son zamanlarda doğaya dönüş olarak adlandırılan doğal beslenme ve doğal tedavi yöntemleri de ülkemizde ve diğer dünya ülkelerinde bu bitkilere olan ilgiyi artırmıştır (Kan ve Ark 2006).

Tıbbi ve aromatik bitkiler grubunda yer alan *Lamiaceae* ya da diğer adıyla *Labiatae* (Ballıbabagiler) familyasına ait bitkiler hemen hemen bütün habitatlarda ve yüksekliklerde yetişmekte, Kutuplar' dan Himalaya' lara, Güney Doğu Asya'dan, Hawaii ve Avustralya'ya, hatta Afrika ve Amerika'ya kadar geniş bir alanda yayılış göstermektedir (Heywood, 1996). Türkiye, *Lamiaceae* familyası için önemli gen merkezlerinden birini oluşturmaktadır. Ülkemizde bu familya 45 cins, 565 tür ve toplam 735 takson ile temsil edilmektedir (Güner ve ark., 2000). *Lamiaceae* familyası üyelerinin çoğu uçucu yağlar, aromatik yağlar ve benzeri sekonder metabolitler bakımından zengin olması sebebiyle tıp, eczacılık, gıda, kozmetik ve parfümeri gibi alanlarda oldukça büyük öneme sahiptir. Diğer taraftan bu familya üyelerinin ülkemizdeki etnobotanik kullanımı da oldukça yaygındır. Ülkemizde kullanılışı olan, yerli ve kayıtlı aromatik bitki sayısınının 120 kadar olduğu ve bunların % 40'ınının *Labiatae* familyası içinde yer aldığı belirtilmektedir (Baytop, 1984).

Lamiaceae familyası lavanta türleri ile ekonomik yönden büyük öneme sahiptir. Lavanta (*Lavandula sp.*), *Lamiaceae* familyasından çok değerli bir uçucu yağ bitkisidir (Guenther, 1952). Çoğu Akdeniz orjinli olan 39 kadar lavanta türü (*Lavandula sp.*) bulunmaktadır. Dünyada ticari değeri yüksek olan üç önemli lavanta türü vardır. Bunlar, Lavander (*Lavandula angustifolia* Mill. = *L. officinalis* L. = *L. vera* DC), Lavandin (*Lavandula intermedia* Emeric ex Loisel. = *L. hybrida* L.) ve Spike lavander (*Lavandula spica* = *L. latifolia* Medik.)' dir. İngiliz lavantası olarak adlandırılan lavander çeşitlerinin uçucu yağ kalitesi, melez lavanta olarak adlandırılan lavandin çeşitlerinden daha yüksektir (Beetham ve Entwistle, 1982).

Lavanta bitkisinde diğer aromatik bitkilerde olduğu gibi üretimi ve çoğaltılması generatif ve vejetatif olarak başlıca iki yolla gerçekleştirilir. Bazı lavanta türleri sadece generatif olarak tohumlarıyla, bazı türleri ise vejetatif olarak sürgün çelikleriyle bazı lavanta tür ve çeşitleri ise her iki yolla daha kolay ve hızlı bir şekilde çoğaltılabilmektedir. Son yıllarda doku kültürleri ile özellikle tıbbi ve aromatik bitkilerin mikroçoğaltım teknikleri konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Özellikle tohum ile çoğaltma

problemi olan türlerde doku kültürleri ile mikroçoğaltımı araştırmaları büyük değer kazanmıştır. Mikroçoğaltımın, hastalık ve zararlılardan arındırılmış tek örnek (homojen) bitkisel materyal elde edilmesi, klasik yöntemlerle zor üretilen türlerin daha kolay üretimi, seçilen üstün genotiplerin hızlı üretimi, geniş alanlara ve iş gücüne ihtiyaç duyulmaksızın ve mevsime bağlı kalmaksızın her dönemde üretime imkan tanınması gibi pek çok avantajları vardır (Bajaj vd., 1988).

1.2. Bitki Doku Kültürü ve Mikroçaltım

Bitki doku kültürü; steril şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspanسیون veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Eksplant bitkinin çeşitli kısımlarından alınabilen kültür başlatmada kullanılabilcek bitki parçalarıdır. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik çeşitlilik oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetiksel iyileştirme araştırmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretilmesinde, çeşitli doku kültürü yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Babaoğlu ark., 2001).

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

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

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

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

Doku kültüründe en yaygın ve etkili olarak kullanılan yöntem meristem kültürüdür. Meristem kültürü, bitkilerin büyüme konileri bulunan koltuk altı ya da tepe sürgünlerinin eksplant olarak kullanılarak yapıldığı çoğaltım tekniğidir (Turhan, 1997).

Kallus kültürü, yaralanma sonucu oluşturulan, düzensiz kütlelerin üretimi ve devamı işlemidir. Organ oluşumunun gerçekleşmediği, farklılaşmanın olmadığı, yara dokularına kallus denilmektedir.

Mikroçoğaltım; kısaca doku kültürü teknikleri kullanılarak bitki üretmek anlamına gelirken; mikroçoğaltım bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen tanesi vb.) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanmaktadır (Mansuroglu ve Gürel, 2001). Bitkilerin uygun besin maddeleri ihtiyaçları, hormon ve kültür istekleri yeterince biliniyorsa, mikroçoğaltım tekniği kullanılarak tüm bitki türlerinin üretilmesi mümkündür (Hartman ve Kester, 1975).

Mikroçoğaltım bitki yetiştiriciliği ve genetiği yönünden önemli avantajlar sağlamaktadır. Hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitki üretimi, kitlesel üretimde homojenlik, daha kısa kültür süresi, diğer yöntemlerle zor üretilen türlerin daha kolay üretimi, üstün genotiplerin hızlı üretimi, üretimde daha verimli donör kullanılması ve somoklonal varyasyonlardan dolayı yeni çeşitlerin elde edilmesi bu yöntemin esas avantajlarıdır (Mansuroglu ve Gürel, 2001).

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

Hazırlık aşaması, esas olarak bulaşma problemlerinin en aza indirilmesi amacıyla verici (donör) bitkinin hijyenik koşullarda yetiştirilmesini kapsamaktadır. Bulaşmayı önlemek için doku kültürünün ilk aşaması sayılan sterilizasyon üzerinde önemle durmak gerekmektedir (Hu ve Wang, 1983).

Kültür başlangıç aşaması, eksplant seçimi ve sterilizasyonu, kültür ortamlarının seçimi ve kültürün yürütüleceği çevresel koşulların belirlendiği aşamadır. Mikroçoğaltımda çoğunlukla eksplant olarak tepe (apikal) ve koltuk altı (aksiller) tomurcukları seçilmekle birlikte, farklı organlar da eksplant olarak kullanılmaktadır (Huang ve Chu, 1987).

Mikroçoğaltımda kullanılan eksplantlar aseptik koşullara konulmadan önce tam anlamıyla sterilize edilmelidir. Sterilizasyon yöntemleri verici (donör) bitkinin yetiştiği ortamın özelliklerine ve eksplantın alındığı organa göre farklılık göstermektedir. Kullanılacak dezenfektan maddenin cinsi, konsantrasyonu ve uygulama süresi sterilizasyonun başarısını etkilemekte ve bitki türüne göre değişmektedir. Ayrıca bitki dokularının zarar görmemesine dikkat edilmelidir (Babaoglu vd., 2001).

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

Babaoğlu ark., (2001) günümüzde en çok kullanılan yapay besi ortamının, 1962 yılında Murashige ve Skoog tarafından geliştirilen Murashige Skoog (MS) ortamı olduğunu belirtmişlerdir. 1962 yılında yine Murashige ve Skoog tarafından tütün bitkisi için geliştirilen yüksek tuz içerikli MS ortamının ise özellikle düşük yoğunluklarda birçok bitki türünde köklendirme çalışmalarında kullanıldığını rapor etmişlerdir (Murashige & Skoog).

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

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

çoğaltım aşamasında kullanılan oranları 0,1-1,0 mg/L'dır. Kallus oluşumunu artırma eğiliminde olan 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D)'in kullanımından ise kaçınılmaktadır (Werbrouck ve Debergh, 1994).

Aksiller dalları kullanılarak yapılan mikroçoğaltımda ana bitkiden alınan tek boğumlu gövde veya dal segmentleri sterilizasyona tabi tutulduktan sonra besin ortamında kültüre alınır. Ortamdaki büyüme düzenleyicilerinin etkisiyle, aksiler tomurcuklar bir veya birden fazla sürgün meydana getirir. Daha sonra tekli sürgünler ayrılarak taze sürgün çoğaltım ortamına aktarılır ve burada 3-4 hafta içerisinde birçok yeni sürgün elde edilir. Yeterli sayıda sürgün elde edildikten sonra bunların bir kısmı ile çoğaltım işlemi devam ettirilirken diğer bir kısmı köklendirme ortamına aktarılır. Yeterli kök sistemi geliştikten sonra, bitkiler iyi drene olmuş saksı toprağına aktarılır ve ilk 10-15 gün boyunca yüksek nem altında tutulur (Bhojwani ve Razdan, 1983).

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

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

1.3. Bitki Sekonder Metabolitleri

Bitkilerin iyileştirici etkisi doğal yapılarında yer alan ve sekonder metabolit olarak adlandırılan kimyasalların ve bu kimyasalların farklı kombinasyonlarından kaynaklanır. Sekonder metabolitler, besin ve enerji sağlama gibi yaşamsal değerler taşımalarının yanı sıra yüksek bitkiler, başta ilaç sanayi olmak üzere kimya, besin, kozmetik ve zirai mücadele alanlarında yararlanılan doğal ürünleri üretirler. Yaşamsal olarak önem taşımamakla birlikte üretildiği bitkilere bir takım uyumsal değerler ya da avantajlar sağlayan bu bileşiklere “sekonder metabolitler” adı verilir (Sökmen ve Gürel, 2001). Sayı ve yapı itibarıyla çok fazla değişkenlik gösteren bu ürünler esasen üç ana başlıkta toplanabilir. Bunlar; terpenler, azotlu bileşikler ve fenolik bileşiklerdir. Bitkiler bu bağlamda tam anlamıyla canlı “organik kimya fabrikalarıdır”. Bilhassa bitkilerin ürettikleri bu çok amaçlı bileşikler insanoğlunun ilgisini çekmiş, sonuçta *fitokimya* disiplini doğmuştur.

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

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

kullanılmıştır (Başer, 2001). Avrupada distilasyon yöntemlerinin geliştirilmesi ise Paracelcius'un uçucu yağ tanımıyla başlar (Guenther, 1948).

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

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

Fenolik bileşikler fenilalanin aminoasitinden türetilen sekonder metabolitlerin büyük bir grubunu oluşturur (Mann, 1987; Harborne, 1994). Fenolik bileşikler meyvelere ve yapraklara renk katma, böcek çekici veya itici olma, antimikrobiyal aktivite, antiviral aktivite, radyasyondan koruma ve otçul hayvanlardan korunma görevi yaparlar (Harborne, 1967; Harborne ve Williams, 2000). İnsan tüketimi için bir bitkinin potansiyeli değerlendirilirken bu tür bileşiklerin potansiyel antioksidan aktiviteleri ve fenolik bileşimlerine bakılır. Bir bitkinin fenolik bileşimi genellikle bitki türlerine özgüdür ve büyüme koşullarına göre değişebilir (Manach vd., 2004).

Fenolik bileşiklerin pek çoğu bitkilerde vakuoller de yer alır ve genellikle alkoller veya diğer organik çözücülerle özüt edilir. Genellikle bir özütleme sisteminde fenolik bileşiklerin depolama sırasında enzimatik bozunma ve polimerazasyona uğrayacağı

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

Fenolik bileşiklerin ayrılması, saflaştırılması ve belirlenmesi için çeşitli kromatografi teknikleri kullanılmaktadır. (Merken ve Beecher, 2000; Robbins, 2003; Shahidi ve Naczki, 2004).

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

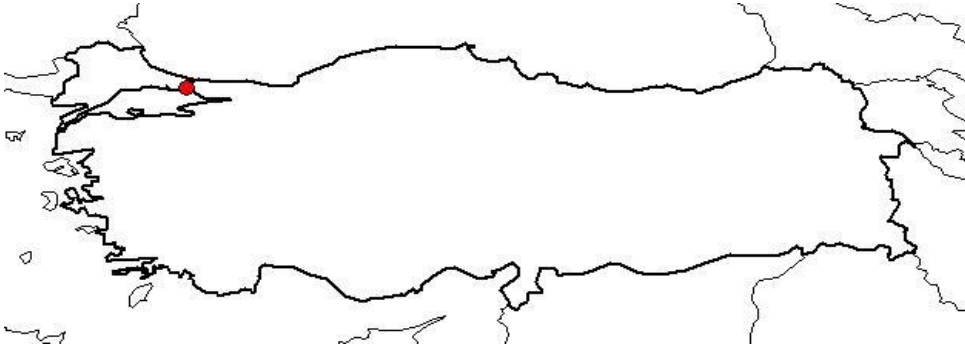
Fenolik bileşikler UV ışınlarını absorblar ve 190-380 nm aralığında tipik absorpsiyon spektrumlarına sahip oldukları için bir UV detektöründe veya fotodioddedektörlerle (Diode Array Detector -DAD) kolayca analiz edilebilir.

1.4. *Lavandula angustifolia* Hakkında Genel Bilgiler

Hakiki lavanta, tıbbi lavanta gibi isimlerle de anılan *Lavandula angustifolia* Mill., İspanya'dan Yunanistan'a Kuzey Akdeniz'in dağlık bölgelerinin orta yükseltilerinde (600-1500 m) doğal olarak yayılış gösteren ve tarımı yapılan, 20-60 cm boylanabilen, yarı çalimsı, lila veya grimsi mavi renkli çiçekli, çok yıllık bir bitkidir (Ceylan, 1996; Zeybek ve Zeybek, 1994; Baytop, 1999; Anonim, 2004). Doğal yayılış gösterdiği bölgeler dışında, lavanta tarımı Bulgaristan, İngiltere, Almanya, ABD ve Kuzey Afrika'da yapılmaktadır (Ceylan, 1996). Ülkemiz florasında ise cinsinin farklı türleri bulunmasına rağmen, bu tür doğal yayılış göstermemektedir (Davis, 1982; Baytop,1999). Bununla birlikte bu türe park ve bahçelerde süs bitkisi olarak rastlanmaktadır (Zeybek ve Zeybek, 1994).

- └ Alem: *Plantae*
- └ Altalem: *Tracheobionta*
- └ Bölüm: *Magnoliophyta*
- └ Sınıf: *Magnoliopsida*
- └ Altsınıf: *Asteridae*
- └ Takım: *Lamiales*
- └ Familya: *Lamiaceae*
- └ Cins: *Lavandula*
- └ Tür: *Lavandula angustifolia* Miller

Şekil 1. *Lavandula angustifolia* Miller 'in taksonomik hiyerarşisi (Türkiye Bitki Veri Servisi, TÜBİVES) (URL1)



Şekil 2. *Lavandula angustifolia* taksonunun Türkiye üzerindeki dağılışı (TÜBİVES) (URL1)



Şekil 3. a) Lavanta Bahçesi (URL2)



b) *Lavandula angustifolia* bitkisi (URL3)

Lavanta çelikleri çoğunlukla ilkbahar veya yaz başlarında tarlaya dikilir. Lavantada hasat zamanı, uçucu yağ verimi ve kalitesi üzerinde çok etkilidir (Weiss, 1997). Lavanta çiçekleri açmaya başlamadan hemen önce gonca halde toplanır ise daha çok uçucu yağ elde edilir. Tıbbi amaçla taze çiçekli dal uçları, parfümeri ve kozmetik sanayii için ise kısmen kurutulmuş çiçek ve yaprakları kullanılır.

Lavandula angustifolia 'nın uçucu yağının % 0-40' ı linalol, % 5-55' i de linalil asetatdır. Bunların dışında okaliptol, borneol, geraniol, limonen, sineol gibi maddeler bu yağların bileşenidir. Lavanta yağının kalitesini ve pazar değerini en başta uçucu yağ kompozisyonu belirler.

1.5. Kullanım Alanları

Lavanta çiçeği tedavide aynı familyada (Ballıbabagiller) yer alan diğer birçok hoş kokulu bitkiler gibi kullanılmaya elverişlidir. Lavanta çiçeği bir mide dostudur, idrar söktürücüdür, terlemeyi sağlar. Baş dönmelerine, baş ağrılarına iç bulantılarına iştahsızlık, mide ve bağırsak şişmelerine, sinirlere, kalp çarpıntılarına, titremelere, gribe, karaciğer ve safra kesesi rahatsızlıklarına, sarılığa, genel güçsüzlüğe, kan toplanmalarına ve genel görme zayıflıklarına iyi gelir. Lavanta çiçeği her biçimde, özellikle ovuşturma, losyon ve banyo şeklinde yara, bere ve kesiklere, şişkinliklere, burkulmalara, eziklere ve atletlerin "formdan düşme" lerine karşı kullanılır. Gut ve romatizma için olağanüstü bir bitkidir.

Lavanta çiçeğiyle hazırlanacak banyolar, çocukları sağlıklı büyütme için düzenli uygulanmalıdır. Bitki bunlardan başka egzama, sivilce gibi deri hastalıklarına, yanıklara, ülserlere, yüzeysel iltihaplı yaralara karşı etkisiyle övgüye değerdir (İlisulu 1992).



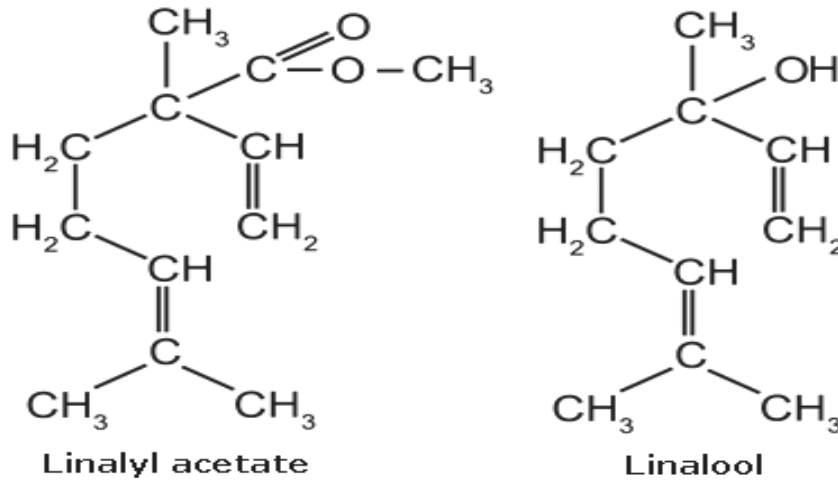
Şekil 4. Lavanta yağı (URL4)

Lavanta yağının özellikle merkezi sinir sistemini uyarıcı etkisi vardır; uyku verici, yatıştırıcı, sakinleştirici ve stres kovucudur, dermatolojik olarak cilt yanıklığı ve kızarıklığına çok faydalıdır (Cavanagh ve Wilkinson, 2002). Lavanta yağının antiseptik (mikrop öldürücü) ve antibiyotik (bakteri öldürücü) etkisi de çok güçlüdür (Lis-Balchin ve Hart, 1999) Bu nedenle aromaterapi uygulamalarında lavanta yağının özel bir önemi vardır. Lavanta yağı özellikle bergamot, neroli, ıtır ve gül esansları ile iyi bir karışım yapmaktadır (Zeybek, 1999). Lavanta tomurcuklarından yapılan herbal çaylar, insan sağlığı için son derece faydalıdır. Lavanta yağının en önemli iki uçucu yağ bileşeni olan linalil asetatın narkotik etkisi ve linaloolün ise yatıştırıcı etkisi çok kuvvetlidir. Bu nedenle lavanta tomurcuklarından yapılan uyku yastıkları, huzurlu ve kaliteli bir uyku için vazgeçilmezdir (Beetham ve Entwistle, 1982, Baydar, 2010a).

Lavanta bitkisinin çiçeklerinden elde edilenuçucu yağ, çok geniş bir kullanım alanı bulmakta ve parfüm, kozmetik, tat ve koku endüstrileri için önemtaşımaktadır (Ceylan ve vd., 1988; Ceylan ve vd.,1996).

1.6. Sanayideki Kullanım Alanları

İlaç sanayinde bazı preparatlara koku vermede, merkezi sinir sistemini düzenleyici ilaçların bileşiminde yer almaktadır. Aynı zamanda sanayide bünyelerindeki linalol ve linalil asetatın dolayı da parfümeri ve kozmetikte cilt temizleyici losyon, kokulu banyo sabunu ve köpüklerinin yapımında kullanılmaktadır (İlisulu 1992). Drog olarak sivilceler, astım, bronşit, saç dökülmesi bazı cilt hastalıkları, tenya ve bas dönmesine karşı kullanılan ilaçların bileşiminde yer almaktadır.



Şekil 5. Linalil ve linalol asetatın yapısı

1.7. Lavantanın Mikroçoğaltımı ile İlgili Literatür Özetleri

Çelikle çoğaltımda bazı lavanta türlerinin köklenme kabiliyeti düşüktür (Segura ve Calvo, 1991). Ayrıca çok sayıda fide elde etmek için uygun çelik elde edilmesinde zorluklarla karşılaşmakta ve çeliklerin alınacağı büyük bir anaç bahçesine ihtiyaç duyulmaktadır. Tohumla üretimde ise genellikle gelişme yavaş olmakta, tohum çimlenme sorunları oluşabilmekte ve yabancı tozlaşma nedeniyle hem morfolojik olarak hem de uçucu yağ kompozisyonu gibi karakteristik özellikler bakımından büyük varyasyonlar oluşmaktadır (Nogueira ve Romano, 2002; Zuzarte vd., 2010). Biyoteknoloji kavramı içerisinde ele alınan *in vitro* teknikler, bitkilerde çoğaltım ve ıslah başta olmak üzere birçok konuda klasik yöntemlerle çözümü güç ya da olanaksız olan sorunlara karşı bazen tek başına ve bazen de klasik yöntemler ile birlikte kullanılan tekniklerdir. Bu teknikler ile

bitki genotipleri kontrollü koşullarda yoğun ve çok hızlı bir şekilde klonal olarak çoğaltılabilmekte, virüslerden arındırılabilen, gen kaynakları dar alanlarda uzun süreli muhafaza edilebilmekte, somatik embriyolar, homozigot hatlar, sekonder metabolitler üretilen, somaklonal varyasyonlar ve mutasyonlar ile genetik varyasyonlar yaratılabilmekte, stres koşullarına karşı genotiplerin dirençleri test edilebilmekte, temel fizyolojik ve biyolojik olayların seyri kontrollü olarak izlenebilmektedir (Babaoğlu vd., 2001).

Farklı lavandula tür ve çeşitlerinin *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım olanakları araştırılmış (Andrade vd., 1999; Nogueira ve Romano, 2002; Echeverrigaray vd., 2005), bu araştırmalarda *in vivo* koşullarda vejetatif olarak çoğaltılamayan tür ve çeşitler için ancak *in vitro* mikroçoğaltımın ekonomik olabileceği belirtilmiştir. Literatüre göre tüm bitkilerde olduğu gibi lavantada anaç bitkilerin sınırlı veya yetersiz olduğu durumlarda ve bazı değerli lavanta çeşitlerinin zayıf köklenme yeteneğinden dolayı fidan ihtiyacını karşılamak üzere *in vitro* koşullarda mikroçoğaltıma ihtiyaç duyulduğundan bahsedilmektedir. Doku kültürü tekniklerinden faydalanarak *in vitro* mikroçoğaltım yoluyla sağlıklı çok sayıda lavanta fidanı üretimi yapılabildiğini bildirmiştir (Quzzi (1980).

Portilla vd. (1995) *L. angustifolia*'nın *in vitro* mikroçoğaltımı için koltuk altı tomurcukları kullanılmıştır. Bunun için NAA, BAP 'ın farklı kombinasyonlarının kullanıldığı Hindistan cevizi sütü içeren ve içermeyen MS besi ortamları denenmiştir. Kùltürler, 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık koşullarda 45 m E m²s⁻¹ ışık şiddetinde devam ettirilmiştir. 1.15 ya da 3.15 mg/L BAP içeren ortamlarda en iyi gelişme sağlanmıştır. Bununla birlikte, 3.15 mg/L BAP içeren ortamdaki sürgünler küçük yapraklar oluşmuştur.

Andrade vd. (1999) *L. angustifolia*'nın *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımı üzerine BBD 'nin etkisini araştırmak için yaptıkları araştırmada eksplant olarak boğum parçaları kullanmışlardır. En yüksek sürgün gelişiminin TDZ (2.25 µM) ve BA (2 µM) içeren MS besi ortamında olduğu tespit edilmiştir. Bütün ortamlarda köklenme olduğu, ancak köklenme oranının artan NAA konsantrasyonlarında arttığını gözlemlemişlerdir. *In vitro* koşullarda üretilen bitkicikleri başarıyla toprağa transfer etmişler ve çok sayıda uniform gelişme gösteren, somaklonal varyasyonların olmadığı bitkiler elde etmişlerdir.

Chishti vd. (2006) *L. angustifolia* türüne ait sürgün ucu eksplantlarının 2.0 mg/L BAP içeren besin ortamında çok sayıda sürgün verdiklerini tespit etmişler, 2.0 mg/L BAP içeren MS besi ortamında yüksek oranlarda köklenme sağlamışlardır. Aynı araştırmacılar köklü bitkicikleri kum: kil: vermukulit (1:1:1) karışımı olan plastik saksılar içerisine

aktarmışlar ve iki hafta boyunca 25 ± 2 °C'de ve % 60 nemde bekletmişlerdir. Tarla koşullarına aktardıkları bitkilerin % 70'inin canlı kaldığını gözlemişlerdir.

Areej (2007) *L. angustifolia* ve *L. latifolia*'da *in vitro* mikroçoğaltımı üzerine yaptığı araştırmada, *L. angustifolia*'nın boğum arası eksplantından 0.05 mg/L NAA ve 1.5 mg/L Kinetin MS besin ortamında en yüksek sürgün oluşumu gerçekleşmiş, en iyi köklenme oranı 0.4 mg/L NAA ve IBA uygulamasından, *L. latifolia*'nın en iyi sürgün oluşumu 0.5 mg/L BAP, 0.05, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/L Kinetin ve 0.05 mg/L NAA içeren ortamlarda gerçekleşmiş ve sürgünlerin en yüksek köklenmesi 0.3 mg/L NAA uygulamasında tespit etmiş ve elde edilen bitkilerin iki hafta sonra başarılı bir şekilde dış ortama aktarıldığını bildirmiştir.

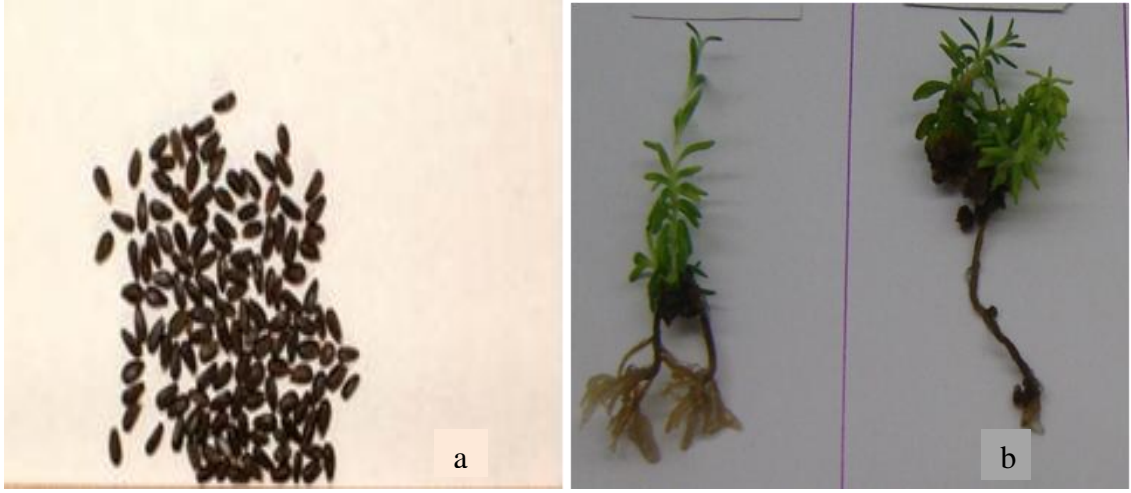
1.8. Tezin Amacı

Lavandula angustifolia bitkisine ait tohumların *in vitro* kültürlerinde çimlendirme, sürgün oluşumu ve gelişimi denemeleri yapıldı ve bu bitkilerin *in vitro* kültürleriyle yetiştirilen fidelerinin büyüme parametreleri kaydedildi ve özütlerinden bazı fenolik bileşikler elde edildi. Bu çalışmada da *Lavandula angustifolia* bitkisinin doku kültürlerinin yapılabileceği ve ekonomik değeri yüksek bazı fenolik bileşiklerinin tespiti ile uçucu yağ veriminin belirlenmesi amaçlandı.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

Bu çalışmada *Lavandula angustifolia* bitkisine ait ticari tohumlar materyal olarak kullanıldı. (Şekil 6.a).



Şekil 6. a) Çalışmada kullanılan *L. angustifolia* tohumları b) Çalışmada kullanılan *L. angustifolia* tohumlarından elde edilen fideler

2.2. Metod

Araştırmada, *L. angustifolia* bitkilerine ait tohumların yüzey sterilizasyonları farklı yöntemler kullanılarak yapıldı. Steril tohumlar farklı hormon derişimlerine sahip MS ortamlarında kültüre alındı. Besin ortamlarının hazırlanması, tohumların sterilizasyonu, çimlendirilmesi ve eksplantların kültüre alınması ile ilgili yöntemler aşağıda ayrıntılı birşekilde sunuldu.

2.2.1. Kültür Ortamının Hazırlanması

Çalışmalar boyunca tüm denemelerde Murashige ve Skoog (1962) ortamı kullanıldı. Çimlenme, sürgün oluşumu ve gelişimi çalışmaları için bitki büyüme düzenleyicilerin

farklı derişimlerini içeren MS ortamları kullanıldı. Bu besi ortamının içerdđi kimyasallar ve bu kimyasalların miktarları sırasıyla tabloda gösterildi.

Tablo 1. MS besi ortamının içerdđi maddeler ve miktarları

Maddeler	MS Besin Ortamındaki Miktarlar (mg/L)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
H ₃ BO ₃	6,2
KH ₂ PO ₄	170
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CaC ₁₂ .2H ₂ O	440
KI	0,83
CoC ₁₂ .6H ₂ O	0,025
Myo-Inositol	100
Tritriplex(Na ₂ EDTA)	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Nikotinik asit	0,5
Pridoksin-HCl	0,5
Tiamin-HCL	0,1

2.2.2. Kültür Ortamına İlave Edilen Bitki Büyüme Düzenleyicileri

2.2.2.1. Oksinler

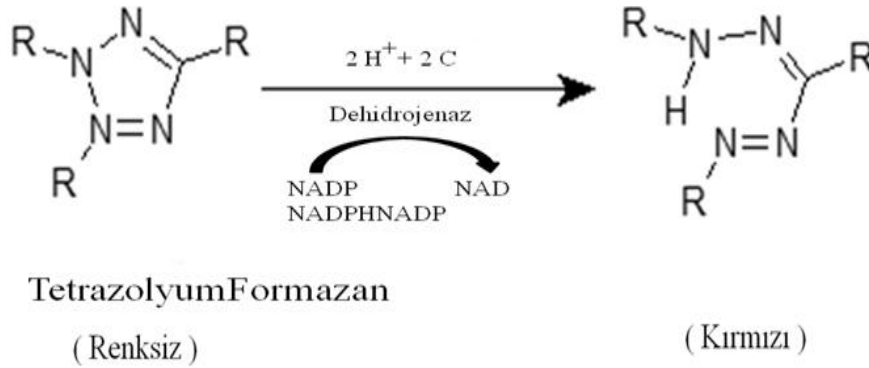
Tohumların çimlendirilmesinde % 2 sukroz içeren MS ortamlarında, oksin olarak Naftelen Asetik Asit (NAA) sabit derişimlerde kullanıldı. Sürgün oluşumu ve gelişimini teşvik etmek amacıyla % 2 sukroz içeren MS ortamlarına ise, sitokininlerin farklı derişimleriyle birlikte sabit derişimlerde Naftelen Asetik Asit (NAA) kullanıldı.

2.2.2.2. Sitokininler

Bu tez çalışmasında çimlendirilen tohumlardan elde edilen fidelerin sürgün oluşumu ve gelişimini teşvik etmek amacı ile MS ortamlarına, 6-Benzilaminopürin (BAP), zeatin ve 6-Furfurilaminopürin (kinetin) gibi bitki büyüme düzenleyicileri 0,5-1-1,5-2 mg/L derişimlerde ilave edilerek kullanıldı.

2.2.3. Tohumların Canlılık Testi

2,3,5-Trifenil Tetrazolyum Klorit (TTC-Sigma) bileşiğı kullanılarak yapılan canlılık testi Tetrazolyum Testi (TZ testi) olarak bilinir. TZ testi kullanışlı ve güvenilir bir testtir. TZ testinin mekanizması, canlı dokuyla olan kimyasal tepkimeye bağılı olarak açıklanmaktadır. TTC bileşiğı deiyonize su (dH₂O) ile çözelti oluşturduğunda renksiz bir halde bulunmaktadır, canlı dokularda bulunan dehidrojenaz enzimiyle tepkimeye girdiğinde ise formazan bileşiğine dönüşür (bkz. şekil 7). Bu bileşikten dolayı canlı doku üzerinde kırmızı bir renk oluşmaktadır. Renk oluşuma bağılı olarak uygulama yapılan dokunun canlı ya da cansız olduğu varsayılır (Patıl ve Malavika, 1968).



Şekil 7. Tetrazolyum bileşiğinin dehidrojenaz enzimiyle girdiğı kimyasal tepkime

L. angustifolia'nın tohumları iki farklı muameleden geçirilerek; a) Hidrojen peroksit (H₂O₂) ile sterilizasyondan sonra, b) herhangi bir sterilizasyon işlemi yapmadan doğal halleriyle, TTC bileşiğı ile canlılıkları test edildi.

Toz halde bulunan TTC bileşiminden 1 g alınarak 100 mL deiyonize su (dH₂O) ile bir çözelti hazırlandı. İki ayrı gruba ayrılan lavanta bitkisinin tohumları; a) H₂O₂ bileşimiyle steril edilen tohumlar (100 tohum) b) steril edilmeyen tohumlar (100 tohum). Her iki şekilde ayrılan tohumlar bir petri kabına koyuldu. Daha önce hazırlanan TTC bileşiminden bir miktar alınıp tohumlar kapanıncaya kadar eklendi. Tohumlar bu bileşimde karanlık bir ortamda 24 saat oda sıcaklığında bekletildi. Petri kabı içindeki tohumlar mikroskop (binoküler) altında bistürü yardımıyla tek tek açılarak renk değişimi gözlemlendi.

2.2.4. Kültür Ortamının Hazırlanması

Bu tez çalışmasında MS besi ortamı kullanıldı. Makro, mikro besin elementleri ve vitaminleri içeren bu ortamlar firma (Sigma) önerisi doğrultusunda 4,41 g/L tartılıp 1000 mL deiyonize su (dH₂O)' da çözüldü. Karışıma karbon kaynağı olarak 20 g/L olacak şekilde sukroz ilave edildi ve çözeltinin pH'sı 1 molar NaOH ve 1 normal HCl kullanılarak pH 5,7'ye ayarlandı. Ortamlar 8 g/L agar ilave edilerek katılaştırıldı. Bitki büyüme düzenleyicileri otoklavdan önce belirli kombinasyon ve konsantrasyonlarda ilave edildi, ortamlar otoklavda 1 atm basınçta 12 °C'ye ulaştıktan sonra 15 dakika süre ile steril edildi. Sterilizasyonu takiben ortamlar steril kabine alındı, önceden hazırlanan steril kültür kaplarına (petriler, erlenler, magenta) belirli oranlarda döküldü ve katılaştıktan sonra bu ortamlar kullanıldı.

2.2.5. Bitki Tohumlarının Sterilizasyonu

Lavanta bitkisinin tohumlarının sterilizasyonu; besi ortamlarında, iki farklı yöntem kullanılarak, kontaminasyon riskini azaltmada en iyi sonuç veren yöntemden sonra seçildi. Bu yöntemler aşağıdaki gibidir.

2.2.5.1. Sodyum Hipoklorit Çözeltisi Kullanılarak Yapılan Sterilizasyon

Bu sterilizasyon yönteminde Domestos adlı ticari çamaşır suyu kullanıldı. 20 mL çamaşır suyuna, 80 mL dH₂O eklenerek % 20'lik bir çözelti hazırlandı. Lavanta tohumları delikli bir eppendorfa alındı. Sonra bu eppendorf çözeltinin bulunduğu kaba bırakılarak bir manyetik karıştırıcı üzerinde 10 dk. boyunca karıştırıldı. Sterilizasyona tabi tutulan

tohumlar iki ayrı gruba ayrılarak daha önce hazırlanan MS besi ortamlarına sırasıyla 12'şer tane tohum 10 ayrı magentaya ekildi.

2.2.5.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Kullanılarak Yapılan Sterilizasyon

10 mL dH₂O, 0,5 g sukroz ile karıştırılarak % 5' lik sukroz çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 2 mL alınarak daha önce hazırlanan, 240 tane tohumun bulunduğu eppendorf üzerine eklendi. 12 saat boyunca buzdolabında bekletilen tohumların içinde bulunan sukroz çözeltisi bir pipetör yardımıyla eppendorf içinden çekildi. Eppendorf içindeki tohumlar kapanacak kadar H₂O₂ eklenerek 30 dk. daha buzdolabında bekletildi. Buzdolabından alınan tohumlar daha önce hazırlanan MS besi ortamlarına sırasıyla 12'şer tane tohum 10 ayrı magentaya ekildi.

2.2.6. *In vitro*' da Tohumların Çimlendirilmesi

Lavanta tohumlarını çimlendirmek için; a) Naftalen Asetik Asit (NAA) ve b) NAA kullanmadan hazırlanan MS ortamları hazırlandı.

2.2.6.1. NAA Kullanmadan Yapılan Çimlendirme

Herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi kullanılmadan MS besi ortamı hazırlandı. Bu ortamlar MS-1 sembolleri kullanılarak adlandırıldı. Hazırlanan MS-1 besi ortamına ayrı ayrı 10 magentaya 12 tohum gelecek şekilde ekim yapıldı.

2.2.6.2. NAA Kullanarak Yapılan Çimlendirme

0,5 mg/L NAA içeren içeren MS besi ortamları hazırlandı. Bu ortamlar MS-2 sembolleri kullanılarak gösterildi. Lavanta tohumu H₂O₂ ile steril edildikten sonra MS-2 ortamına ayrı ayrı 10 magentaya 12 tohum gelecek şekilde ekildi.

Tablo 2. Tohumların çimlendirilmesinde kullanılan MS-1 ve MS-2 besi ortamlarının içerikleri

	Ortam	Sukroz	Katılaştırıcı ajan	BBD	Ortamın ph
MS-1 ortamı içeriği	4,41 g/L MS	20 g/L sukroz	8 g/L agar	-	5,7
MS-2 ortamı içeriği	4,41 g/L MS	20 g/L sukroz	8 g/L agar	0,5mg/L NAA	5,7

2.2.7. Çimlenen Tohumlardan Alınan Sürgün Ucu Eksplantları ile *İn Vitro*' da

Sürgün Oluşturma

İn vitro koşullarda çimlendirilen *L. angustifolia* tohumlarından gelişen çimlendirilmiş fidelerden elde edilen, sürgün ucu eksplantları, her bir magentada 6 eksplant olacak şekilde, sürgün gelişimi ortamları içeren magentalara aktarıldı. Sürgün gelişimi için 16 farklı MS ortamı kullanıldı ve oluşan fidelerin büyüme parametreleri kaydedildi. Bu eksplantlarda 8 hafta sonra yapılan gözlemler doğrultusunda sürgün oluşumu için en iyi ortam belirlendi ve aynı zamanda 16 hatın fenolik bileşikleri ve uçucu yağ verimleri incelendi. Yarı katı besin ortamlarının sukroz ve bitki büyüme düzenleyicilerinin içerikleri Tablo 3'te verildi.

Tablo 3. Sürgün gelişimi için kullanılan besin ortamlarının kompozisyonları

	Ortam	Sükroz	Sitokinin				Oksin
			Kinetin	BAP	TDZ	Zeatin	NAA
KS1	MS	20g/L	0,5mg/L	-	-	-	0,05mg/L
KS2	MS	20g/L	-	0,5mg/L	-	-	
KS3	MS	20g/L	-	-	0,5mg/L	-	
KS4	MS	20g/L	-	-	-	0,5 mg/L	
KS5	MS	20g/L	1mg/L	-	-	-	
KS6	MS	20g/L	-	1mg/L	-	-	
KS7	MS	20g/L	-	-	1mg/L	-	
KS8	MS	20g/L	-	-	-	1 mg/L	
KS9	MS	20g/L	1,5mg/L	-	-	-	
KS10	MS	20g/L	-	1,5mg/L	-	-	
KS11	MS	20g/L	-	-	1,5mg/L	-	
KS12	MS	20g/L	-	-	-	1,5 mg/L	
KS13	MS	20g/L	2 mg/L	-	-	-	
KS14	MS	20g/L	-	2 mg/L	-	-	
KS15	MS	20g/L	-	-	2 mg/L	-	
KS16	MS	20g/L	-	-	-	2 mg/L	

2.2.8. Özütlerin Elde Edilmesi

In vitro’da yetiştirilen *L. angustifolia* bitkisinin hatlarından 2 farklı özüt hazırlandı. Etil eter ve tetradekan belli miktarlarda karıştırılarak uçucu yağ doğrudan bitkiden özütlenirken, uçucu yağ eldesinden sonra geriye kalan bitki materyalinden ise HPLC ‘de bazı özel fenolik bileşiklerin analizi için özütler elde edildi. İzlenen yöntemlerin detayları aşağıda verildi.

2.2.8.1. HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analizi

In vitro' da yetiştirilen *L. angustifolia* bitkisinin 16 farklı hatının kuru örneklerinden ortalama 0,5'er g alınarak 3 saat boyunca metanolle ultrasonik banyoda özütleme yapıldı ve 40°C'de rotary evaporatörde metanol uçuruldu. Kalıntı 5 mL deiyonize suda çözülerek etil asetat ve dietileter ile kısımlandırıldı ve organik fazlar birleştirilerek çözücüler uçuruldu. Kalıntı uygun miktarda metanolde çözülerek HPLC analizlerine geçildi.

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

2.2.8.2. Kuru Bitki Örneklerinden Elde Edilen Uçucu Yağ Özütleri

L. angustifolia bitkisinin kuru örnekleri alınarak, oluşturulan bir tüp sistemine yerleştirildi. 400 mL etileter ve 80 µL tetradekan bileşiği karıştırılarak stok çözelti hazırlandı. Her bir hat (16 adet hat) için 50 mL ayrıldı. 3 tekrar halinde (her defasında yaklaşık 10 mL) alınarak oluşturulan tüp sistemine eklendi. Her tekrarda 15 dk beklendikten sonra bir kompresör yardımıyla tüpe hava üflenerek tüpün altında yer alan boş bir kapa özüt toplandı. Elde edilen özütlerin üzerine 1 mL hekzan eklenerek GC/MS analizleri için hazırlandı.

3. BULGULAR

3.1. Tohumların Canlılık Testi

L. angustifolia bitkisine ait tohumların canlılık testi için; a) Sterilizasyona tabi tutulan tohumlar ve b) sterilizasyon işlemi yapılmadan test edilen normal tohumların TZ testi sonuçları tablo 4' te verildi.

Tablo 4. *Lavandula angustifolia* bitkisinin TTC bileşiğiyle yapılan TZ testi

	Sterilize edilmeyen normal tohumlar (tane)				H ₂ O ₂ ile steril edilen tohumlar (tane)			
	1.grup	2.grup	3. grup	4. grup	1.grup	2.grup	3. grup	4. grup
Canlı	14	16	16	18	20	21	19	24
Cansız	11	9	9	7	5	4	6	1
Yüzde	% 64 ± 2				% 84 ± 2			

Tablo 4' deki bulgular incelendiğinde, TZ testine tabi tutulan tohumların; sterilize edilmemiş olanlarında canlılık oranının % 64 ± 2 ve H₂O₂ ile sterilizasyona tabi tutulanlarda ise canlılık oranının %84 ± 2 olduğu tespit edildi.

3.2. Sterilizasyon Yöntemi Seçimi

İki farklı sterilizasyon yöntemi kullanarak kurulan denemelerde; a) çamaşır suyu kullanarak yapılan denemelerde kontaminasyon oranı % 50 ± 2 iken b) H₂O₂ kullanarak yapılan denemelerde kontaminasyon oranı ise % 85 ± 3' dir. Sonuçlar Tablo 5 'te verildi.

L. angustifolia bitkisinin tohumlarını steril etmek için kurulan denemelerde sonuçlar incelendiğinde, H₂O₂ kullanarak yapılan sterilizasyonda kontaminasyon riskinin en az olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar ele alındığında bu tez kapsamında doku kültürü çalışmalarında oluşturulan prosedürlerde tohumların sterilizasyonu için en uygun yöntemin H₂O₂ kullanılarak yapılan sterilizasyon olduğu gözlenecektir.

Tablo 5. *L. angustifolia* bitkisinin tohumlarının sterilizasyon yöntemi seçim sonuçları

	Çamaşır suyu kullanarak yapılan sterilizasyon		H ₂ O ₂ kullanarak yapılan sterilizasyon	
	MS1 besi Ortamı(%)	MS2 besi ortamı (%)	MS1 besi ortamı (%)	MS2 besi ortamı (t%)
Kontaminasyon yüzdesi	%50	%50	%10	%20
	%50±2		%15±1	

3.3. Doku Kültürü ile İlgili Sonuçlar

L. angustifolia bitkisine ait tohumların *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi ve çimlendirilmiş fidelere ait sürgün ucu eksplantlarının sürgün ortamında gelişimiyle ilgili denemeler kurularak farklı sonuçlar elde edildi.

3.3.1. *Lavandula angustifolia* Bitkisinin Tohumlarının Çimlendirilmesi

3.3.1.1. NAA Kullanılmadan Yapılan Çimlendirme

NAA kullanılmadan yapılan denemelerde 8 hafta MS-1 ortamında çimlenen tohum sayısı 56 çimlenmeyen tohum sayısı 64 olduğu tespit edildi.

3.3.1.2. NAA Kullanarak Yapılan Çimlendirme

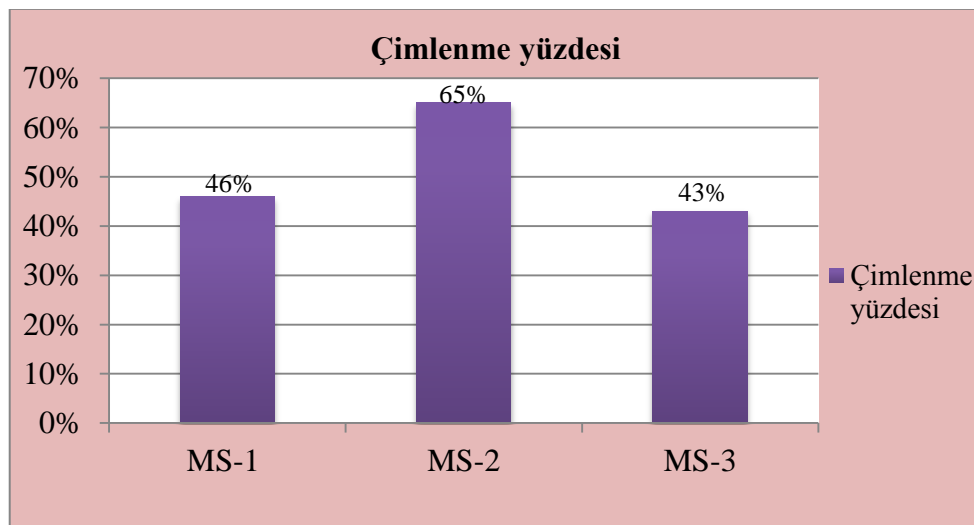
Literatür taraması sonucunda en iyi çimlendirme ortamınının 0,5 mg/L NAA içeren MS besi ortamı olduğu saptandığı için çimlendirmeyi teşvik etmek amacıyla denemelerde MS-2 ortamı kullanıldı. Yapılan denemelerin sonuçları Tablo 6 'da gösterildi.

Tablo 6. Kültüre alınan tohumlarda çimlenme durumları

Tohum Durumu		MS-1 besi ortamı (tane)					MS-2 besi ortamı (tane)					Nemli pamuk ortamı (tane)				
1.grup	Çimlenen	3	4	4	6	8	7	8	8	9	8	3	4	4	6	8
	Çimlenmeyen	9	8	8	6	4	5	4	4	3	4	9	8	8	6	4
2.grup	Çimlenen	7	5	8	3	8	8	7	8	8	7	6	5	6	3	7
	Çimlenmeyen	5	7	4	9	4	4	5	4	4	5	6	7	6	9	5
Toplam:		Çimlenen: 56 Çimlenmeyen: 64					Çimlenen: 78 Çimlenmeyen: 42					Çimlenen: 52 Çimlenmeyen: 66				
Çimlenme oranı:		% 46± 2					% 65± 2					% 43± 2				

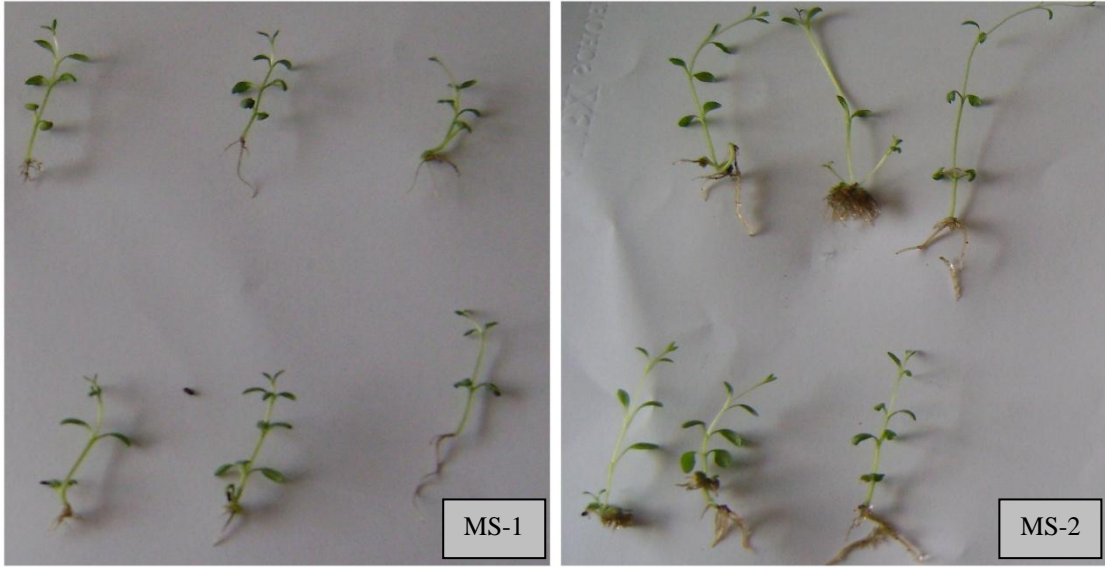
Her bir tekrerde kültüre alınan tohum sayısı 12 adettir.

MS-1 ve MS-2 sembolleri kullanılarak hazırlanan iki farklı besi ortamında çimlenen ve çimlenmeyen tohumlar istatistiksel olarak incelendiğinde; MS-1 ortamında çimlenen tohum sayısı 56 ± 3 , MS-2 ortamında çimlenen tohum sayısının 78 ± 3 ve nemli pamuk ortamında 52 ± 2 olduğu tespit edildi. Çimlendirme ortamlarında görüldüğü gibi 0,5 mg/L NAA içeren MS-2 ortamı çimlendirme yüzdesi bakımından en verimli ortam olarak belirlendi.



Şekil 8. *L. angustifolia*' nin *in vitro*da çimlenme yüzdeleri

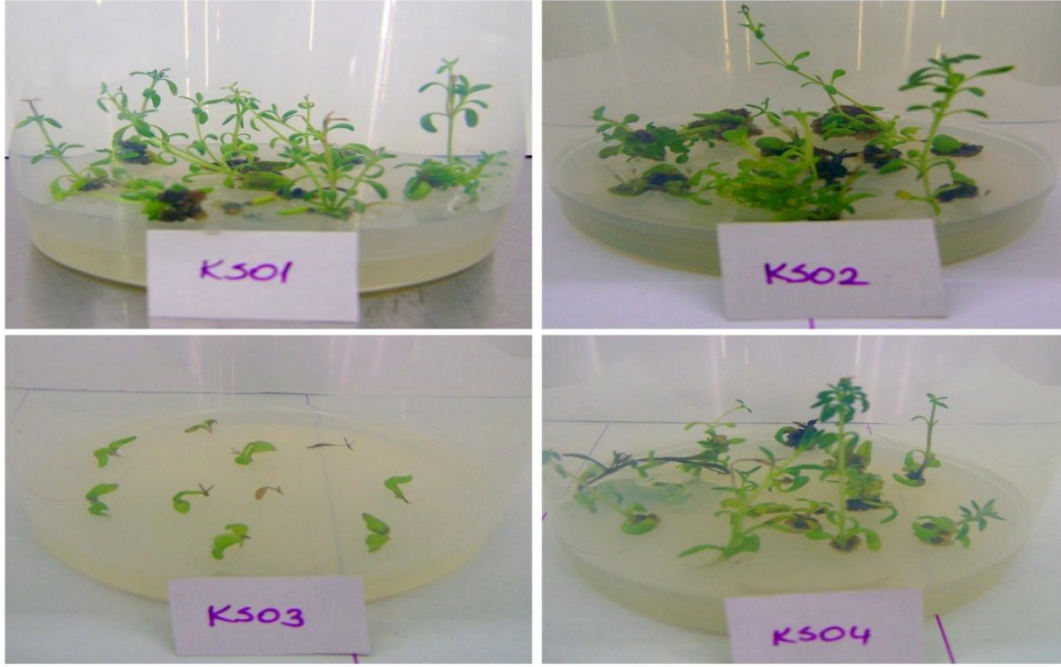
Öte yandan, MS-1 ve MS-2 ortamlarında kök ve gövde oluşumu ve yaprak gelişimi yönünden farklılıklar görüldü. MS-2 ortamında gövde, yaprak ve kök gelişiminin daha iyi olduğu gözlemlendi. MS-2 besi ortamında yapraklar daha büyük ve oluşan sürgünlerde daha sık nodlar ve köklenmenin daha fazla olduğu tespit edildi. Bu fideler çimlenmenin hemen ardından sürgün gelişimi ortamlarına aktarıldı.



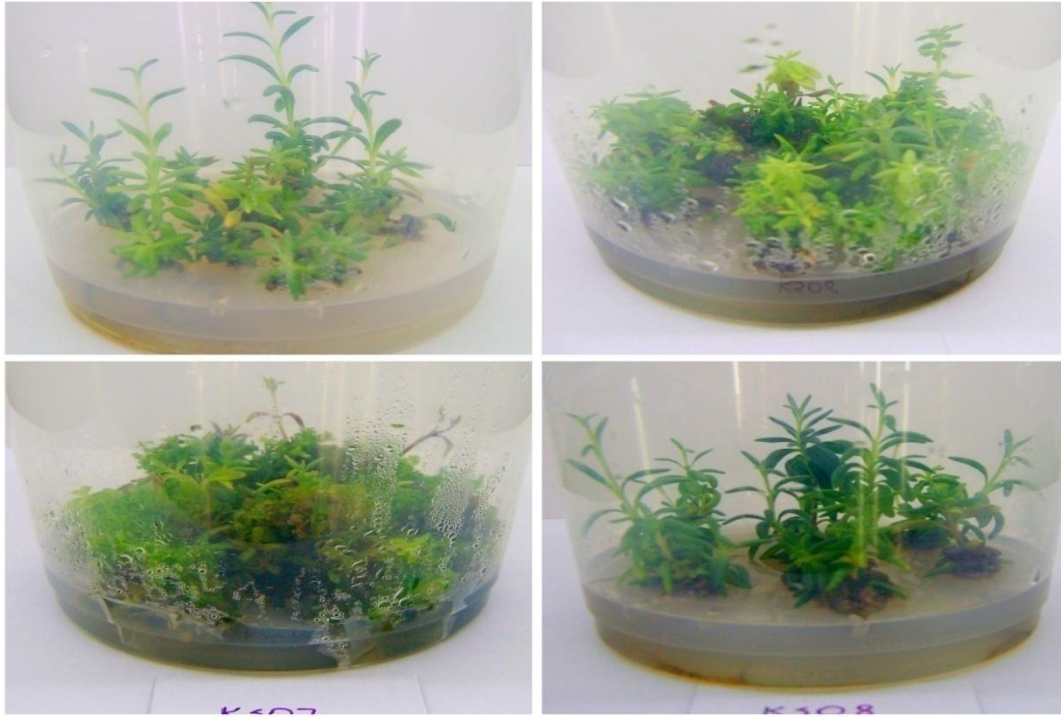
Şekil 9. MS-1 ve MS-2 besi ortamında yapılan çimlendirme sonucundaki fidelerin gelişimi

3.3.2. Çimlendirilen Sürgünlerden Alınan Eksplantlardan Sürgün Oluşumu

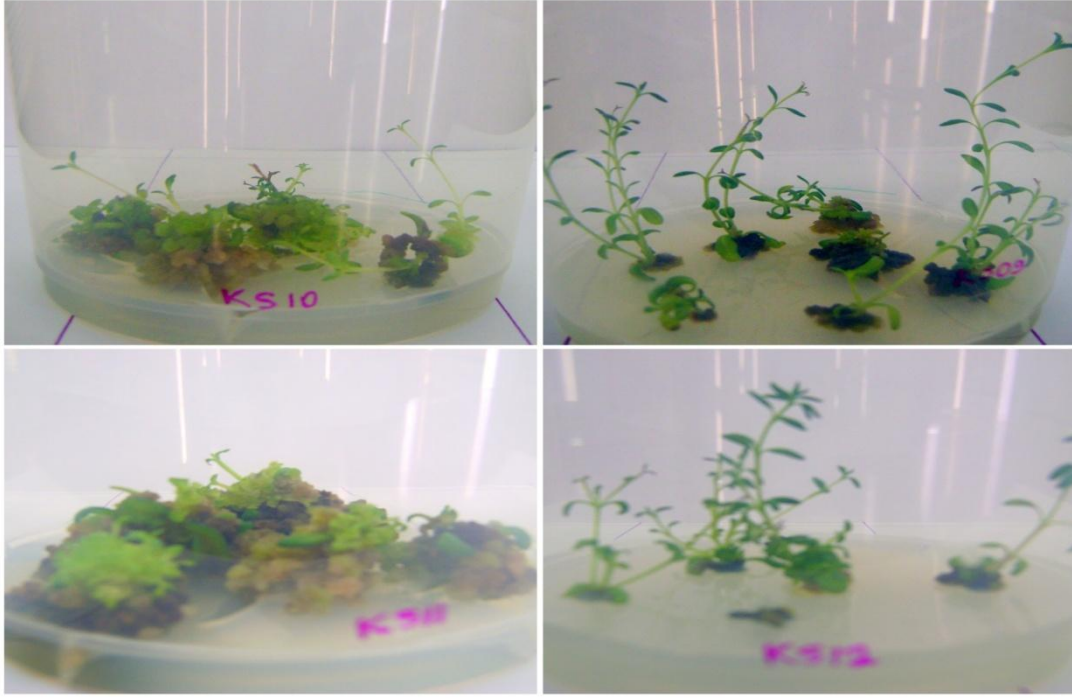
Çimlendirme ortamlarında kültüre alınan tohumlardan gelişen çimlenmiş fideciklere ait sürgün ucu eksplantlar, sürgün gelişimi için (Tablo 4-5.) 16 MS ortamlarında kültüre alındı. Bu eksplantlardan yapılan 8 hafta sonraki gözlemler sonucunda büyüme parametreleri kaydedildi. Elde edilen sürgünlerde belirlenen sürgün gelişimi, nod sayısı, kök ve kallus oluşumu bakımından yapılan değerlendirmeye göre, ortamlar arasında farklılıklar bulundu.



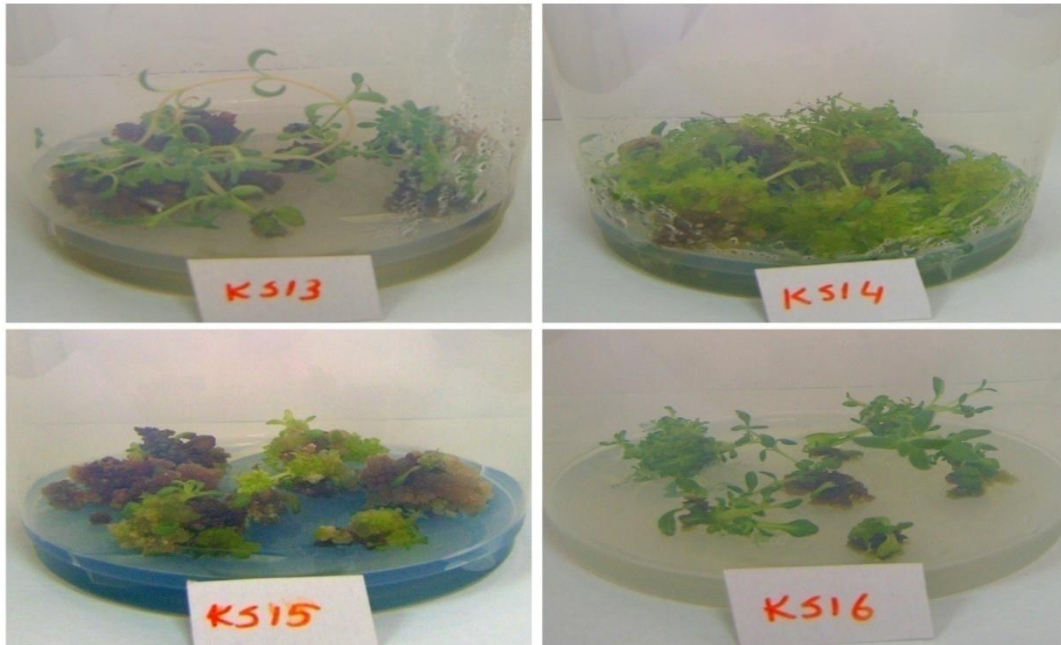
Şekil 10. KS-1 ortamında oluşan tek ya da 3'lü sürgün üzerindeki nodlar, KS-2 ortamında oluşan tek ya da ikili sürgünler, KS-3 ortamında gelişme olmadı, KS-4 ortamında oluşan tek sürgünler üzerindeki seyrek nodlar



Şekil 11. KS-5 ortamında oluşan tek ya da ikili sürgün üzerindeki sık nodlar, KS-6 ortamında oluşan çoklu sürgünler, KS-7 ortamında oluşan çoklu sürgünler ve KS-8 ortamında oluşan tek ya da iki sürgün üzerindeki sık nodlar



Şekil 12. KS-9 ortamında oluşan uzun tekli sürgünler, KS-10 ortamında oluşan çoklu sürgün ve kallus oluşumu, KS-11 ortamında oluşan çoklu sürgün ve kallus oluşumu ve KS-12 ortamında oluşan tek ya da ikili sürgünler



Şekil 13. KS-13 ortamında oluşan tek ya da ikili sürgün üzerinde seyrek nodlar, KS-14 ortamında oluşan çoklu sürgünler ve kallus oluşumu, KS-15 ortamında oluşan çoklu sürgün ve yüksek miktarda kallus oluşumu, KS-16 ortamında oluşan kısa sürgünler.

Tablo 7. Sürgün çoğaltım ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda görülen gelişmeler

BBD	Ortam	Eksplant başına ortalama sürgün sayısı *			Ortalama sürgün ağırlığı **			Kallus oluşumu ***	Kök oluşumu
		Tek. I	Tek. II	Tek. III	Tek. I	Tek. II	Tek. III		
Kinetin	0,5mg/L	2,1	1,6	1,5	0,1010	0,1100	0,1762	+	Kısmen oluşumlar var
		Ort. 1,7			Ort. 0,129±0,04				
	1 mg/L	1,6	2,4	1,8	0,1297	0,1975	0,2520	+	+
		Ort. 1,9			Ort. 0,193±0,06				
	1,5 mg/L	1,6	1,6	2,4	0,1877	0,1382	0,2523	+	-
		Ort. 1,8			Ort. 0,192±0,05				
	2 mg/L	1,5	1,6	1	0,1008	0,1230	0,0862	+	Kısmen oluşumlar var
		Ort. 1,3			Ort. 0,103±0,01				
BAP	0,5mg/L	2,1	1,6	1,6	0,1230	0,1208	0,1430	+	-
		Ort. 1,7			Ort. 0,128±0,01				
	1 mg/L	6	5,8	6	4,9141	4,0017	2,0017	+	+
		Ort. 5,9			Ort. 3,639±1,48				
	1,5 mg/L	3,5	4	3,2	1,2557	0,4952	0,2292	+	-
		Ort. 3,5			Ort. 0,660±0,53				
	2 mg/L	4,8	5,8	5,6	2,6642	4,0020	3,2850	+	-
		Ort. 5,4			Ort. 3,317±0,66				
TDZ	0,5mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ort. -			Ort. -				
	1 mg/L	20. 0>Çoklu sürgün			5,5818	7,0592	4,2979	+	-
		Ort. -			Ort. 5,6463±1,38				
	1,5 mg/L	20. 0>Çoklu sürgün+Kallus			1,0425	2,2889	1,1240	+	-
		Ort. -			Ort. 1,485±0,69				
2 mg/L	20. 0>Çoklu sürgün+Kallus			1,0235	2,0581	1,1102	+	-	
	Ort. -			Ort. 1,397±0,57					
Zeatin	0,5mg/L	0,5	1	0,8	0,0952	0,0565	0,0692	+	-
		Ort. 0,7			Ort. 0,073±0,01				
	1 mg/L	2,6	2	2,6	0,6353	0,3817	0,7920	+	+
		Ort. 2,4			Ort. 0,623±0,20				
	1,5 mg/L	2,3	2	2,2	0,1069	0,3977	0,1942	+	-
		Ort. 2,1			Ort. 0,232±0,14				
	2 mg/L	1,3	1,2	1,5	0,1200	0,087	0,1003	+	-
		Ort. 1,5			Ort. 0,102±0,01				

Kültüre alınan sürgün ucu eksplant sayısı 6 adettir.

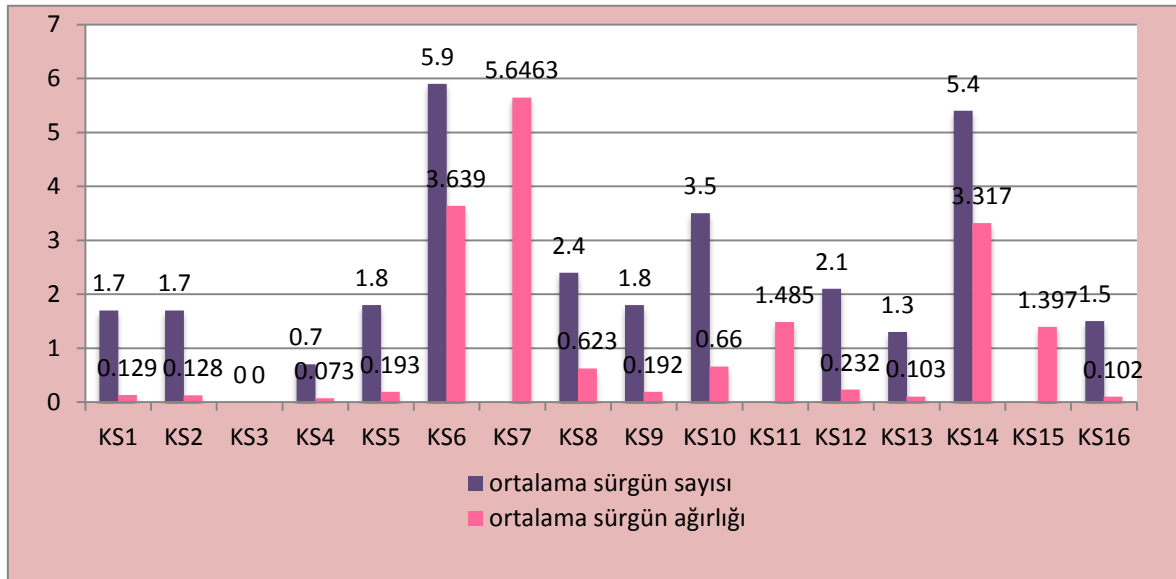
* 8. haftada tohum kökenli sürgün ucu eksplantlarının ortalama sürgün sayıları

** 8. haftada tohum kökenli sürgün ucu eksplantlarının bir sürgünün ağırlığı

*** 8. haftada tohum kökenli sürgün ucu eksplantlarının kallus oluşumu

Sürgün gelişimi için kültüre alınan tohum kökenli sürgün ucu eksplantlarda 8 hafta sonra yapılan gözlemler sonucunda elde edilen sürgünlerde belirlenen nod sayıları ve sürgün sayıları bakımından yapılan istatistikî değerlendirmeye göre, ortamlar arasında farklılıklar görüldü. En yüksek sürgün sayısı değeri MS besi ortamında 1-2 mg/L BAP + 0,05 mg/L NAA içeren; KS-6 ve KS-13 ve 1 mg/L TDZ + 0,05 mg/L NAA içeren KS-7 besi ortamlarında görüldü. En düşük sürgün oluşumu TDZ nin 0,5 mg/L derişimlerinde görüldü.

On altı farklı modifiye MS ortamında kültüre alınan tohum kökenli sürgün ucu eksplantları için 8 hafta sonra yapılan istatistikî değerlendirmeye göre sürgün ağırlığı açısından farklılıklar görüldü. En ağır fidelere BAP ve TDZ içeren besi ortamlarında rastlanıldı. Ort. 5,6 ile 1 mg/L TDZ + 0,05 mg/L NAA içeren sürgün ortamlarında en ağır fide oluşumu görülürken; ağırlığı ort. 0,7 ile 0,5 mg/L zeatin + 0,05 mg/L NAA içeren besi ortamında en hafif fide oluşumları kaydedildi. En ağır fide oluşumuna TDZ hormonunu BAP takip ederken zeatin ve kinetin içeren ortamlarda birbirine yakın ağırlığı daha az sürgün oluşumları tespit edildi.

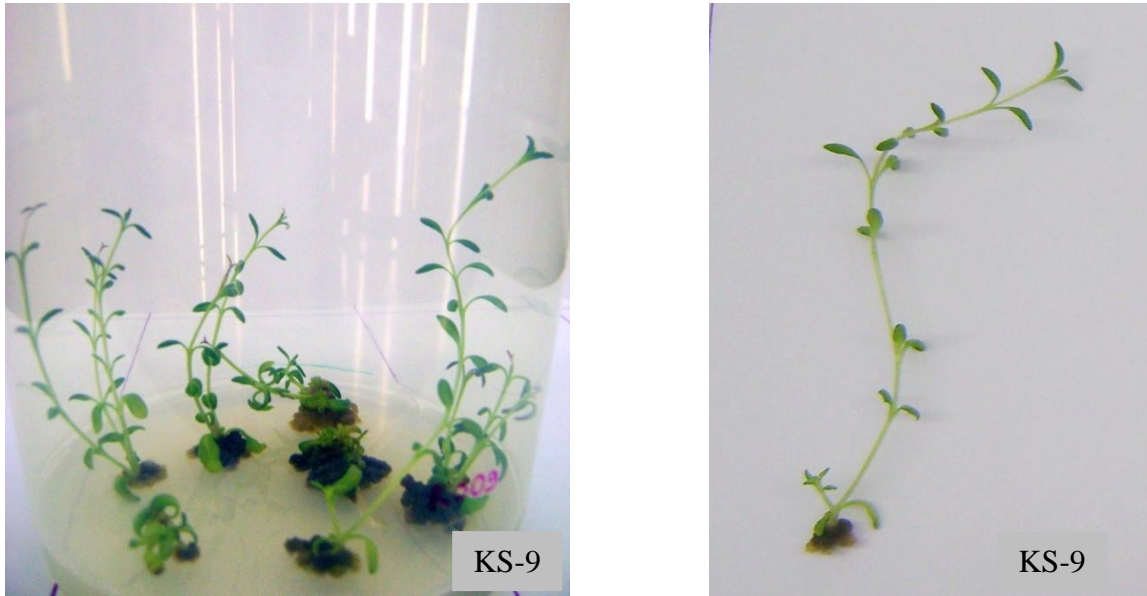


*KS-3 ortamında gelişim görülmedi

**KS-7, KS-11 ortamlarında 20. 0>çoklu sürgünler elde edildi ve KS15 ortamında kallus oluşumu görüldü

Şekil 14. On altı farklı ortamda kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarında görülen gelişmeler

Sekiz hafta sonra 16 farklı hat incelendiğinde fide boyları açısından ortamlar arasında farklılıklar tespit edildi. En uzun fidelere kinetin ve zeatin içeren sürgün oluşumu ortamlarında rastlanıldı. En uzun ortalama sürgün boyu 1,5 mg/L Kinetin + 0,05 mg/L NAA içeren MS besi ortamında elde edildi (Şekil 15). TDZ ve BAP'ın farklı konsantrasyonlarında yan dallanmalar daha fazla olup fide boyları daha kısa görülürken zeatin'de kinetine benzer tek ya da iki sürgün üzerinde sık nodlu uzun sürgün yapıları gözlemlendi.



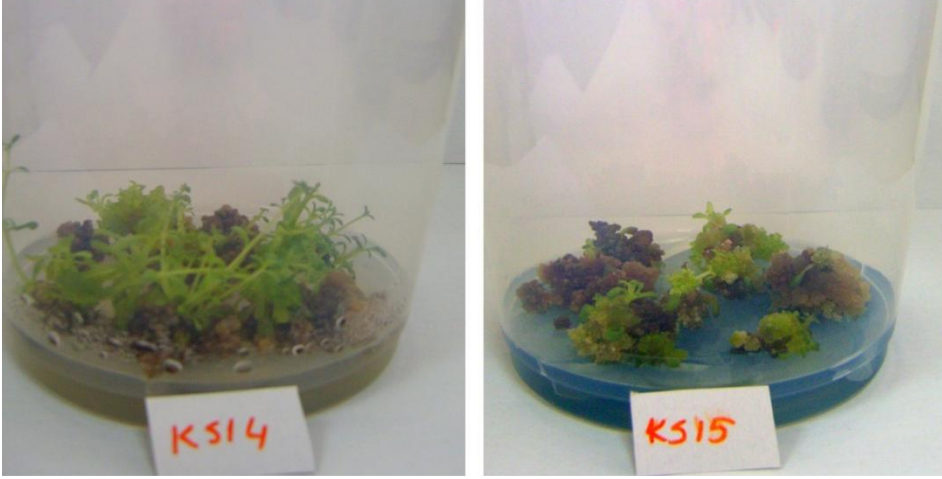
Şekil 15. *In vitro*'da geliştirilen KS-9 ortamında *L. angustifolia* için en uzun sürgün boyu



Şekil 16. KS-5 nolu ortamda oluşan tek sürgün üzerindeki sık nodlar, KS-6 ortamda oluşan çoklu kısa sürgünler, KS-7 ortamda oluşan çoklu kısa sürgünler, KS-8 ortamda oluşan çoklu sürgünler

Sürgün ucu eksplantlarından gelişen fidelerde kısmen kök oluşumları görüldü. TDZ içeren ortamlarda kök oluşumuna rastlanılmadı (Şekil 16).

Nodal eksplantlardan sürgün gelişimi için kullanılan ortamların tümünde kallus oluşumları tespit edildi (Tablo 7). Besin ortamlarında kallus oluşturan eksplantlar bakımından yapılan değerlendirmede, ortamlar arasındaki farklılıklar olduğu bulundu. Eksplant başına ortalama kallus miktarı en fazla KS-14-15 ortamlarında görüldü. Kallus oluşumunun yüksek olduğu besi ortamlarında da mavi renk oluşumu gözlemlendi (Şekil 17). Yapılan gözlemlerde BAP ve TDZ içeren ortamlarda (KS-14 ve KS-15) kültüre alınan eksplantlarda ilk haftadan itibaren kalluslar tespit edildi. Ortamdaki BAP ve TDZ' nin derişim oranlarının artışıyla birlikte kallus oluşturan eksplant yüzdesi de arttı (Şekil 17).



Şekil 17. KS-15-14 nolu ortamlarındaki kalluslu bitki

On altı farklı ortamda kültüre alınan çim bitkilerin 8 hafta sonra ortalama sürgün sayısı, ortalama sürgün boyu ve ağırlığı, ortalama nod sayısı ve kallus oluşumu bakımından önemli sonuçlar elde edildi. Düşük derişimlerde uygulanan BBD için sürgün gelişimi daha az görülürken yüksek derişimlerde eksplant başına kallus oluşum yüzdesi artıp sürgün oluşumunun azaldığı gözlemlendi. En iyi sürgün ortamı; kinetin için 1-1,5 mg/L, BAP için 1-2 mg/L konsantrasyonlarında olduğu görüldü. TDZ nin 0,5 mg/L konsantrasyonun dışında diğer sürgün ortamlarında çoklu sürgünler görüldü ve TDZ için derişim arttıkça sürgün kısımlarında kallus oluşumunda da artma gözlemlendi. Zeatin, kinetine benzer şekilde sürgün ortamlarında büyüme gösterdi. Zeatin için en iyi sürgün gelişimi 1-1,5 mg/L derişimlerini içeren besi ortamlarında olduğu kaydedildi.

3.4. Fenolik Bileşen Analizi

3.4.1. HPLC ile Fenolik Bileşen Analizi

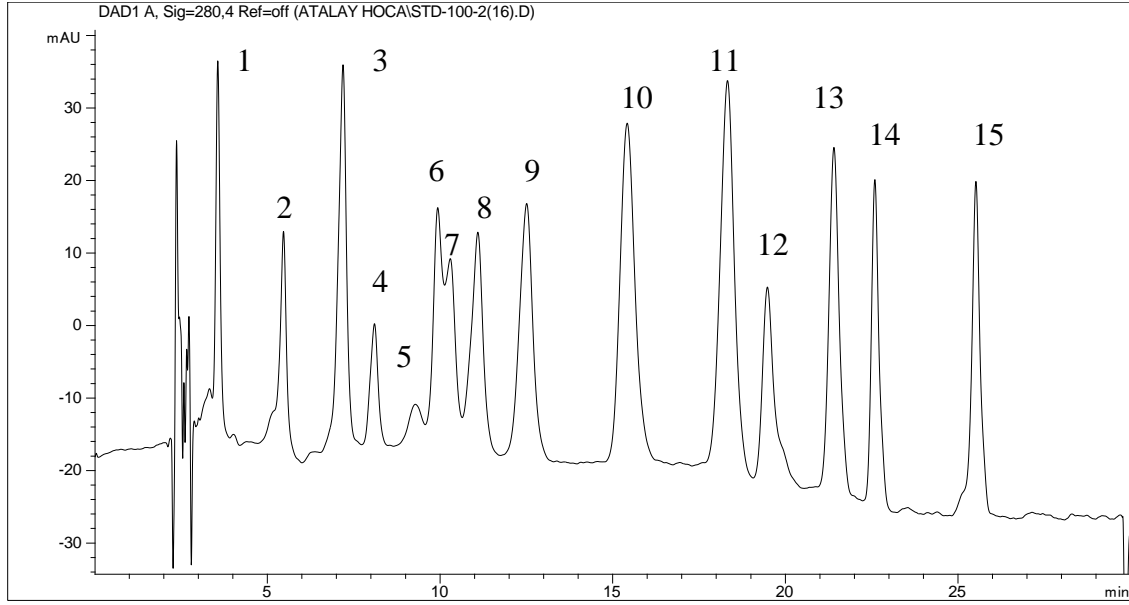
2.2.8. bölümünde yer alan yöntemler kullanılarak elde edilen özütlerin verimleri Tablo 8' de gösterilmiştir.

Tablo 8. HPLC analizleri için hazırlanan özütlerin verimleri

Numuneler	Besi Ortamı	Kuru ağırlık (g)	Özüt miktarı (mg)
1.Hat	KS-1	0,5750	-
2.Hat	KS-2	0,5790	0,2178
3.Hat	KS-3	-	-
4.Hat	KS-4	0,3215	1,2878
5.Hat	KS-5	0,5	0,0836
6.Hat	KS-6	0,5	0,0666
7.Hat	KS-7	0,5	0,0208
8.Hat	KS-8	0,4	0,0484
9.Hat	KS-9	0,5	0,0407
10.Hat	KS-10	0,5	0,0551
11.Hat	KS-11	0,5	0,0549
12.Hat	KS-12	0,4	0,0311
13.Hat	KS-13	0,5060	0,0698
14.Hat	KS-14	0,5665	0,0975
15.Hat	KS-15	0,5044	0,1401
16.Hat	KS-16	0,5665	0,2618

L. angustifolia bitkisinin hatlarının ekstraktlarında 4 adet fenolik bileşen kalitatif ve kantitatif olarak analiz edildi. Analiz edilen fenolik bileşiklerin dalga boyları, alıkonma zamanları, alanları ve konsantrasyonları aşağıdaki şekil 19-39' da ve tablo 9-23' de verildi. Bu çalışmada 16 adet fenolik bileşik standart olarak kullanıldı. 14 farklı kolonun fenolik kompozisyonunun ortaya konması amacıyla 16 fenolik standarttan hazırlanmış karışım

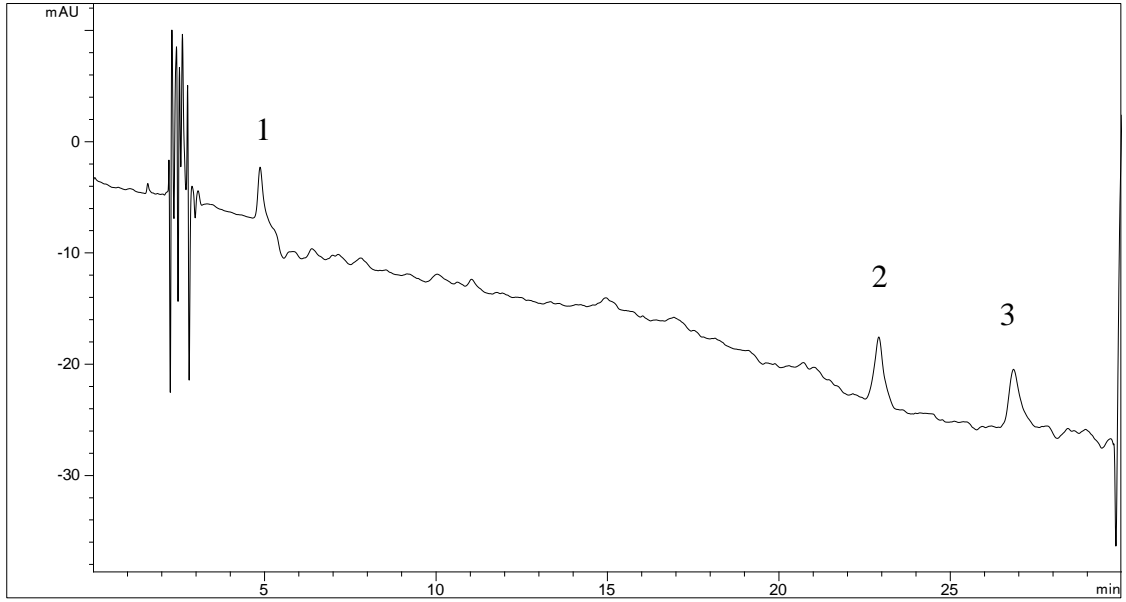
(her bir bileşen konsantrasyonu 100 μ M) kullanılarak daha önceki çalışmalarda geliştirilmiş olan ayırma yöntemi hem standart karışımında hem de bitki ekstraktlarında uygulandı. Standart karışımla elde edilen kromatogramlara bir örnek Şekil 18’de verildi.



Şekil 18. 16 Fenolik standardın kromatogramı (280 nm), her bir standardın derişimi 100 μ M, Standartlar sırasıyla; 1. Gallik asit, 2. Protokatekuik asit, 3. Protokatekualdehit, 4. Gentisik asit, 5. p-hidroksi benzoik asit, 6. Klorojenik asit, 7. Vanilik asit, 8. Kaffeik asit, 9. Sirinjik asit, 10. Vanilin, 11. p-Kumarik asit, 12. Şiringaldehit, 13. Benzoik asit, 14. Ferulik asit, 15. Sinapik asit, 16. Rosmarinik asit’dir

Uygulanan yöntemde bileşenler önemli ölçüde ayrılabilmiştir; sadece 3 ve 4 nolu bileşikler ve 12 ve 13 nolu bileşiklerde bir çakışma söz konusudur, bitki numunelerinde de böyle durumların olması durumunda spektrumlar arası fark değerlendirilerek bileşenin tayini yoluna gidildi.

L. angustifolia bitkisine ait hatlarından elde edilmiş olan 14 özüt standartlara uygulanan aynı yöntemle HPLC kalitatif ve kantitatif olarak analizine tabi tutuldu. Elde edilen kromatogramlar, bu kromatogramlarda numaralandırılarak gösterilmiş ölçülebilir pik veren bileşenler, bu piklere ait spektrumlar ve bu bileşen piklerinin alıkonma zamanları, pik alanı ve pik yükseklikleri Şekil 19-40 ve Tablo 11-26’ da verildi. Tablolarda aynı zamanda alıkonma zamanı ve spektrumu analizde kullanılan standartlarla uyuşan numune bileşenlerinin adları da bildirildi.

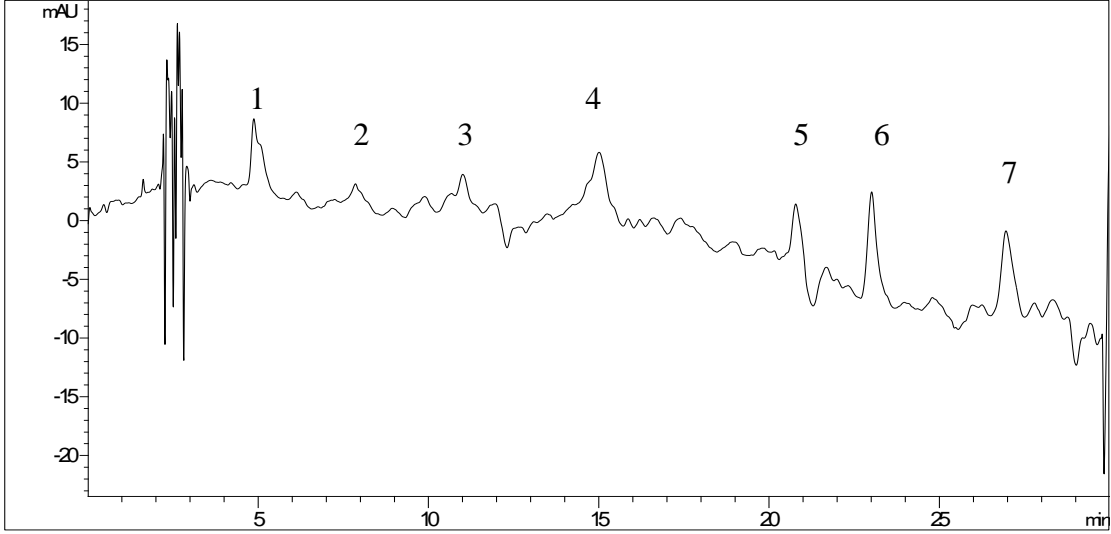


Şekil 19. KS-2 hatının 280 nm’ deki kromatogramı

Tablo 9. KS-2 hatında tespit edilen fenolik bileşikler

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT, dak.)	Pik alanı (mAUxdak)	Pik yüksekliği (mAU)
1	*	4.866	75.4	5.2
2	*	22.912	115.9	6.0
3	*	26.840	120.0	5.2

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

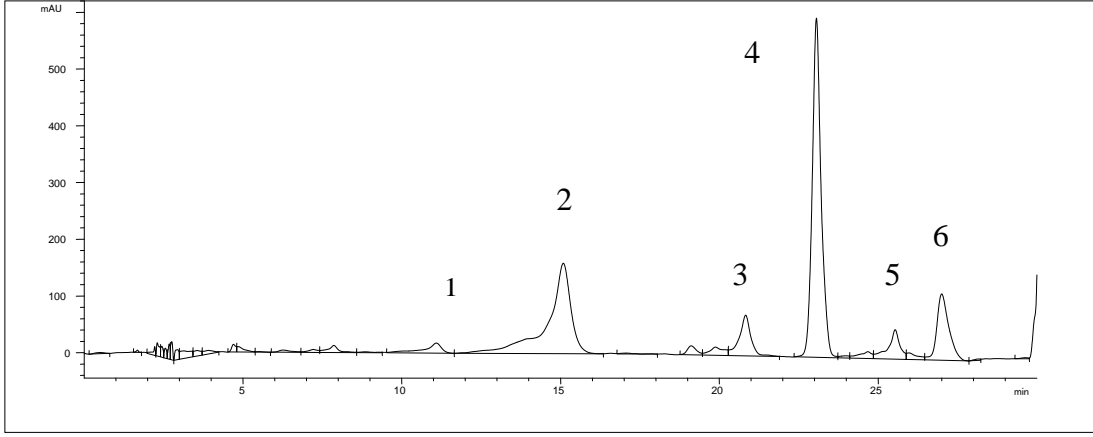


Şekil 20. KS-4 hatının 280 nm' deki kromatogramı

Tablo 10. KS-4 hatında tespit edilen fenolik bileşikler

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT, dak.)	Pik alanı (mAUxdak)	Pik yüksekliği (mAU)
1	*	4.869	119.1	6.0
2	*	7.853	34.5	1.7
3	Klorojenik aist	11.004	124.9	3.5
4	*	15.013	238.1	6.3
5	Ferulik asit	20.787	123.3	5.9
6	*	23.009	174.6	9.2
7	*	26.247	159.8	4.1

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

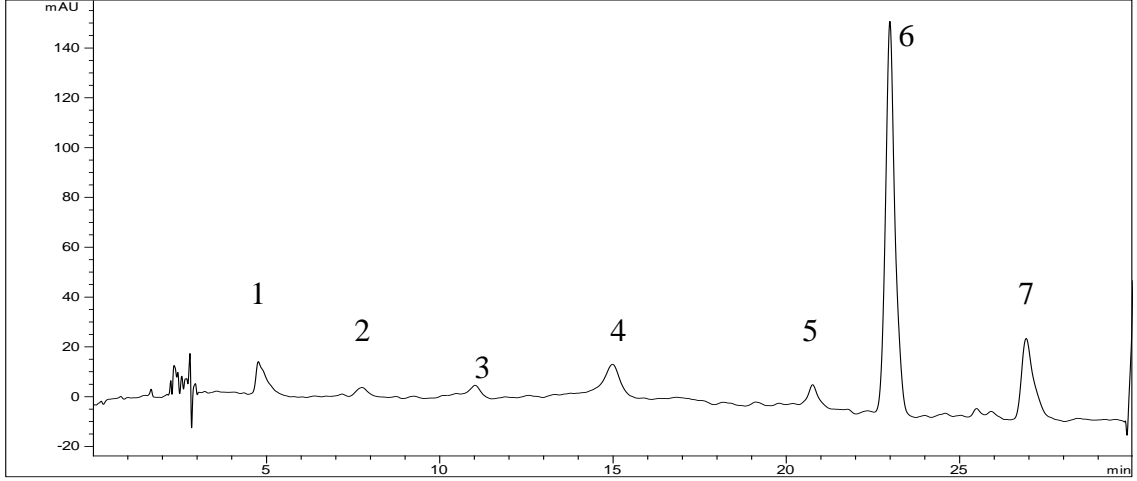


Şekil 21. KS-5 hatının 280 nm' deki kromatogramı

Tablo 11. KS-5 hatında tespit edilen fenolik bileşikler

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT, dak.)	Pik alanı (mAUxdak)	Pik yüksekliği (mAU)
1	Klorojenik asit	11.096	411.6	17.5
2	*	15.086	6229.3	157.7
3	Ferulik asit	20.83	1420.8	67
4	*	23.055	11302	593.7
5	Rozmarinik asit	25.534	950.8	49.9
6	*	26.998	2810.2	114

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

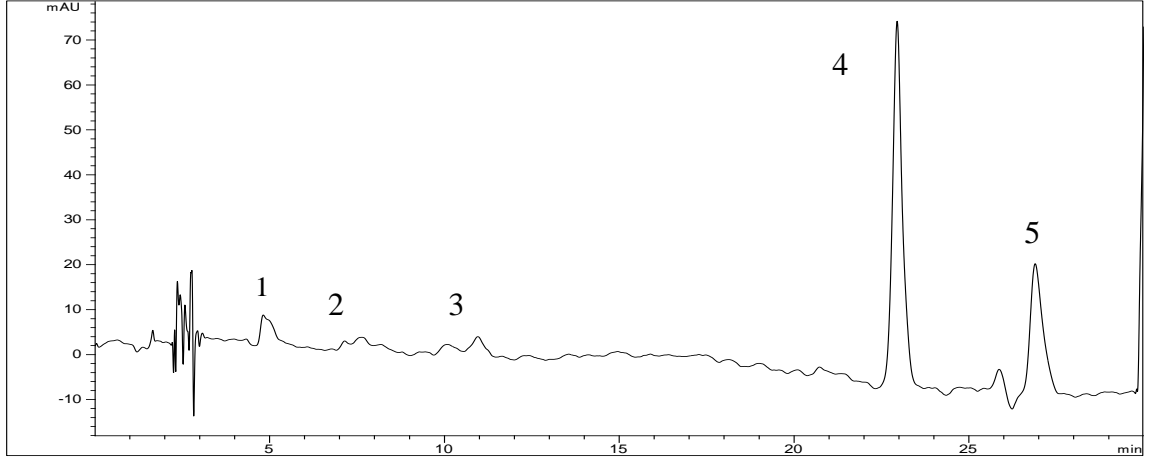


Şekil 22. KS-6 hatının 280 nm’ deki kromatogramı

Tablo 12. KS-6 hatında tespit edilen fenolik bileşikler

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT, dak.)	Pik alanı (mAUxdak)	Pik yüksekliği (mAU)
1	*	4.762	278.2	13.2
2	*	7.757	88.2	3.7
3	Klorojenik asit	11.015	85.1	4.3
4	*	14.983	399.9	12.4
5	Ferulik asit	20.756	173.3	8.7
6	*	22.986	3025.6	158.2
7	*	26.920	835.4	32.8

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

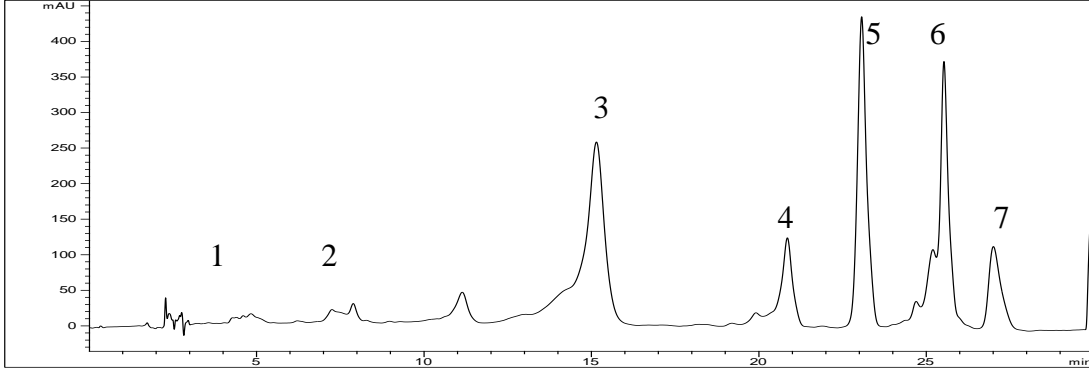


Şekil 23. KS-7 hatının 280 nm’ deki kromatogramı

Tablo 13. KS-7 hatında tespit edilen fenolik bileşikler

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT, dak.)	Pik alanı (mAUxdak)	Pik yüksekliği (mAU)
1	*	4.819	146.4	6
2	*	7.144	36.8	2.3
3	*	10.959	121.1	4.6
4	*	22.945	1585.7	81.1
5	*	26.893	769.1	29.6

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

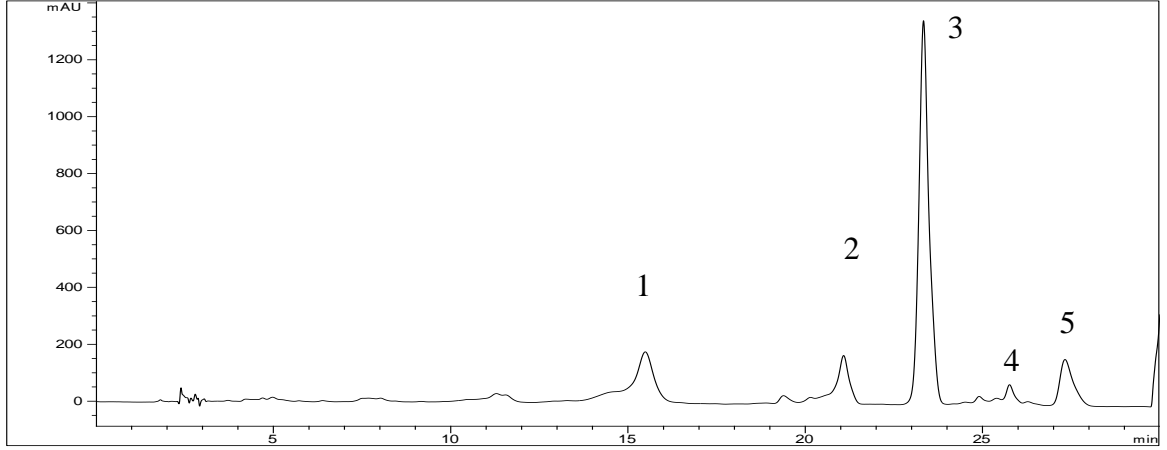


Şekil 24. KS-8 hatının 280 nm’ deki kromatogramı

Tablo 14. KS-8 hatında tespit edilen fenolik bileşikler

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT, dak.)	Pik alanı (mAUxdak)	Pik yüksekliği (mAU)
1	*	7.25	264.9	14.2
2	Klorojenik asit	11.139	1324.5	42.6
3	*	15.147	9382.6	257.8
4	Ferulik asit	20.849	2690.4	123
5	*	23.068	8694	438.9
6	Rozmarinik asit	25.525	6800.9	376.2
7	*	27.002	2990.5	116.7

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

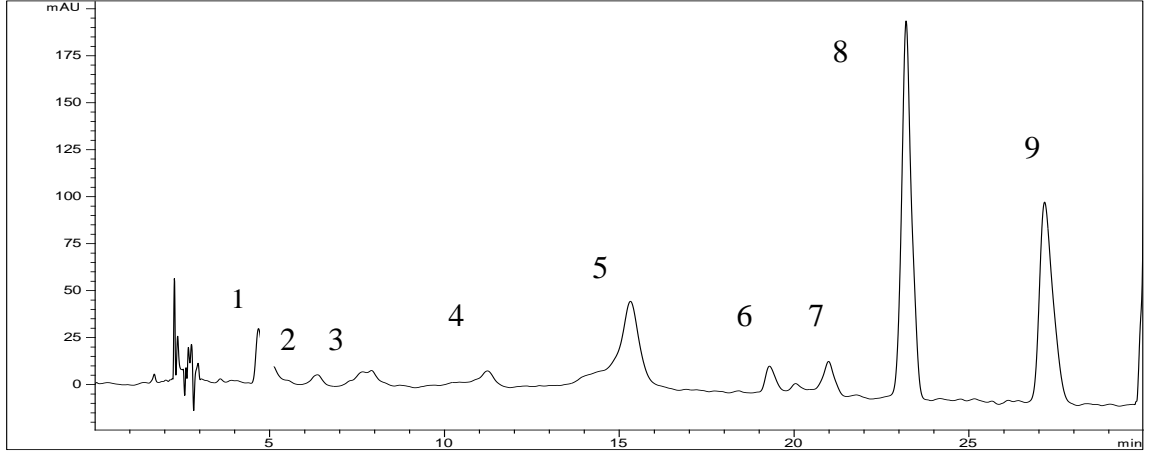


Şekil 25. KS-9 hatının 280 nm’ deki kromatogramı

Tablo 15. KS-9 hatında tespit edilen fenolik bileşikler

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT, dak.)	Pik alanı (mAUxdak)	Pik yüksekliği (mAU)
1	*	15.062	5249.5	169.1
2	Ferulik asit	20.816	3447.3	169.3
3	*	23.056	26289	1341.4
4	Rozmarinik asit	25.562	934.8	64.4
5	*	27.056	4237.5	163.1

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

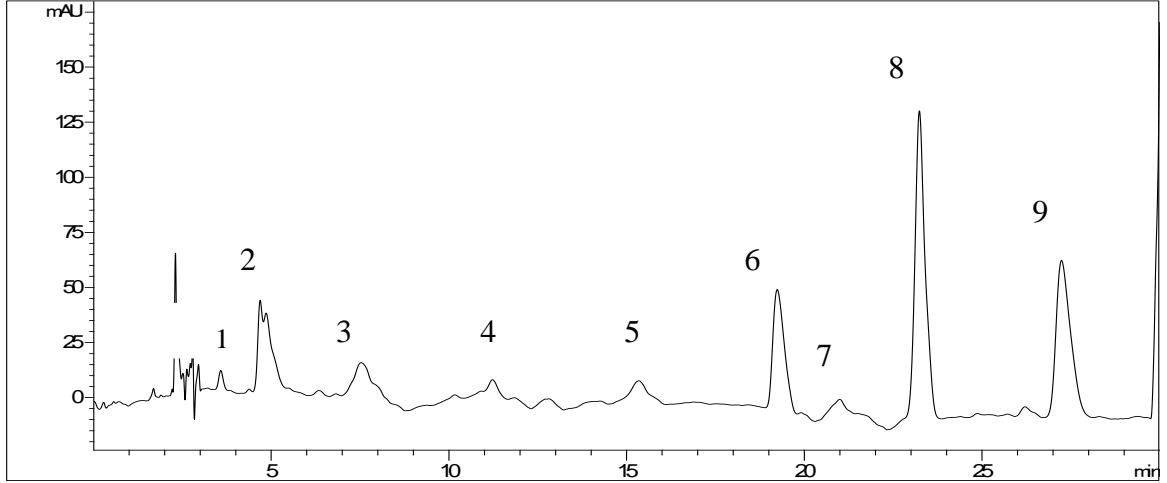


Şekil 26. KS-10 hatının 280 nm’ deki kromatogramı

Tablo 16. KS-10 hatında tespit edilen fenolik bileşikler

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT, dak.)	Pik alanı (mAUxdak)	Pik yüksekliği (mAU)
1	*	4.677	775.5	29.7
2	*	6.363	118.3	5.6
3	*	7.656	184.8	7.6
4	Klorojenik asit	11.228	193.4	7.3
5	*	15.315	1926.7	47.9
6	*	19.292	281	14.6
7	Ferulik asit	20.982	526.3	20.8
8	*	23.2	3934.6	200.3
9		27.164	2941.7	107.3

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

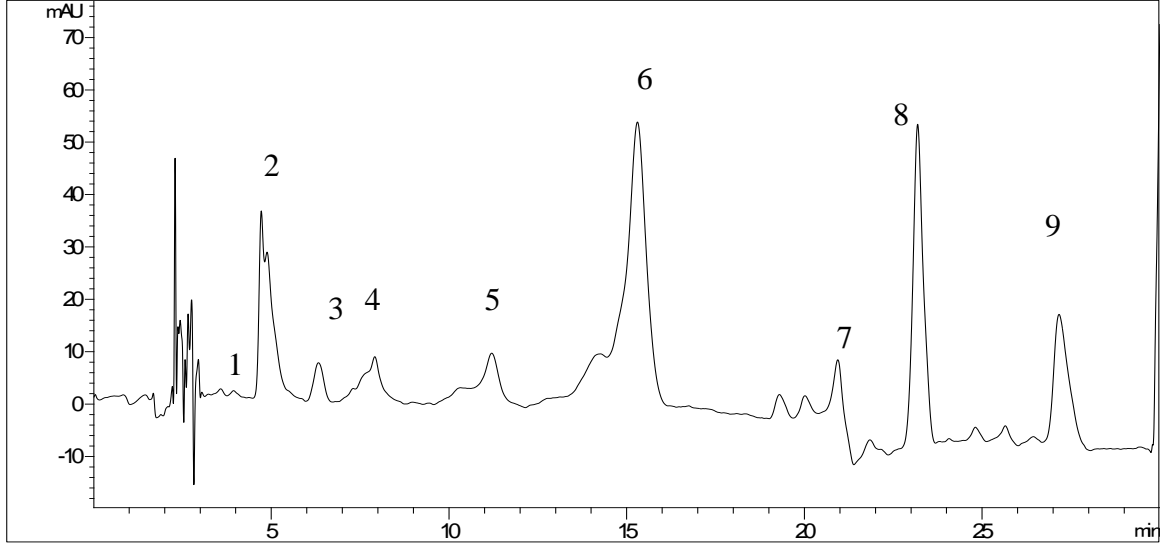


Şekil 27. KS-11 hatının 280 nm’ deki kromatogramı

Tablo 17. KS-11 hatında tespit edilen fenolik bileşikler

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT, dak.)	Pik alanı (mAUxdak)	Pik yüksekliği (mAU)
1	Gallik asit	3.577	91.4	9.8
2	*	4.685	995	41.4
3	*	7.53	625.8	16.6
4	Klorojenik asit	11.224	129.4	7
5	*	15.339	253.1	9
6	*	19.233	1194.5	54.4
7	Ferulik asit	20.992	103.6	5.4
8	*	23.234	2745.2	139.4
9	*	27.232	1999.9	70.8

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

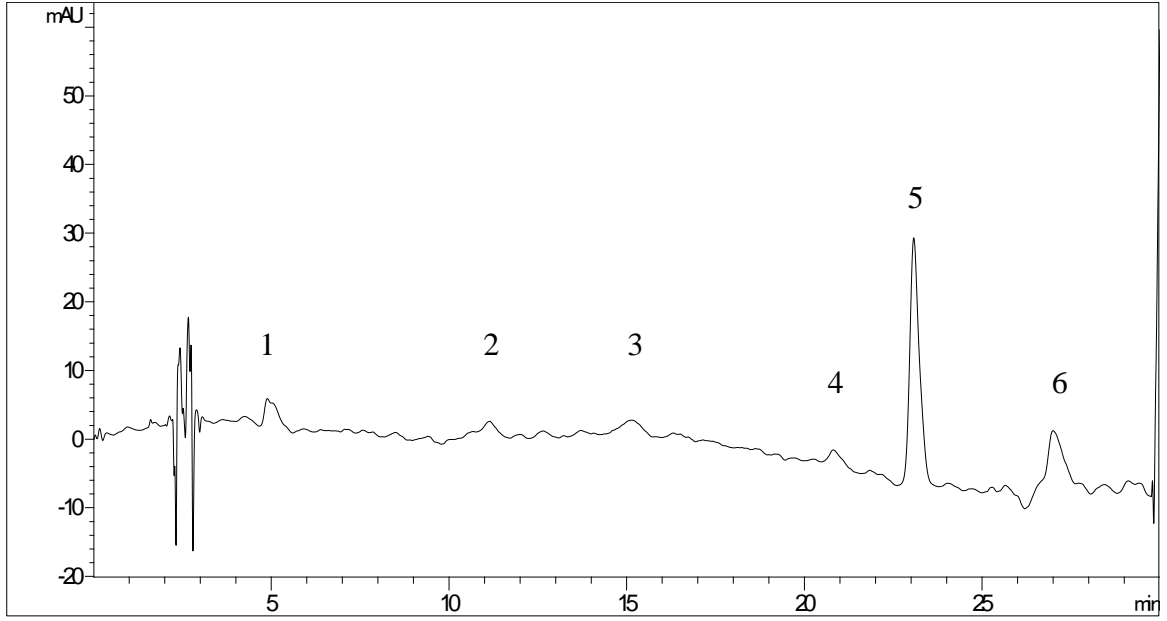


Şekil 28. KS-12 hatının 280 nm’ deki kromatogramı

Tablo 18. KS-12 hatında tespit edilen fenolik bileşikler

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT, dak.)	Pik alanı (mAUxdak)	Pik yüksekliği (mAU)
1	Gallik asit	3.572	307.4	14.1
2	*	4.878	658.1	33.0
3	*	6.324	140.6	7.4
4	*	7.909	334.7	8.8
5	*	11.199	336.5	10.1
6	*	15.300	2172.7	53.7
7	Ferulik asit	20.930	547.9	18.4
8	*	23.183	1275.3	61.8
9	*	27.162	766.1	25.5

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

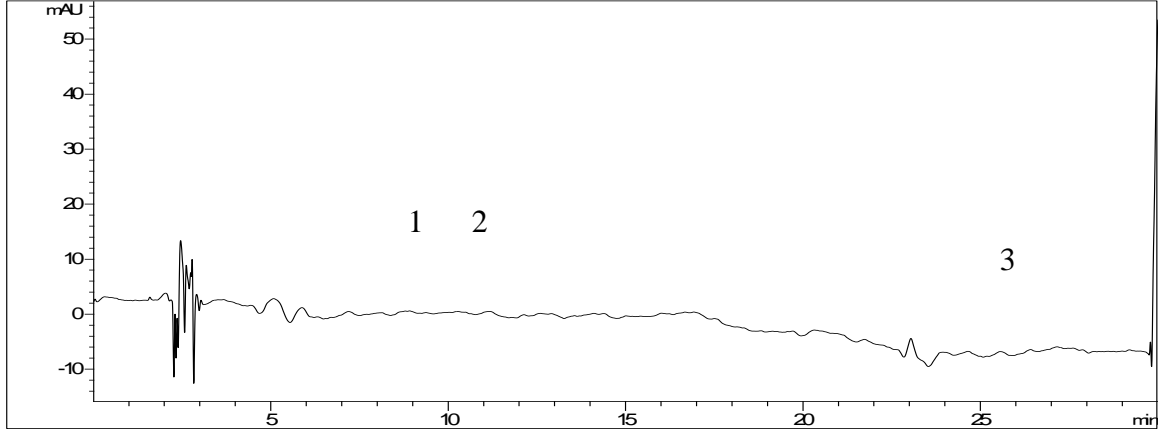


Şekil 29. KS-13 hatının 280 nm' deki kromatogramı

Tablo 19. KS-13 hatında tespit edilen fenolik bileşikler

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT, dak.)	Pik alanı (mAUxdak)	Pik yüksekliği (mAU)
1	*	4.885	87.4	4.1
2	*	11.138	40.5	1.8
3	*	15.134	68.8	2
4	Ferulik asit	20.806	56.2	2.2
5	*	23.074	678.3	36.1
6	*	26.993	447.8	10.5

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

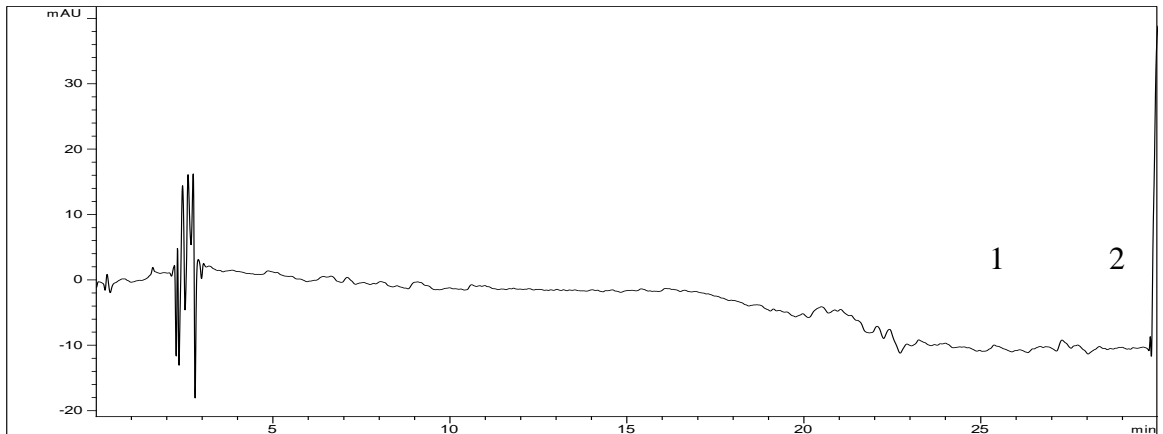


Şekil 30. KS-14 hatının 280 nm' deki kromatogramı

Tablo 20. KS-14 hatında tespit edilen fenolik bileşikler

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT, dak.)	Pik alanı (mAUxdak)	Pik yüksekliği (mAU)
1	*	5.077	99.7	3.5
2	*	5.877	57.4	2.5
3	*	23.04	57.5	3.9

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

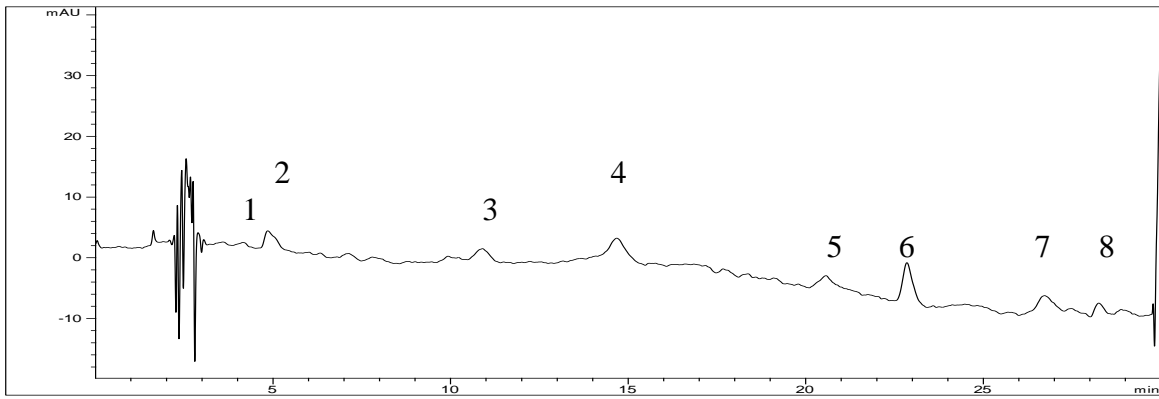


Şekil 31. KS-15 hatının 280 nm' deki kromatogramı

Tablo 21. KS-15 hatında tespit edilen fenolik bileşikler

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT, dak.)	Pik alanı (mAUxdak)	Pik yüksekliği (mAU)
1	*	22.437	43.5	2.4
2	*	27.29	17.8	1.4

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



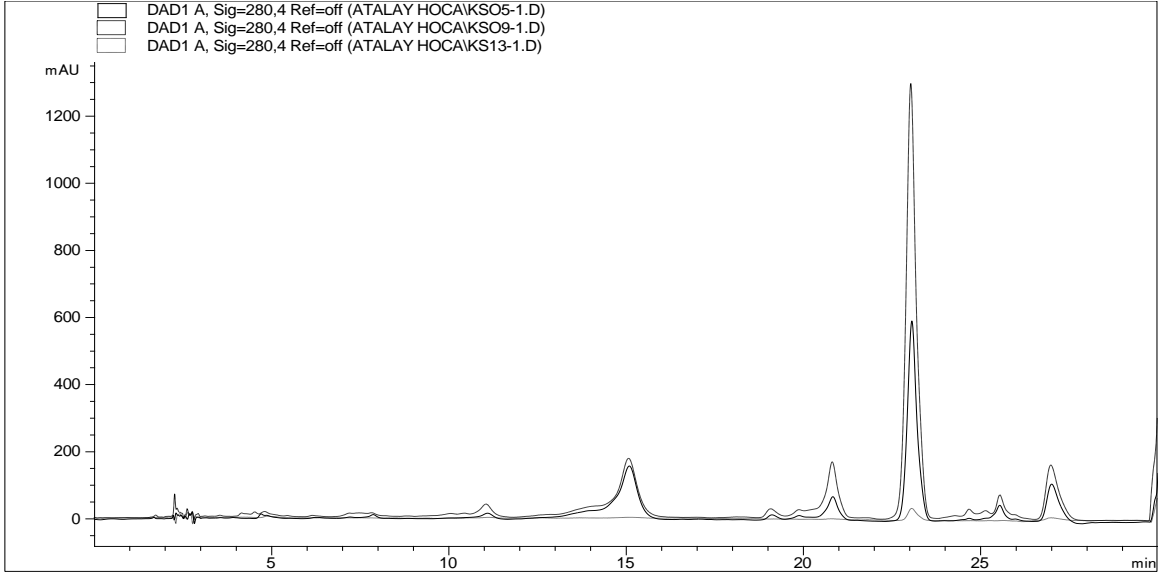
Şekil 32. KS-16 hatının 280 nm' deki kromatogramı

Tablo 22. KS-16 hatında tespit edilen fenolik bileşikler

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (RT, dak.)	Pik alanı (mAUxdak)	Pik yüksekliği (mAU)
1	Gallik asit	3.601	109.1	10.7
2	*	4.849	65.4	3
3	*	10.896	50.5	2
4	*	14.674	106.9	3.5
5	Ferulik asit	20.567	54.3	2
6	*	22.845	133.2	6.7
7	*	26.725	66	2.5
8	*	28.247	32.3	2

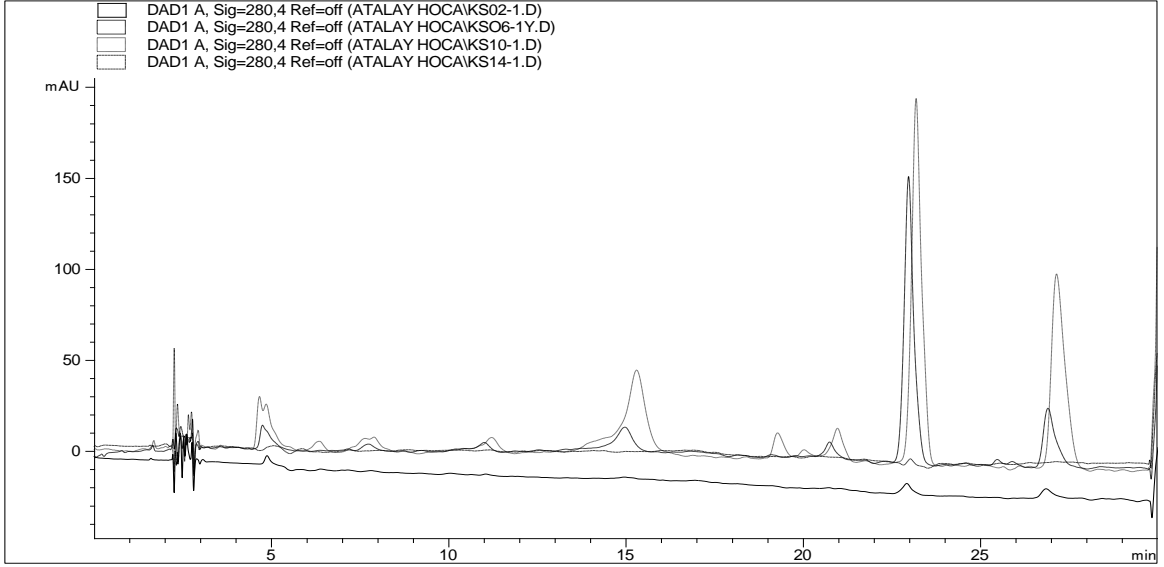
(*Boş bırakılan yerler "Bilinmeyen" dir. DAD spektrumları standart fenolik bileşiklere uymamaktadır)

Analiz sonuçlarının karşılaştırılmalı değerlendirilmesi için öncelikle aynı hormonun kullanıldığı fakat farklı derişimlerde uygulamanın yapıldığı kültürlerden elde edilen ekstraktların kromatogramları karşılaştırılarak incelendi. Bu amaçla Şekil 33'te kinetin uygulanan KS-5, KS-9 ve KS-13 kromatogramları birlikte; Şekil 34'de BAP uygulanan KS-2, KS-6, KS-10 ve KS-14 kromatogramları birlikte; Şekil 35'de TDZ uygulanan KS-7, KS-11 ve KS-15 kromatogramları birlikte ve Şekil 36'da zeatin uygulanan KS-4, KS-8, KS-12 ve KS-16 kromatogramları birlikte karşılaştırılarak verilmiştir.



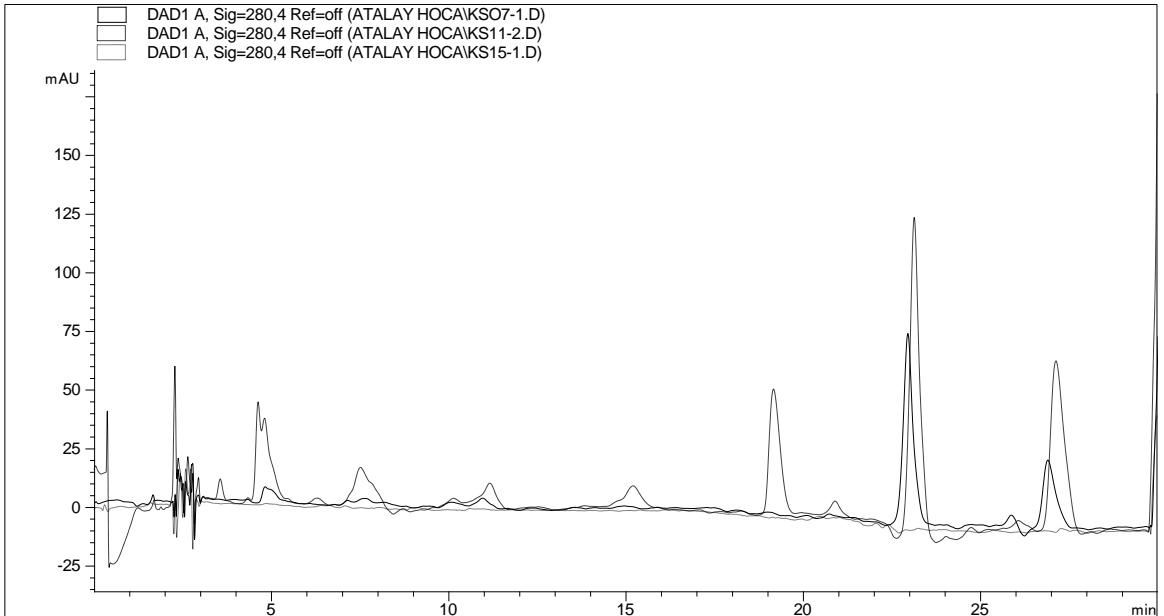
Şekil 33. Farklı miktarda kinetin uygulanan KS5-KS9-KS13 hatlarının karşılaştırılmış kromatogramları

Kinetinin farklı derişimlerde uygulandığı kültürlerden elde edilen ekstraktlarda uygulanan yöntemle tespit edilebilen fenolik bileşenlerin miktarı en fazla sırasıyla KS-9 ve KS-5'te gözlenmiştir. Diğer iki uygulamada düşük verim elde edildi.



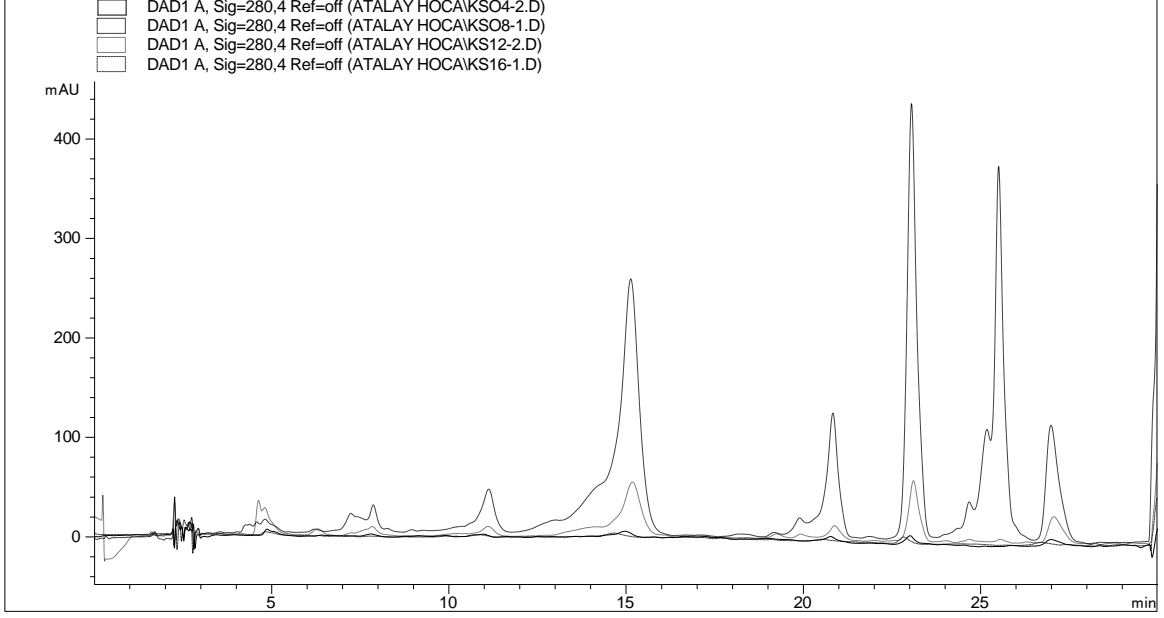
Şekil 34. Farklı miktarda BAP uygulanan KS2-KS6-KS10-KS14 hatlarının karşılaştırılmış kromatogramları.

BAP 'nın farklı derişimlerde uygulandığı kültürlerden elde edilen ekstraktlarda uygulanan yöntemle tespit edilebilen fenolik bileşiklerin miktarı en fazla sırasıyla KS-10 ve KS-6'da gözlemlendi. Diğer iki uygulamada düşük verim elde edildi.



Şekil 35. Farklı miktarda TDZ uygulanan KS7-KS11-KS15 hatlarının karşılaştırılmış kromatogramları.

TDZ'nin farklı derişimlerde uygulandığı kùltùrlerden elde edilen ekstraktlarda uygulanan yöntemle tespit edilebilen fenolik bileşiklerin miktarı en fazla sırasıyla KS-11 ve KS-7'de gözlemlendi. Diğer iki uygulamada düşük verim elde edildi.

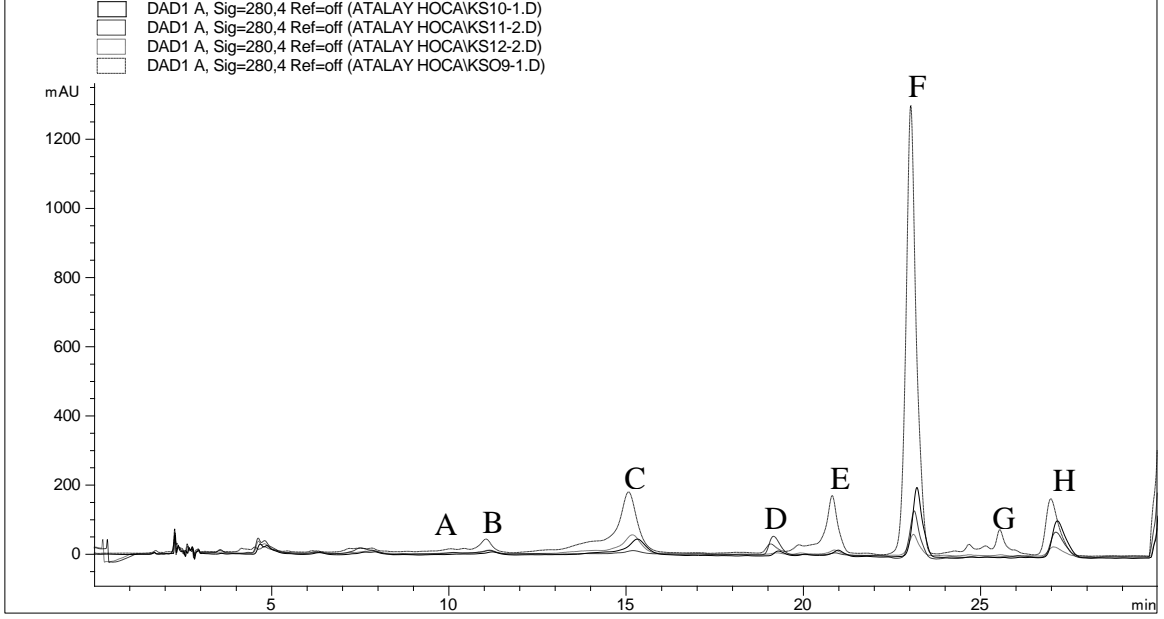


Şekil 36. Farklı miktarda zeatin uygulanan KS4-KS8-KS12-KS16 hatlarının çakıştırılmış kromatogramları.

Zeatin'nin farklı derişimlerde uygulandığı kùltùrlerden elde edilen ekstraktlarda uygulanan yöntemle tespit edilebilen fenolik bileşiklerin miktarı en fazla sırasıyla KS-8 ve KS-12'de gözlemlendi. Diğer iki uygulamada düşük verim elde edildi.

Bu karşılaştırmalı değerlendirme kinetin, BAP ve TDZ uygulamalarında 1,5 mg'lık, zeatin uygulamasında ise 1 mg'lık dozun en yüksek fenolik kompozisyon oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Kullanılan hormonların tamamında derişim 1,5 mg'ın üzerine çıkıldığında fenolik miktarlarında çarpıcı seviyede azalma görüldü

Eşit derişimlerde hormon uygulamalarının *L. angustifolia* fenolik kompozisyonuna etkisini karşılaştırmalı değerlendirebilmek için genelde yüksek verim elde edilen 1,5 mg'lık dozlarla elde edilen ürünlerin kromatogramları Şekil 37'de çakıştırılarak verildi. Numunelerde ortak görülen piklerin de pik alanlarına bakılarak miktar sıralaması Tablo 23'te verildi.

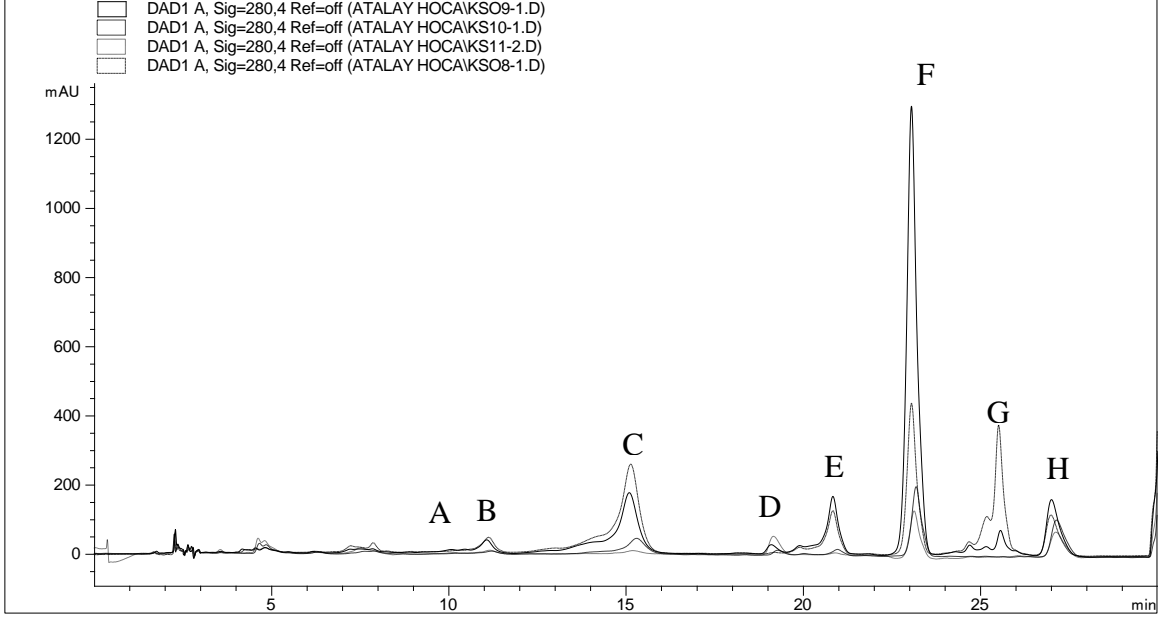


Şekil 37. 1,5 mg dört farklı hormonun uygulandığı KS9-KS10-KS11-KS12 hatlarının çakıştırılmış kromatogramları.

Tablo 23. KS9-KS10-KS11-KS12 hatlarının ortak olan A-H bileşenlerinin numunelere göre sıralaması

Pik	Bileşik adı	RT	Büyükten küçüğe sıralama
A		10:03	KS9 > KS 10 = KS 11 = KS 12
B	Klorojenik asit	11:10	KS 9 > KS 12 > KS 11 > KS 10
C		15:20	KS 9 > KS 12 > KS 10 > KS 11
D		19:15	KS 11 > KS 9 > KS 10 > KS 12
E	Ferulik asit	20:85	KS 9 > KS 10 > KS 12 > KS 11
F		23:10	KS 9 > KS 10 > KS 11 > KS 12
G	Rozmarinik asit	25:52	KS 9 > KS 12 > KS 10 = KS 11
H		27:10	KS 9 > KS 10 > KS 11 > KS 12

Çalışmada gözlemlenmiş bileşenlerin genel olarak 1,5 mg kinetin uygulamasında en yüksek oranda olduğu, diğer 1,5 mg uygulanan hormonlar açısından sıralamanın farklı bileşenlerde farklılık gösterdiği görülmektedir.



Şekil 38. En yüksek fenolik verimin elde edildiği dört farklı hormonun uygulandığı KS9-KS10-KS11-KS8 hatlarının çakıştırılmış kromatogramları.

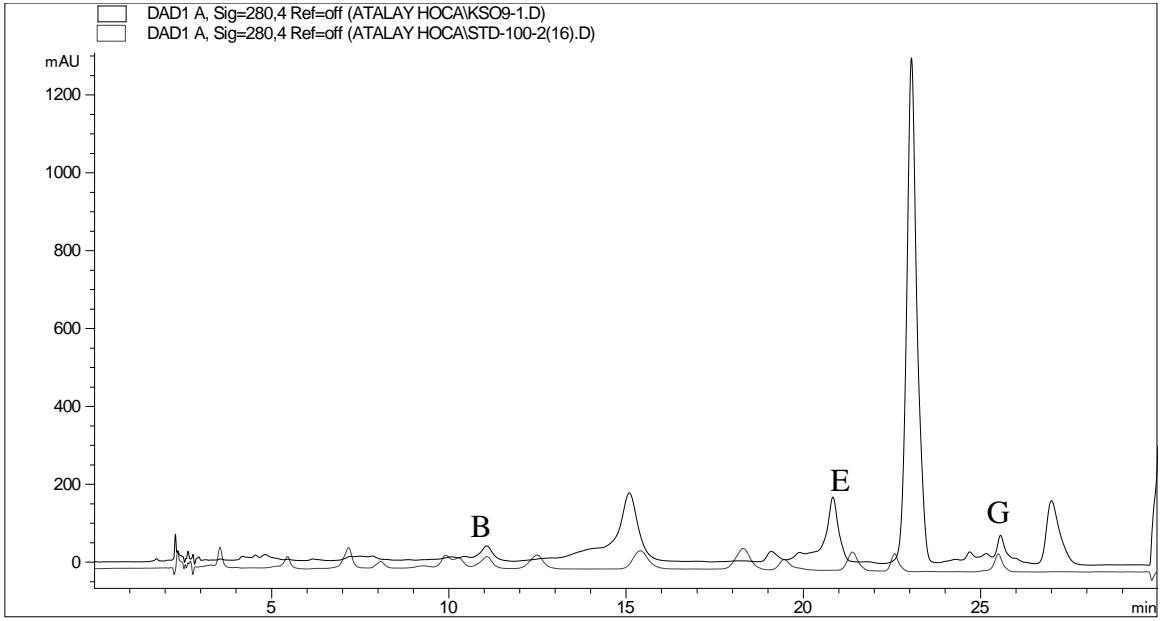
Tablo 24. KS9-KS10-KS11-KS8 hatlarının ortak olan A-H bileşenlerinin numunelere göre sıralaması

Pik	Bileşik adı	RT	Büyükten küçüğe sıralama
A		10:03	KS9 > KS 10 = KS 11 = KS 12
B	Klorojenik asit	11:10	KS 8 > KS 9 > KS 11 > KS 10
C		15:20	KS 8 > KS 9 > KS 10 > KS 11
D		19:15	KS 11 > KS 9 > KS 10 > KS 8
E	Ferulik asit	20:85	KS 9 > KS 8 > KS 10 > KS 11
F		23:10	KS 9 > KS 8 > KS 10 > KS 11
G	Rozmarinik asit	25:52	KS 8 > KS 9 > KS 10 = KS 11
H		27:10	KS 9 > KS 8 > KS 10 > KS 11

Hormonla en yüksek oranda bileşen oluşumu kinetin, BAP ve TDZ için 1,5 mg dozda (KS-9, KS-10, KS-11), zeatin için 1,0 mg dozda (KS-8) gerçekleştirildi. Bu dört numune değerlendirildiğinde 1,5 mg kinetin uygulaması daha çok oranda birinci sırayı, sonra 1,0 mg zeatin uygulaması ikinci sırayı almaktadır. Klorojenik asit ve rozmarinik asit 1,0 mg zeatin uygulandığında (KS-8) en yüksek seviyeye çıkmış, ferulik asit ise 1,5 mg kinetin uygulamasında en yüksek seviyeye çıktı. BAP ve TDZ hormonlarının etkileri düşük oldu.

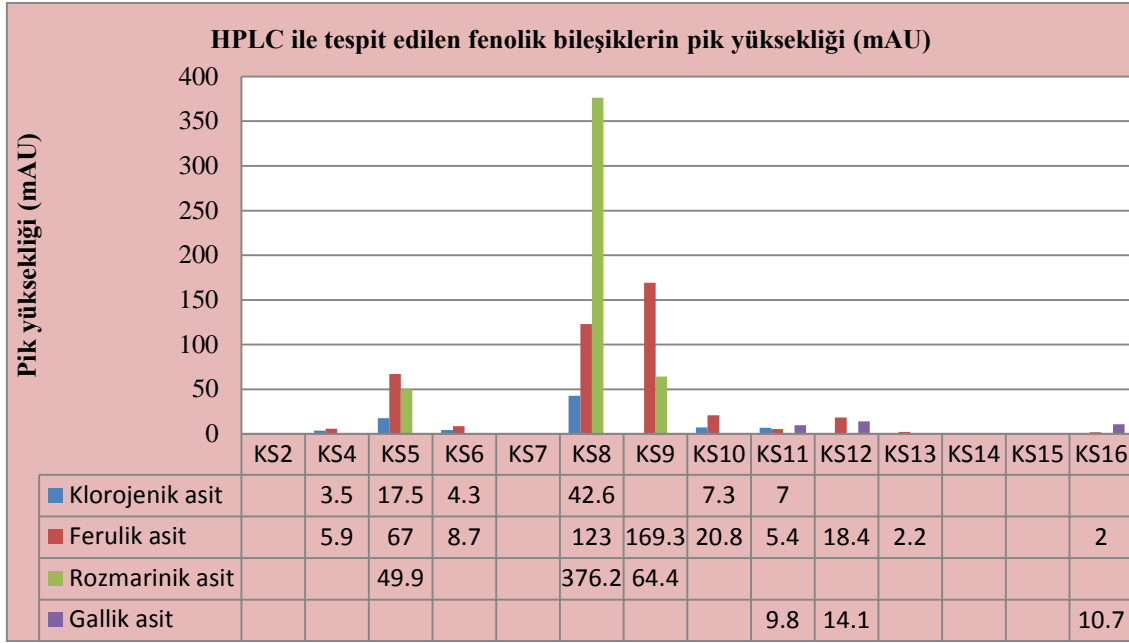
F pikini veren bileşen, aromatik halkada trisubstitue benzaldehit türü bileşiklerin spektrumuyla örtüşen bir spektruma sahiptir. Çalışılan standartlar arasında bu yapıya sahip bileşikler protokatekualdehit ve vanilindir, ancak F bileşiğinin alıkonma zamanı bu bileşiklerle uyuşmamaktadır.

Lavanta numunelerdeki bileşenlerin tanımlanması amacıyla kullanılan alıkonma zamanı örtüşmesinin görülebilmesi için 100 µM konsantrasyonda bütün standartları içeren karışımla KS-9 klonun kromatogramları karşılaştırıldı. (Şekil 39).



Şekil 39. En yüksek fenolik verimin elde edildiği KS-9 numunesi ve 100 µM'lık standart karışımının karşılaştırılmış kromatogramları.

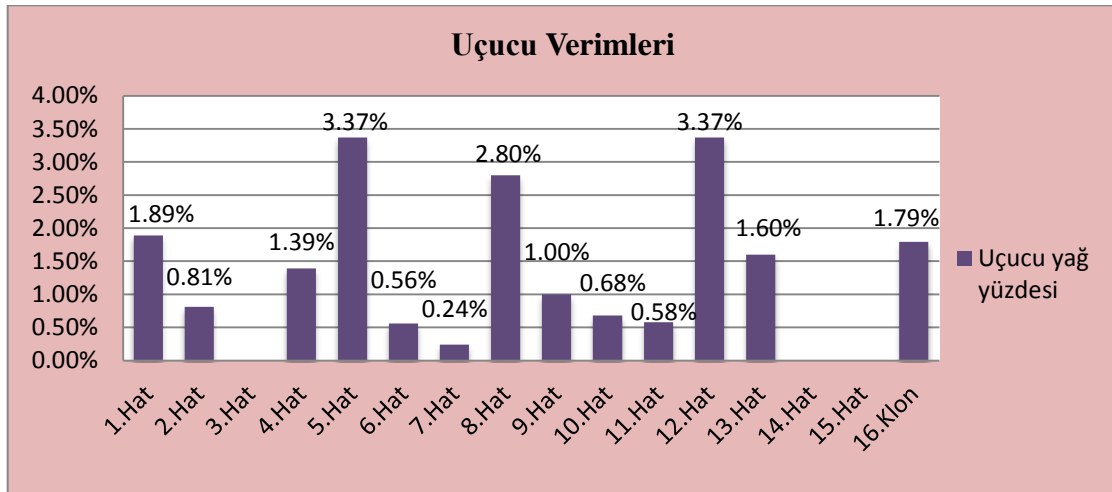
- Sadece B (klorojenik asit), E (ferulik asit) ve G (rozmarinik asit) pikleri hem RT değerleri, hem de spektrumları örtüşmesi nedeniyle belirlenebildi.
- Alıkonma zamanları 15:20, 23:10 ve 27:10 dakikalarda olan major bileşenlerin hangi bileşik oldukları belirlenemedi.



Şekil 40. HPLC ile tespit edilen fenolik bileşiklerin pik yükseklikleri

3.4.2. Kuru Bitki Örneklerinden Elde Edilen Uçucu Yağ Verimleri

L. angustifolia bitkisinin 16 farklı hatından elde edilen fideler 1 gün kurutma kağıdında oda sıcaklığında bekletildikten sonra sürgün örnekleri alınarak, etileter ve tetradekan karışımı ile uçucu yağ elde edildi. Uçucu yağ verimleri Tablo 13' de gösterildi.



Şekil 41. *In vitro* da oluşan fidelerin uçucu yağ verimleri

*3. Hatta gelişim görülmedi

**14-15. Hatlarda kallus oluşumu yüksek olduğu için uçucu yağ verimine bakılmadı

Tablo 25. Uçucu yağ verimleri

Numuneler	Besi Ortamı	Kuru Bitki Örneği (g)	Verim (g)	Yüzde
1.Hat	KS-1	1,1470	0,0217	% 1,89
2.Hat	KS-2	1,4800	0,0121	%0,81
3.Hat	KS-3	-	-	-
4.Hat	KS-4	0,7053	0,0092	% 1,39
5.Hat	KS-5	0,7582	0,0256	% 3,37
6.Hat	KS-6	5,0163	0,0281	%0,56
7.Hat	KS-7	5,0820	0,0124	%0,24
8. Hat	KS-8	2,2565	0,0634	% 2,80
9. Hat	KS-9	1,7999	0,0181	% 1,00
10.Hat	KS-10	3,6650	0,0225	%0,68
11.Hat	KS-11	2,4357	0,0143	%0,58
12.Hat	KS-12	0,6660	0,0225	% 3,37
13.Hat	KS-13	1,2802	0,0206	% 1,60
14.Hat	KS-14	5,4190(kallus+bitki)	-	-
15.Hat	KS-15	-	-	-
16.Hat	KS-16	1,8090	0,0324	% 1,79

* 14. ve 15. Klonlar da kallus oluşumu yüksek olduğu için uçucu yağ verimine bakılmadı

4. TARTIŞMA

İnsanların beslenmesi yönünden önem taşıyan bitkilerin, verimini, hastalık ve zararlılara karşı dirençlerinin arttırmak amacı ile gerçekleştirilen klasik ıslah metodlarının yanı sıra günümüzde doku kültürü ve biyoteknoloji sayesinde her yönü ile istenen özelliklere sahip bitki türlerinin eldesi çok daha kısa sürelerde ve kontrollü koşullarda elde edilerek bu bitkilerin doğa koşullarına uygun hale getirilmesi artık alışılan bir durum haline gelmek üzeredir. Biyoteknolojik metodlar, insan ve hayvanlarda olduğu gibi, bitkilerde de oldukça geniş bir uygulama alanına sahiptir. Çeşitli yöntemler bitkiler üzerinde denenmekte ve her gün yeni gelişmeler elde edilmektedir.

Son yıllarda ilaç, kozmetik, parfümeri ve gıda olarak kullanılan ve ihracatta önemli payları olan tıbbi ve aromatik bitkilerin tarımı Türkiye de giderek yaygınlaşmaktadır. Alternatif olarak doku kültürü teknikleri kullanılarak bitki üretilmesi (mikroçoğaltım), bir çok bitki türünde olduğu gibi tıbbi ve aromatik bitkilerin de vejetatif olarak hızlı ve çok miktarda çoğaltılabilmesine olanak sağlayan bir üretim şeklidir (Hardman and Kester, 1975; Mansuroğlu ve Gürel, 2001). Ayrıca kısa sürede sağlıklı ve çok sayıda bitki materyali elde edilmesi, geleneksel yöntemlerle kolay çoğaltılamayan bitkilerin çoğaltılması, üretilen bitkilerde fenotipik ve genotipik benzerlik, yıl boyu üretim yapılabilmesini sağlar (Hutchinson ve Zimmerhan, 1987; Gahan ve George, 2008).

Farklı lavanta tür ve çeşitlerinin *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım olanakları araştırılmış (Andrade vd., 1999; Nogueria ve Romano, 2002; Echeverrigaray vd., 2005), bu araştırmalarda *in vivo* koşullarda vejetatif olarak çoğaltılamayan tür ve çeşitler için ancak *in vitro* mikroçoğaltımın ekonomik olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca *Lavandula* türlerinin tohum ve odunsu gövde çelikleri ile çoğaltımı oldukça yavaştır ve çeliklerin köklenme oranları düşüktür. Bu nedenle vejetatif çoğaltıma alternatif olarak koltuk altı tomurcukları ile mikroçoğaltım önerilmiştir (Andrade vd., 1999).

Bu tez kapsamında, , insanlar arasında güçlü bir aromatik ve tıbbi bitki olarak bilinen *L. angustifolia* bitkisinin *in vitro*'da gelişim olanakları araştırıldı. *In vitro* koşullarda çimlenmenin ardından sürgün oluşumunu teşvik etmek amacıyla kültüre alınan sürgün ucu eksplantları üzerinde yapılan çalışmalarda organogenez oluşumları görüldü. Sürgün ortamında oluşan 16 farklı hatının büyüme parametreleri kaydedildi. Ayrıca *in vitro* da oluşturulan 16 hatın ekonomik değeri yüksek olan fenolik bileşikleri araştırıldı ve HPLC

ile bazı spesifik fenolik bileşikler analiz edildi ve aynı zamanda ekonomik değeri yüksek olan ticari amaçlı kullanılan uçucu yağların verimleri tespit edildi.

Canlılık testi denemelerinde TZ testi (Patıl ve Malavika, 1968) uygulanmış tohumlardaki canlılık oranı; a) steril edilmeyen normal tohumlarda % 64, b) H₂O₂ ile steril edilen tohumlarda ise % 84 olduğu tespit edildi. Tohumlar sterilizasyon çözeltisinde daha uzun süre bekletildiklerinden dolayı tohum kabukları eriyerek uzaklaştı. Bunun sonucunda çözelti, eriyen tohum kabuğu sayesinde daha iyi tohumla etkileşime girerek renk oluşumuna sebep oldu ve canlı dokuların sayımında daha sağlıklı sonuçlar elde edildi.

TZ testi hali hazırda hızlı, kesin sonuç veren ve canlı dokuya zarar vermeyen (çimlenmeyi etkilemeyen) avantajlarının olmasının yanı sıra; dormant (uykuda)-non dormant ayırımının yapılamaması, çimlenen tohumlardan oluşan fidelerin normal veya anormal olma durumlarının önceden bilinmemesi, mikroorganizmalarca enfekte edilen tohumların çimlenip sağlıklı fideleri oluşturma ihtimalinin olması gibi dezavantajları da vardır.

Bitki tohumlarını steril etmek için 2 farklı sterilizasyon yöntemi kullanıldı. Önce dH₂O 1:4 çamaşır suyu çözeltisi (bölüm 2.2.5.1.) kullanıldı. Hızlı ve basit bir yöntem olmasına rağmen kontaminasyon oranının (% 50) yüksek olması başka bir yöntemin denenmesine sebep oldu. Diğer bir yöntem olan H₂O₂ kullanarak yapılan sterilizasyonda (bölüm.2.2.5.2.) kontaminasyon riskinin (% 15) yaklaşık 3 kat azalttığı tespit edildi. Tohumlar sterilizasyon çözeltisinde daha uzun süre bekletildiklerinden tohum kabukları eriyerek uzaklaşmıştı ve bu tohumlar kültür ortamında daha hızlı çimlendi. H₂O₂ kullanarak yapılan bu sterilizasyon yönteminin iyi sonuç vermesi avantaj olarak göze çarparken, yaklaşık 12,5 saat (12 saat dH₂O 1:20 sukroz çözeltisinde, 30 dk. H₂O₂'da) kadar süre alması dezavantaj olarak görülmektedir.

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

L. angustifolia bitkisinin tohumları iki farklı deneme uygulanarak çimlendirildi. Bitki büyüme düzenleyicisi kullanmadan yapılan deneme MS-1 besi ortamında çimlenme oranı % 50 iken bitki büyüme düzenleyicisi olarak 0,5 mg/L NAA kullanılan MS ortamında yapılan denemede ise çimlenme oranı %65 olduğu tespit edildi. Areej (2007) *L. angustifolia* ve *L. latifolia*'da *in vitro* mikroçoğaltımı üzerine yaptığı çalışmada benzer sonuçlar elde edildi. 0,5 mg/l NAA içeren MS besi ortamında çimlenme yüzdelerini sırasıyla %72 ve % 78 olarak kayıt etmişlerdir. Sonuç olarak bizim yaptığımız denemede en iyi çimlenme ortamının MS-2 olduğu literatürle desteklenmektedir. Ayrıca MS-2 ortamında yapılan gözlemler doğrultusunda kök oluşumunun ve sürgün gelişiminin daha yüksek olduğu görüldü. MS-2 ortamında yaprak oluşumları daha büyük, parlak ve daha sık nodlu yapılara rastlanıldı. Çimlendirmenin ardından aktarılan sürgün gelişimi ortamında hem kök gelişimini teşvik etmiş hemde sürgün gelişimi daha iyi olduğu tespit edildi.

Bitki dokularında organ farklılaşmasında oksin ve sitokinin önemli rol oynamaktadır. Bilindiği gibi sitokin/oksin oranının yüksek olması sürgün oluşumunu düşük olması ise kök oluşumunu desteklemektedir. (Webrouck ve Debergh, 1994). Literatüre göre *Lavandula* türleri için en uygun besi ortamının MS olduğu rapor edildi.(Jordan vd.,1998; Sanchez-Gras ve Calvo, 1994; Panizza, ve Tognoni 1988; Grosso. Jordan vd.,1998) Bu verilere dayalı olarak *L. angustifolia* için sürgün gelişimi ortamlarında MS besi ortamı kullanıldı. Araştırmamızda *in vitro* koşullarda oluşan çim fidelerden elde edilen sürgün ucu eksplantlarının farklı ortamlardaki büyüme parametrelerinin karşılaştırılması için farklı derişimlerde BBD içeren 16 MS ortamı kullanıldı. Çalışmamızda sürgün gelişimini teşvik etmek için sitokin olarak kinetin, BAP, TDZ ve zeatin 'nin farklı derişimleri ve oksin olarakta bütün ortamlarda stabil oranda NAA kullanıldı. Literatür verilerine göre BAP çok sık kullanılan ve genellikle olumlu sonuçlar veren bir sitokinidir. Genel olarak 1.0-2.0 sitkinin çoğu sisteme yeterlidir. IAA ortamda çok az stabil olduğundan, sentetik oksinlerden NAA tercih edilmektedir. Bunların sürgün çoğaltım aşamasında kullanılan oranları 0.1-1.0 mg/L'dir (Skoog ve Miller,1957; Werbrouck ve Debergh, 1994).

Farklı büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda kültüre alınan eksplantlarda kültür başlangıcından 8 hafta sonra bitki rejenerasyonu gözlemlenerek, somatik dokulardaki değişiklikler kaydedildi. Elde edilen verilere göre, büyüme parametresi olarak ele alınan ortalama boy uzunluğu, ortalama sürgün sayısı ve ağırlığı, ortalama nod sayısı, kök oluşumu ve kallus oluşturan eksplantların ortamlara göre farklılık göstermiştir.

Sürgün gelişimi için yapılan denemelerde BBD' nin farklı derişimlerini dikkate alırsak: uygulamamız arasında kinetin ile yapılan çalışmalarda olumlu sonuçlar elde edildi. Kinetinin de yine farklı derişimleri kullanılmış ve elde edilen sonuçlara göre en verimli ortamın 1 mg/L kinetin + 0,05 mg/ L NAA ile 1,5 mg/L kinetin + 0,05 mg/L NAA içeren MS besi ortamında görüldü. Diğer BBD ile kıyaslandığında en uzun bitki boyu 1,5 mg/L kinetin + 0,05 mg/L NAA içeren MS besi ortamında elde edildi. Areej (2007) *L. angustifolia* ve *L. latifolia*'da *in vitro* mikroçoğaltımı üzerine yaptığı araştırmada, *L. angustifolia*' nın boğum arası eksplantından 0.05 mg/L NAA ve 1.5 mg/l Kinetin MS besin ortamında en uzun sürgün boyuna sahip olduğu rapor edildi. Kinetin ve zeatin içeren tüm MS ortamlarında BAP ve TDZ' ye göre bitki boyununun daha uzun olduğu görüldü. Literatüre göre kinetin ile yapılan çalışmalarda verimin konsantrasyon artışına paralel olarak düştüğü ve çoğunlukla kallus oluştuğu gözlemlendi. Yine kinetin konsantrasyonu arttıkça adventif sürgün patlamasının azalması genotip veya dolaylı olarak kinetin sürgün oluşum sürecindeki bazı metabolik yolları baskılamış olabileceği akla getirmektedir (Kadıoğlu, 2004).

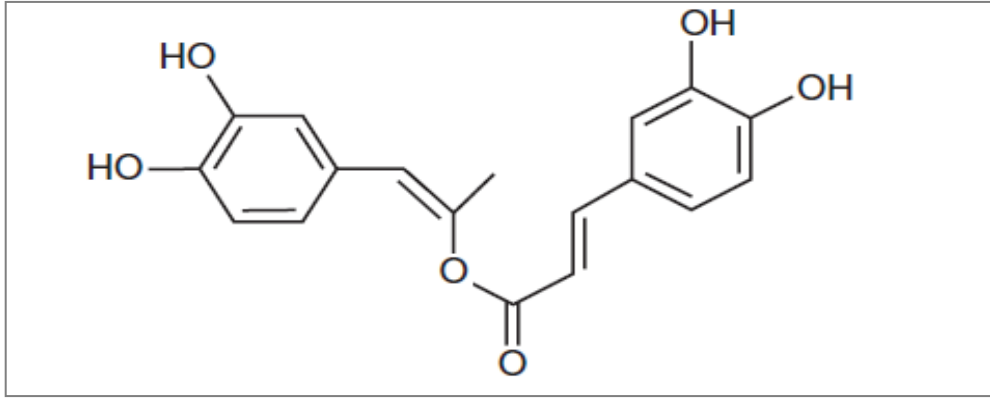
En iyi çoklu sürgün oluşumu BAP'ın farklı derişimlerinde görüldüğü tespit edildi. BAP içeren MS ortamlarında en iyi sürgün gelişimi 1 mg/L BAP + 0,05 mg/L NAA ve 2 mg/L BAP + 0,05 mg/L NAA içeren ortamlarda gerçekleşti. BAP' ın farklı derişimlerinde kök oluşumları kısmen görüldü ve hormon miktarı arttıkça bununla birlikte sürgün ortamında kalus oluşum yüzdesi de arttı. Literatür verilerine dayalı olarak aynı şekilde Chishti vd. (2006) *L. angustifolia* türüne ait sürgün ucu eksplantlarının 2.0 mg/L BAP içeren besi ortamında çok sayıda sürgün verdiklerini gözlemişler, 2.0 mg/L BAP içeren MS ortamında yüksek oranlarda köklenme sağlamışlardır.

Araştırmamızda TDZ 'nin farklı derişimleri ile yapılan çalışmalarda daha kısa fideler ve çoklu sürgünler oluştu. Debnath (2005), sitokinin olarak bilinen ve aynı zamanda oksine benzer etki gösteren thidiazuron'un üzümde, kivide, pek çok odunsu bitkide rejenerasyonu başarılı bir şekilde sağladığı, ancak TDZ'nin birçok odunsu bitkide sürgün uzamasını engellediği belirlenmiştir. TDZ'nin 0,5 mg/L TDZ + 0,05 mg L NAA içeren ortamında gelişim görülmedi. Bitki büyüme düzenleyicileri gereğinden fazla veya az kullanılmaları halinde bitkilerin gelişmesini olumsuz yönde etkilemektedir. En iyi sürgün gelişimi 1 mg/L TDZ + 0,05 mg/L NAA içeren MS ortamlarında gözlemlendi. BAP'a benzer şekilde hormon miktarının artmasıyla kallus oluşum kapasiteside arttığı görüldü. BAP'a benzer şekilde çoklu sürgün oluşumu ve en ağır sürgün oluşumuna sebep olduğu görüldü

(Andrade vd., 1999). *L. angustifolia*'nın *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımı üzerine büyüme düzenleyicilerin etkisini araştırmak için yaptıkları araştırmada eksplant olarak boğum parçaları kullanmışlardır. En yüksek sürgün gelişiminin TDZ (2.25 µM) ve BA (2 µM) içeren MS ortamında tespit etmişlerdir. TDZ içeren ortamlarda kök oluşumuna rastlanılmadı.

Zeatin için ise en iyi sürgün gelişimi 1 mg/L zeatin + 0,05 mg/L NAA içeren MS ortamlarında tespit edildi. Kinetine benzer şekilde daha uzun boylu fideler ve 2-3'lü yada tekli sürgünler görüldü.

Kallus oluşumunun görüldüğü bazı sürgün ortamlarında besi yerinde mavi renk oluşumuna rastlanıldı (Şekil.17) Literatüre göre *L. angustifolia* 'nın kallus kültürlerinde kafeik asit izomeri olan 2-(3,4-dihidroksifenil)etenil, besi ortamında mavi pigment oluşumuna sebep olduğu belirtilmektedir (Banthorpe vd.,1985).



Şekil 42. Kallus oluşan eksplantlarda ki mavi pigment oluşumuna sebep olan; bileşik kafeik asit izomeri 2-(3,4-dihidroksifenil) etenil ester

Elde edilen bulgulara göre, büyüme parametresi olarak ele alınan ortalama boy uzunluğu, ortalama sürgün ağırlığı, ortalama sürgün sayısı ve kallus oluşturan eksplantlar ortamlara göre farklılık gösterdi. *In vitro* koşullarında lavantanın mikroçoğaltımı üzerine yapılan araştırmamızda kullanılan değişik besin ortamlarında farklı veriler elde edildi.

Bölüm 3.4.1' de *L. angustifolia*'nın HPLC yöntemiyle belirlenen fenolik bileşiklerinin türleri ve nicel miktarları verildi. Şekil 38' deki veriler göz önüne alındığında *L. angustifolia*'nın 14 farklı hatında 4 değişik fenolik bileşik tespit edildi. Bunlar; klorojenik asit, ferulik asit, rozmarinik asit ve gallik asitir.

L. angustifolia'nın *in vitro* da oluşturulan fidelerden analiz edilen bu fenolik bileşikler insanoğlunun yaşamında önem taşımaktadır. Örneğin gallik asit; anti mantar, antioksidan ve anti viral etkiye sahip olan gallik asit, hidroliz olabilen tanenlerden elde edilen, tıp ve eczacılıktan boya, kimya ve besin endüstrilerine kadar çok geniş bir alanda çeşitli amaçlarla kullanılan bir organik asittir. Gallik asitin antioksidan etkiye sahip olması, bu maddeyi içeren bitkileri değerli kılmaktadır (URL5).

Rozmarinik asit antioksidan, antimikrobiyal ve iltihap kurutucu etkilere sahiptir. Anti oksidan etkisi E vitamininden daha kuvvetlidir. Damar tıkanıklığı ve kanser riskini azaltır. Rozmarinik asit aynı zamanda gıdaların bozulmasını önlemek amacıyla da kullanılmaktadır (URL6).

Ferulik asit ise hücre duvarına ve DNA ya zarar veren süperoksit, nitrik oksit ve hidroksil radikali gibi serbest radikalleri etkisiz hale getiren bir antioksidandır. Bu özelliği ile gıda endüstrisinde önemli bir yere sahiptir (URL7).

Kinetinin farklı derişimlerde uygulandığı kültürlerden analiz edilen fenolik bileşiklerin miktarı en fazla KS-9 ortamında, BAP'ın ise KS-10 besi ortamında en yüksek miktarda fenolik bileşiğe rastlanıldı. TDZ'nin farklı derişimlerde uygulandığı kültürlerden analiz edilen fenolik bileşiklerin miktarı en fazla KS-11 besi ortamında zeatin için KS-8 besi ortamında en yüksek oranda fenolik bileşiklere rastlanıldı.

En yüksek oranda fenolik bileşik oluşumuna neden olan BBD; kinetin, BAP ve TDZ için 1,5 mg derişimlerinde (KS09, KS10, KS11), zeatin için 1,0 mg derişimlerinde (KS8) gerçekleşti. Bu dört örnek değerlendirildiğinde 1,5 mg kinetin uygulaması daha çok oranda birinci sırayı, sonra 1,0 mg zeatin uygulaması ikinci sırayı almaktadır. Klorojenik asit ve rozmarinik asit 1,0 mg zeatin uygulandığında (KS8) en yüksek seviyeye çıktı, ferulik asit ise 1,5 mg kinetin uygulamasında en yüksek seviyeye çıktığı tespit edildi. BAP ve TDZ hormonlarının etkileri daha düşük olduğu kaydedildi. *L. angustifolia*'nın sürgün ortamının tamamında kullanılan BBD'nin derişimleri 1,5 mg/L 'nin üstüne çıkıldığında fenolik bileşiklerin miktarlarında çarpıcı seviyede azalma görüldü.

14 hatında en fazla ferulik asit ve klorojenik asite rastlanıldı. *L. angustifolia*'nın özütlerinde en yüksek miktarda rozmarinik asit Ayrıca *L. angustifolia*'nın özütlerinde hemen hemen bütün ortamlarda yüksek miktarda göze çarpan bilinmeyen bir major bileşik görüldü.

Araştırmamızda doku kültürü ile sürgün ortamlarında yetiştirilen 16 farklı klondan elde edilen sürgünlerin uçucu yağ verimine bakıldı. 400 mL etileter ve 80 µL tetradekan bileşiği kullanılarak bir çözelti hazırlandı. Bu çözeltiden 3 tekrar olacak şekilde yaklaşık 15 mL alınarak, 1 gün kurutma kâğıdında bekletilen bitki örnekleri üzerine eklendi. Bu işlem sonucunda elde edilen en yüksek uçucu yağ verimi % 3,372 oranla 1 mg /L Kinetin + 0,05 mg/L NAA ve 1 mg/L zeatin + 0,05 mg/L NAA içeren MS besisi ortamından elde edildi. BAP ve TDZ nin yüksek derişimlerinde (2 mg/L) kallus oluşumu görüldüğü ve TDZ nin en düşük derişiminde (0,5 mg/L) gelişme olmadığı için uçucu yağ verimine bakılmadı. En düşük uçucu yağ verimi TDZ ve TDZ' yi izleyen BAP 'ın farklı derişimlerini içeren ortamlardan elde edildi.

Lavanta uçucu yağı, dünyada en fazla üretilen 15 uçucu yağdan birisidir. Chemat ve ark. (2006) lavander uçucu yağ verimi ve bileşenlerinin bitki kısımları, distilasyon zamanı ve ısı miktarına göre değiştiğini belirtmişlerdir. Wagner (1980) lavander uçucu yağ oranının en az % 1.5, Ceylan (1996) ise en az % 1 olması gerektiğini bildirmişlerdir. Ceylan ve ark. (1988) lavander uçucu yağ oranının % 1.3 - 3.1, Baytop (1999) ise % 0.5 - 1.0 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Arabacı ve Ceylan(1990) lavanderde en yüksek uçucu yağ oranını % 1.98 ile erken hasat döneminde yapılan damıtma ile elde etmişlerdir. Atalay (2008) kuru lavander çiçeğinde uçucu yağ oranını % 2.1 - 2.6, Arabacı ve Bayram (2005) % 1.5 – 2.3 arasında bulmuşlardır. Araştırmamızda *in vitro* koşullarda üretilen *L. angustifolia*' ya ait fidelerin uçucu yağ oranları, literatürlerde belirtilen doğada oluşan lavander çeşitlerinin uçucu yağ oranlarına benzer yada daha yüksek değerlerde olduğunu ve *in vitro* koşullarda altarnetif olarak üretilebileceğini gösterdi. En yüksek uçucu yağ verimleri kinetin ve zeatin içeren sürgün ortamlarında oluşan hatlardan elde edilerek ortalama % 1,4 - % 3,3 arasındaki değerlerde olduğu kaydedildi. Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular *in vitro* koşullarda *L. angustifolia*' nın daha yüksek değerlerde uçucu yağ verimlerinin üretilebileceğini göstermektedir. Literatür verilerine göre Zuzarte vd. (2010) *in vitro* tekniği ile çoğaltılan lavantanın (*Lavandula* spp.) uçucu yağının yüksek endüstriyel ve ticari değere sahip olduğunu belirtmektedirler. Çelikle çoğaltılmış *L. pedunculata*'nın uçucu yağının ana bileşeninin 1,8-sineol, kafur ve fenkon'den meydana geldiğini, *in vitro* teknikleri ile üretilen *L. pedunculata*'nın ise benzer şekilde 1,8- sineol, kafur ve fenkonden oluştuğunu bildirmişlerdir. Ancak uçucu yağ miktarının *in vitro* tekniği ile elde edilen bitkilerin lehine hafif farklılıkların oluştuğunu bildirmişlerdir. Gonçalves vd. (2008) araştırmada *in vitro* tekniği ile üretilen bitkiler ile çelikle çoğaltılan bitkilerin uçucu

yağ miktarlarını karşılaştırmışlar; *in vitro* metodu ile üretilen *L. viridis*'in bazı uçucu yağ bileşenlerini içeriği çelikle çoğaltımda daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

5. SONUÇ

L. angustifolia'nın tohumları iki farklı sterilizasyon yöntemine tabi tutulmuş ve en başarılı yöntemin H₂O₂ ile yapılan sterilizasyon yöntemi olduğu tespit edildi. Tüm çalışma boyunca tohumların sterilizasyonu % 85' lik başarı sağlanan bu yöntemle geliştirilen prosedürle yapıldı.

L. angustifolia bitkisinin tohumlarının canlılık testleri iki farklı uygulamadan sonra belirlendi. Bu uygulamalar sonucunda; a) hiçbir müdahaleye tabi tutulmadan TZ testi uygulanan tohumlarda % 64, b) Sterilizasyondan sonra TZ testine tabi tutulmuş tohumlarda ise % 84' lik canlılık tespit edildi.

L. angustifolia bitkisinin tohumlarının çimlendirilmesi için kurulan denemelerde 2 farklı yol denendi. a) NAA kullanılmadan yapılan çimlendirmede sonuçları MS-1 besi ortamında % 46 b) NAA kullanarak yapılan çimlendirme sonuçları ise MS-2 ortamında % 65 olarak en iyi ortam olduğu tespit edildi.

Sürgün oluşumunu ve gelişimini teşvik etmek için kurulan denemelerde % 2 sukroz içeren MS besi ortamında, sitokinin olarak kinetin, BAP, TDZ ve zeatin 'nin farklı derişimleri ve oksin olarakta bütün ortamlarda stabil oranda NAA büyüme düzenleyicileri kullanıldı. Sürgün oluşumu ortamlarında 1-2 mg/L BAP + 0,05 mg/L NAA ve 1 mg/L TDZ + 0,05 mg/L NAA içeren MS besi ortamında en iyi çoklu sürgün oluşumları görüldü. En ağır fide oluşumuna ort., 5,6 ile 1 mg/L TDZ + 0,05 mg/L NAA içeren MS ortamlarında gözlemlendi. En uzun fide boyları 1,5 mg/L kinetin + 0,05 mg/L NAA içeren MS besi ortamında görüldü. Eksplant başına kallus miktarı artan hormon derişimlerine göre artma gösterdi ve eksplant başına en fazla kallus oluşumu TDZ ve BAP' ın yüksek derişimlerini içeren besi ortamlarında görüldü. Ayrıca kallus oluşumun görüldüğü bazı besi ortamlarında mavi renk oluşumuna rastlanıldı.

HPLC cihazı ile 15 adet standardın kullanıldığı çalışmada 4 adet fenolik bileşik kalitatif ve kantitatif olarak tespit edildi. En yüksek oranda fenolik bileşik oluşumuna neden olan BBD' leri; kinetin, BAP ve TDZ için 1,5 mg/L derişimlerinde uygulanan KS-9, KS-10, KS-11 ortamlarında, zeatin için 1 mg/L derişimlerinde uygulanan KS-8 ortamından elde edildi. Bu dört ortam değerlendirildiğinde en yüksek fenolik bileşik oluşumuna kinetinin 1 mg' lik derişimlerinden elde edildiği tespit edildi. Ayrıca Klorojenik asit ve rozmarinik asit 1,0 mg zeatin uygulandığında (KS-8) en yüksek seviyeye çıktı, ferulik asit ise 1,5 mg kinetin (KS-9) uygulamasında en yüksek seviyeye çıktığı tespit edildi.

400 mL etileter ve 80 µL tetradekan bileşiği kullanılarak bir çözelti hazırlandı. Bu çözeltiden 3 tekrar olacak şekilde yaklaşık 17 mL alınarak, kuru bitki örnekleri üzerine eklendi. Bu işlem sonucunda elde edilen en yüksek uçucu yağ verimi % 3,372 oranla 1 mg/L Kinetin + 0,05 mg/L NAA ve 1 mg/L zeatin + 0,05 mg/L NAA içeren MS besi ortamından elde edildi.

Sonuç olarak bu tez kapsamında, insanlar arasında güçlü bir aromatik ve tıbbi bitki olarak bilinen *Lavandula angustifolia* bitkisinin *in vitro*'da gelişim olanakları araştırıldı ve başarılı bir şekilde mikroçoğaltımı gerçekleştirildi. Ayrıca *in vitro* da oluşturulan 16 farklı ortamdan elde edilen sürgünlerin ekonomik değeri yüksek olan fenolik bileşikleri araştırıldı ve ekonomik değeri yüksek olan ticari amaçlı kullanılan uçucu yağların verimleri tespit edildi.

6. ÖNERİLER

1) Değeri yeni anlaşılmaya başlanan tıbbi ve aromatik bitkilerin mikroçoğaltımı, bu çalışma sonuçlarının değerlendirilmesiyle yapılabilir. Buna ilave olarak, elde edilecek bulgular, ileride gerçekleştirilmesi planlanan *L. angustifolia* bitkisine ait sekonder metabolitlerin hücre ve doku kültürü yöntemleri kullanılarak üretilmesiile ilgili çalışmalar için de kaynak olarak kullanılabilir.

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

3) *L. angustifolia* içerdiği önemli sekonder metabolitlerin hücre kültürü yöntemiyle üretimi yapılacak araştırmalarda, tez çalışmasından elde ettiğimiz *in vitro* da fidelere ait fenolik bileşikler ve uçucu yağ ile ilgili bulgular kaynak olarak kullanılabilir. *L. angustifolia* bitkisinden elde edilen özütlerde (uçucu yağ veya ekstraktlar) antimikrobiyal, antioksidant vb. aktivite testleri yapılabilir.

4) Doku kültürü ile üretimin en son ve en önemli aşaması, elde edilen köklü bitkiciklerin dış koşullara aktarılmasıdır. Bundan sonraki çalışmalarda *L. angustifolia*' ya sürgün ortamında yetiştirilen en iyi hatlar seçilerek kök oluşumunu teşvik edici ortamlar üzerine denemeler kurulmalıdır. Kök oluşumu gerçekleştirildikten sonra doğaya aktarılması gerçekleştirilebilir.

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

7. KAYNAKLAR

- Ahloowalia, B. S., Prakash J., Savangikar V., A. ve Savangikar C., 2002. Plant Tissue Culture, Low Cost Options For Tissue Culture Technology in Developing Countries, FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food And Agriculture Proceedings of a Technical Meeting, Vienna, 3-10.
- Altan, Y., Uğurlu, E. ve Gücel, S., 1999. Şenkata (Erzurum) ve Çevresinin Etnobotanik Özellikleri 1, International Symposium on Protection of Natural Environment and Ehlami Karaçam, Eylül, Kütahya, Bildiriler Kitabı, 132-139
- Andrade, L.B., Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Pauletti, G.F. ve Rota, L., 1999. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 56,2,79- 83.
- Anonim, 2004., Lavender. <http://www.İenica.net/crops/lavender.htm>
- Arabacı, O. ve Ceylan, A., 1990. Bazı Parfüm Bitkilerinde (*Lavandula angustifolia* Mill., *Melissa officinalis* L., *Salvia sclerea* L.) Verim ve Ontogenetik Varyabilite Üzerine Araştırmalar, E.Ü. Fen Bil. Enst. Dergisi, 1,1,233-236.
- Arabacı, O. ve Bayram, E., 2005. Aydın Ekolojik Koşullarında Lavanta (*Lavandula angustifolia* Mill.)'nın Bazı Agronomik ve Kalite Özellikleri Üzerine Bitki Sıklığı ve Azotlu Gübrenin Etkisi, ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 2,2,13-19.
- Areej A., Al-Bakhit, M., Sawwan, J.S. ve Al-Mahmoud, M.S., 2007. *In vitro* propagation of two lavender species: *Lavandula angustifolia* and *Lavandula latifolia* L. Medica., Jordan Journal of Agricultural Sciences, 3,1,16-25.
- Atalay, A., 2008. Konya Ekolojik Şartlarında Yetiştirilen Lavanta (*Lavandula angustifolia* Mill.)'da Farklı Dozlarda Uygulanan Organik ve İnorganik Azotlu Gübrelerin Verim ve Kalite Özellikleri Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, S.Ü. Fen Bilim. Ens., Konya.
- Babaoglu, M., 2001, Bitki Biyoteknolojisi Cilt I-Doku Kültürü ve Uygulamaları- Bölüm 1. Temel Laboratuvar Teknikleri.
- Babaoglu, M., Yorgancılar, M. ve Akbudak, M., A., 2001, Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri, Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları, Babaoglu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (eds.) S. Ü. Vakfı Yayınları, ISBN 975-6652-04-7, Konya, 262-281.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M. ve Akbudak, M.A., 2001. Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri, Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları (M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan Editörler), 1-35, S.Ü., Vakfı Yayınları, Konya.

- Bajaj, Y.P.S., Furmanowa, M. ve Olszowska, O., 1988, Biotechnology of themicropropagation of medicinal and aromatic plants. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 4,60-103.
- Banthorpe, D.V., Bilyard HJ. ve Watson DG., 1985. Pigment formation by callus of *Lavandula angustifolia*, Phytochemistry 24,11,2677-2680
- Baser, K.H.C. 1998. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Endüstriyel Kullanımı, Anadolu Üniversitesi, Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi Bülteni, 13-14, 19-44, Eskisehir.
- Baser, K.H.C. 2001. Her Derde Deva Bir Bitki Kekik. Bilim ve Teknik Dergisi, 402,74-77.
- Baytop, T., 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmiste ve Bugün) İlaveli İkinci Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Baytop, T., 1984. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, İst. Üniv. Yayın No:3255 Ecz. Fak. Yayın No:40, İstanbul.
- Baydar H. ve Erbaş, S. 2007. Effects of harvest time and drying on essential oil properties in lavandin (*Lavandula intermedia* Emeric ex Loisel.). I. International Medicinal and Aromatic Plants Conference on Culinary Herbs, Nisan, Antalya.
- Baydar, H., 2009. Lavanta. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi (Genişletilmiş 3. Baskı), SDÜ Yayınları No: 51, Isparta, 274-278.
- Baydar, H., 2010a. Lavanta Tarımı ve Uçucu Yağ Teknolojisi. SDÜ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Ders Notu (Basılmamış).
- Beetham J., ve Entwistle T., 1982. The Cultivated Lavenders, Royal Botanic Gardens, Melbourne.
- Bhojwani, S., S. ve Razdan, M.K., 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Pratic. Amsterdam, Elsevier.
- Cavanagh, H.,M.,A. ve Wilkinson, J.M., 2002. Biological activities of lavender essential oil, Phytotherapy Research, 16,301-308.
- Ceylan, A., 1987. Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ içerenler), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Basımevi, Bornova-İzmir, 1.
- Ceylan, A., 1996. Tıbbi Bitkiler-II (Uçucu Yağ Bitkileri), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 481, İzmir.
- Ceylan, A., Vömel, A., Kaya, N., Çelik, N. ve Nigdeli, E., 1988. Bitki sıklığının lavanta'da Verim ve Kaliteye Etkisi Üzerinde Araştırma. E.Ü. Zir. Fak. Der., 25,2,135-145.
- Ceylan, H., 1996. Tıbbi Bitkiler-II. E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları No: 481, İzmir.

- Chemat, F., Lucchesi, M.E., Smadja, J., Favretto, L., Colnaghi, G. ve Visinoni, F., 2006. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender, Analytica Chimica Acta, 555,1,157-1605.
- Chishti, N., Kaloo, Z. A., Shawl, A. S. ve Sultan, P., 2006. Rapid in vitro clonal propagation of *Lavandula officinalis* chaix A multipurpose plant of industrial importance. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9,514-518.
- Cimpan, G. ve Gocan, S., 2002. Analysis of medicinal plants by HPLC: recent approaches, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 25, 2225 - 2292.
- Cox., P.A., 1990., Ethnopharmacology and the search for new drugs, In Bioactive Compounds from Plants, Ciba Found Symp., Bildiriler Kitabı, 154, 40-7.
- Davis, P.H., 1982. Flora of Turkey and East Aegean Islands. 7 Baskı. Edinburgh Univ. Press, Edinburg.
- Debergh, P., C. ve Read, P., E., 1993. Micropropagation. Micropropagation - Technology and Application, Debergh, P., C. ve Zimmerman, R., H (eds.), Kulwer Academic Publishers, Dordrec, Hollanda, 1-15.
- Debnath, 2005. A two-step procedure for adventitious shoot regeneration from in vitro derived lingonberry leaves: Shoot induction with TDZ and shoot elongation using zeatin. Hort. Science, 40, 189–192.
- Deniz, L., Serteser, A. ve Kargioğlu, M. 2010. Uşak Üniversitesi ve yakın çevresindeki bazı bitkilerin mahalli adları ve etnobotanik özellikleri, AKÜ Fen Bilimleri Dergisi 1,57-72.
- Dığrak, M., Alma, M.H., İlçim, A. ve Sen, S. 2002. Antibacterial and Antifungal Effects of Various Commercial Plant Extracts, Pharmaceutical Biology, 37, 3, 216-220.
- Echeverrigaray, E., Basso, R. ve Andrade, L.B., 2005. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants, Biologia Plantarum, 49,439-442.
- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A. ve Boskou, D., 2002. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory, J. Agric. Food. Chem., 50, 5294-5299.
- Gahan, P.B., ve George, F., 2008. Adventitious regeneration. In: George, E.F., Hall, .A., De Klerk, G.-J. (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*, 1., 3rd ed. Springer, Dordrecht, Netherlands, 355–401.
- Gonçaves, S., Serra, H., Nogueira, J.M.F., Almeida, R., Custódio, L. ve Romano, A., 2008. Headspace-SPME of *in vitro* shoot-cultures and micropropagated plants of *Lavandula viridis*, Biologia Plantarum, 52,1,133-136.

- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. ve Baser, K.H.C., 2000. Flora of Turkey and East Aegean Islands, Supplement II, Edinburgh Univ. Press., 11. Baskı, Edinburg, 618-619.
- Guenther, E., 1948. The Essential Oils. D. Van Nostrand, New York.
- Guenther, E., 1952. The Essential Oils, R.E. Krieger Pub. Co. 5,3-38.
- Harborne, J., B., 1967, Comparative Biochemistry of the Flavonoids, Academic Press, New York, NY.
- Harborne, J., B. ve Williams, C. A. , 2000. Advances in flavonoid research since 1992, Phytochemistry, 55, 481 - 504.
- Harborne, J., B., 1994. The Flavonoids Advances in Research Since 1986, Chapman & Hall/CRC, USA, 638.
- Hartman, H., T. ve Kester, D., E., 1975. Plant Propagation, Principels and Practices, Prentice-Hall. Inc., New Jersey.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S. ve Williamson, E.M. 2004. Fundamentals of Pharmamocognosy and Phytotherapy. Churchill Livingstone, Edinburg
- Hertog, M., G., L., Hollman, P., C., H. ve Katan, M., B., 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits 286 commonly consumed in the Netherlands, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 2379 - 2383.
- Heywood, V., H., 1996. Flowering Plants of the World, BT Batsford Ltd., 239, London.
- Huang M., C. ve Chu C.Y., 1987. A scheme for commercial multiplication of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort.) through shoot tip culture, Hort. Abst., 57,5, 374.
- Hutchinson, J.F. ve Zimmerhan, R.H., 1987. Tissue culture of temperate fruit and nut trees. Horticultural Review, 9,273-349.
- Jordan, A.M., Calvo, M.C. and Segura, J. 1998. Micropropagation of adult *Lavandula dentata* plants. J. Hort.Sci.Biotechn,73,93-96.
- İlisulu, K., 1992. İlaç ve Baharat Bitkileri. Ankara Üniv. Zir. Fak. Yayın, No: 360.
- Kan Y., Arslan N., Altun L. ve Kartal M., 2006. Türkiye’de Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kültürünün Ekonomik Önemi, 15. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Ekim , Antalya.
- Kadioğlu, A., 2004. Bitki Fizyolojisi. Eser ofset matbacılık, Trabzon. 258-317
- Koçyiğit, M., 2005. Yalova İli’nde Etnobotanik Bir Araştırma., Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Lev, E. ve Amar, Z. 2000. Ethnopharmacological Survey of Traditional Drugs sold in Israel at the end of the 20th century. Journal of Ethnopharmacology 72,191-205.
- Lis-Balchin, M. ve Hart, S. 1999. Studies on the mode of the action of the essential oil of lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). Phytother Res., 13,540-542.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. ve Jime' nez, L. 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability, American Journal of Clinical Nutrition, 79, 727 - 747.
- Mann, J., 1987. Secondary Metabolism, Oxford University Press, Toronto, ON.
- Mansuroglu, S. ve Gürel, E., 2001. Mikroçogaltım, Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları, Babaoglu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (eds.) S. Ü. Vakfi Yayınları, ISBN 975-6652-04-7, Konya, 262-281.
- Mastelic, J. ve Jerkovic, I., 2003. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L. Food Chemistry, 80, 135-140.
- Merken, H., M. ve Beecher, G., 2000. Measurement of food flavonoids by highperformance liquid chromatography: A review, J. Agric. Food Chem., 48, 3, 577-599.
- Murashige, T. ve Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plantarum, 15, 473-497.
- Nogueira, J.M.F. ve Romano, A., 2002. Essential oils from micropropagated plants of *Lavandula viridis*. Phytochem. Anal., 13,4-7.
- Özgüven, M., S. Sekin, B. Gürbüz, N. Sekeroglu, F. Ayanoglu ve S. Ekren, S., 2005. Tütün, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretimi ve Ticareti, Türkiye Ziraat Mühendisleri VI. Teknik Kongresi, Ocak, Ankara, Bildiri Kitabı, 1.Cilt, 481-501.
- Panizza, M. ve Tognoni, F. 1988. Clonal propagation, callus formation of plant regeneration of Lavandin. Sci. Hortic. 37,157-163.
- Patil V.N. ve Malavika, 1968. Tetrazolium test for seed viability and vigour, Handbook of seed testing, 209.
- Portilla, G., Eltran, J. B. ve Vega, A., 1995. Micropopagation of lavender (*Lavandula angustifolia*) from axillary buds. Investigacion Agricola, 15-ISSN 0304- 5617.
- Preece, J., E. ve Sutter, E., G., 1993. Acclimatization of micropropogated plants to thr green house and field. Micropropagation Thecnology and Application, Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 71-95.

- Price, K., R., Bacon, J., R. ve Rhodes, M., J., C., 1997. Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*Allium cepa*), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 938-942.
- Quazi, M.H., 1980. *In vitro* multiplication of *Lavandula* spp. Ann Bot. 45,361-262.
- Robbins, R., J., 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical Methodology, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 2866 - 2887.
- Sanchez-Gras, M.C. and Calvo, M., 1996. Micropropagation of *Lavandula latifolia* through nodal bud culture of mature plants. Pla. Cel. Tiss. Org. Cult. 45,259-261.
- Sakar, M. K. ve Tanker, M., 1991. Fitokimyasal Analizler Tanım, Miktar Tayini ve İzolasyon, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 67, 189, Ankara.
- Scholten, H., J. ve Pierik, R., L., M., 1998. Agar as gelling agent. Differential biological effects *in vitro*. Scientia Horticulturae, 77,1-2, 109-116.
- Segura, J. and Calvo, M.C. 1991. *Lavandula* spp. (Lavender): *in vitro* culture, regeneration of plants and formation of essential oils and pigments. In: YPS Bajaj (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 15, 283-310, Medicinal and Aromatic Plants III, Springer-Verlag, Berlin.
- Shahidi, F. ve Naczki, M., 2004. Phenolics in Food and Nutraceuticals. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Skoog and Miiler, C.O., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in the plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol., 11, 118-130
- Sökmen, A. ve Gürel, E., 2001. Bitki Biyoteknolojisi, Edt. Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S. Bölüm 7, Sekonder Metabolit Üretimi, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 211-261.
- Tan, A., 1992. Türkiye’de Bitkisel Çeşitlilik ve Bitki Genetik Kaynakları, Anadolu J. Of AARI 2,50-64 MARA, İzmir.
- Taiz, L. ve Zeiger, E., 2002. *Plant Physiology*., Third Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, 690.
- Tanker, M., Tanker, N., Şarer, E., Atası, E., Şener, B., Kurucu, S. ve Meriçli, F., 1990. Result of Certain Investigation on the Volatile Oil Containing Plants of Turkey, Essential Oils for Perfumery and Flavours, *Proceedings of an International Conference*, Mayıs, Antalya, *Bildiriler Kitabı* 16, 29.
- Tütenocaklı, T. , 2002. Ayvacık (B1, Çanakkale) ve Çevresinin Etnobotaniği. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.

Turhan H., 1997. Salinity Studies in Potato (*Solanum tuberosum* L.), PhD Dissertation, The University of Reading, UK.

URL-1 http://turkherb.ibu.edu.tr/index.php?sayfa=1&tax_id=7469

URL-2, <http://www.oderece.net/sifali-bitkiler/3665-lavanta-lavendel-lavandula-angustifolia.html> 31.12.2012

URL-3, <http://www.oderece.net/sifali-bitkiler/3665-lavanta-lavendel-lavandula-angustifolia.html> 31.12.2012

URL-4, <http://www.bizimbahce.net/wp-content/uploads/lavanta-lavanta-ya%C4%9F%C4%B1.jpg> 31.12.2012

URL-5, http://www.sifalibitkilervedogalTEDAVI.com/bitki_kimyasallari/Gallik_Asit.html 31.12.2012

URL-6, http://www.sifalibitkilervedogalTEDAVI.com/bitki_kimyasallari/Ferulik_Asit.html 31.12.2012

URL-7, http://www.sifalibitkilervedogalTEDAVI.com/bitki_kimyasallari/Rozmarinik_Asit.html 31.12.2012

Wagner, H., 1980. Pharmazeutische Biologie 2.drogen undihra Inhaltshoffe, Gustav Fisher Verlag-Stuttgart, New York.

Weiss, E.A., 1997. Essential Oil Crops. CAB International, New York, USA.

Werbrouck, S., P., O. ve Debergh, P.C., 1994. Applied aspects of plant regeneration (micropropagation), Plant Cell Culture – A Pratical Approach, Dixon, R.A and Gonzales, R.A. (eds.) Oxford Uni. Press., New York, 127-135.

Wrolstad, R., E., 2005. Bioactive Food Components. In: Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components. Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D. and Sporns, P. (eds). John Wiley and Sons, Incorporated. Hoboken, NJ, 459.

Zeybek, N., 1985. Farmasötik Botanik, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:1, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 340.

Zeybek, N., U. Zeybek, 1994. Farmasötik Botanik, E. Ü.Ecz. Fak. Yay. No: 2, Bornova.

Zeybek, U, 1999. Aromaterapi ve Aromaterapide Kullanılan Uçucu Yağlar. Nu-Ka, Alanya.

Zeybek, U., Zeybek, N., 2002. Farmasötik Botanik Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematigi ve Önemli Maddeleri, 3 (Değiştirilmiş 3. baskı) Ege

Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornova, İzmir, 378.

Zuzarte, M. R., Dinis, A. M., Ligia, C.C., Salgueiro, R. ve Canhoto, J. M., 2010. Trichomes, essential oils and in vitro propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). Industrial Crops and Products, 32,3,580-587.

ÖZGEÇMİŞ

27.01.1987 tarihinde Trabzon' un Akçaabat ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Akçaabat'ta tamamladı. 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı lisans öğreniminden 2009 yılında mezun oldu. 2009-2010 eğitim öğretim yılında K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Şuanda K.T.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim dalında yüksek lisans öğrencisi olarak öğrenimine devam etmekte ve ileri dercede İngilizce bilmektedir.