

T.C.
BARTIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



BARTIN-2015

KABUL VE ONAY

Hayati ORTAESKİNAZİ tarafından hazırlanan “*Acinos rotundifolius* Pers. BİTKİSİNDEN *In vitro* KALLUS ÜRETİMİ” başlıklı bu çalışma, 24/06/2015 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Yrd. Doç. Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR (Danışman)

Üye: Prof. Dr. Nusret ZENCİRCİ

Üye: Yrd. Doç. Dr. Fatma HAMURCU

Bu tezin kabulü Bartın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Selma ÇELİKAY
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYANNAME

Bartın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Yrd. Doç. Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR danışmanlığında hazırlamış olduğum "*Acinos rotundifolius* Pers. BİTKİSİNDEN *in vitro* KALLUS ÜRETİMİ" adlı yüksek lisans tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

24/06/2015

Hayati ORTAESKİNAZİ

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmalarım sırasında danışmanlığımı yürüten, büyük destek ve yardımını gördüğüm, bilgisinden, tecrübesinden, bilgeliğinden çok yararlandığım değerli hocam, Yrd. Doç. Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR'e içtenlikle teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans öğrenimime bilgi ve emekleri ile katkıda bulunan, başta Yrd. Doç. Dr. Fatma HAMURCU olmak üzere, üniversitemiz Fen Fakültesi'nin tüm öğretim üyelerine teşekkür borçluyum. Ayrıca Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Ayşe KAPLAN'a, cömert yardımları ve desteği nedeniyle teşekkürlerimi sunuyorum.

Üniversitemiz Orman Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Zafer KAYA tüm öğretim sürem boyunca olumlu yönlendirme ve teşvikleri ile beni cesaretlendirdi. Fen Bilimleri Enstitü müdürümüz Doç. Dr. Selma ÇELİKAY'dan öğrenimim sırasında gerekli koordinasyonların sağlanması ve problemlerin çözümü konusunda çok faydalandım. Kendilerine minnettarım.

Son olarak da, gösterdiği sabır, destek ve anlayış için eşim Tunay ORTAESKİNAZİ'ye yürekten teşekkür etmek istiyorum.

Hayati ORTAESKİNAZİ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Acinos rotundifolius Pers. BİTKİSİNDE *in vitro* KALLUS ÜRETİMİ

Hayati ORTAESKİNAZİ

Bartın Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR

Bartın-2015, Sayfa: xiii + 51

In vitro koşullarda kallus oluşumu sağlamak özellikle bitkiler tarafından üretilen sekonder metabolitlerin üretimi ve bu metabolitlerin üretimini artırılması açısından büyük değer taşımaktadır. Bu nedenle bu çalışmada birkaç farklı eksplant kullanılarak daha önce hiç çalışılmamış olan *Acinos rotundifolius* Pers. için kallus oluşum protokolünü geliştirmek amaçlanmıştır.

Çalışmada doğal yetiştirme ortamından toplanan *Acinos rotundifolius* Pers. bitkisinin tohumları kullanılmıştır. Tohumların çimlendirilmesinde hormonsuz MS ortamı kullanılmıştır. Kotiledon boğum ve hipokotil eksplantları birkaç mm uzunluğunda steril parçalara ayrılarak rejenerasyon ortamına aktarılmıştır.

Kullanılan bütün hormon konsantrasyonları kotiledon boğumun eksplantlarının tamamında %100 kallus oluşumunu sağlamıştır. Kallus ağırlığı açısından en verimli ortam 0,04 mg/L TDZ + 0,2 mg/L IBA içeren MS besin ortamı olmuştur. TDZ miktarındaki artış kallus ağırlığını azaltmıştır.

Kullanılan bütün hormon konsantrasyonları hipokotil eksplantlarında kallus oluşumunu %100 sağlamış, bu konsantrasyonlarda sürgün rejenerasyonu oluşmamıştır. En ağır kalluslar

1 mg/L BAP+ 0,5 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında gelişmiştir. BAP konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kallus ağırlığı azalmıştır.

Çalışmamızda *Acinos rotundifolius* Pers.'in kotiledon boğum ve hipokotil kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılıp farklı oranlardaki TDZ-IBA ve BAP-2,4-D kombinasyonlarında *in vitro* kallus oluşumu için ilk defa bir kallus oluşum protokolü geliştirilmiştir. Bu protokol önemli bir tıbbi ve aromatik bitki olan *Acinos rotundifolius* Pers.'in sekonder metabolitlerinin büyük ölçekli üretiminde de iyi bir protokol olma potansiyeli taşımaktadır.

Anahtar kelimeler

Acinos rotundifolius Pers.; BAP; IBA; kallus; TDZ; 2,4-D

Bilim Kodu

401.01.03

ABSTRACT

M.Sc.Thesis

***In vitro* CALLUS PROPAGATION of *Acinos rotundifolius* Pers. (CALAMINT)**

Hayati ORTAESKİNAZİ

**Bartın University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Thesis Advisor: Asst. Prof. Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR

Bartın-2015, Pp: xiii + 51

In-vitro callus propagation is extremely important both for generation of a plant's secondary metabolites and for increasing production of these metabolites. In this study we tried to develop a protocol for callus formation in *Acinos rotundifolius* Pers. using several different explants. Callus induction in this species has not been studied before.

Seeds of *Acinos rotundifolius* Pers. plants that were collected from their natural habitat were used as plant material. Hormone-free MS medium was utilized to germinate seeds. Cotyledon node and hypocotyl explants were cut in a few mm long sterile pieces and were transferred to the regeneration medium.

All hormone concentrations we used for the cotyledon node explants formed callus (100%). We found that the most productive medium for callus weight was the MS medium containing 0.04 mg/L TDZ + 0.2 mg/L IBA. Increased TDZ concentration decreased the callus weight.

All hormone concentrations we used for the hypocotyl explants formed callus (100%). No shoot regenerated at these hormone combinations. The heaviest calli formed in the MS medium that contained 1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D. Increase of the BAP concentration decreased the callus weight.

In our study, cotyledon nodes and hypocotyls of *Acinos rotundifolius* Pers. (Calamint) were used as explant sources. Different combinations of TDZ-IBA and BAP-2,4-D concentrations were tested and an *in vitro* callus propagation protocol was established for the first time. This protocol presumably will be a potentially good protocol for large scale production of

secondary metabolites of *Acinos rotundifolius* Pers., an important medicinal and aromatic plant.

Key words

Acinos rotundifolius Pers.; callus; BAP; IBA; TDZ; 2,4-D

Science Code

401.01.03

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| KABUL VE ONAY | ii |
| BEYANNAME..... | iii |
| ÖNSÖZ..... | iv |
| ÖZET..... | v |
| ABSTRACT..... | vii |
| İÇİNDEKİLER..... | ix |
| EKİLLER DİZİNİ..... | xi |
| TABLOLAR DİZİNİ..... | xii |
| KISALTMALAR DİZİNİ..... | xiii |
| | |
| BÖLÜM 1 GİRİŞ..... | 1 |
| | |
| 1.1 <i>Lamiaceae (Labiatae)</i> Familyası..... | 1 |
| | |
| 1.1.1 <i>Lamiaceae (Labiatae)</i> Familyasına Ait Bitkilerin Morfolojisi..... | 4 |
| 1.1.2 <i>Lamiaceae</i> Familyasının Kimyasal Yapısı..... | 7 |
| 1.1.3 Sınıflandırma..... | 7 |
| | |
| 1.2 <i>Acinos</i> Miller Cinsi..... | 8 |
| | |
| 1.2.1 <i>Acinos rotundifolius</i> Pers. | 10 |
| 1.2.2 <i>Acinos</i> cinsinde sekonder metabolitler..... | 11 |
| | |
| 1.3 Bitkilerde Kallus Kültürü..... | 16 |
| | |
| BÖLÜM 2 MATERYAL ve YÖNTEM..... | 21 |
| | |
| 2.1 Bitki Materyali..... | 21 |
| | |
| 2.2 Sterilizasyon..... | 21 |

| | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| 2.2.1 Cam malzeme ve ekipmanların sterilizasyonu..... | 21 |
| 2.2.2 Besin ortamı ve hormon sterilizasyonu..... | 21 |
| 2.2.3 Tohumların sterilizasyonu..... | 22 |
| 2.3 Büyüme Ortamları ve Kültür Koşulları..... | 22 |
| 2.4 Bitki Büyüme Düzenleyicileri..... | 22 |
| 2.5 <i>Acinos rotundifolius</i> Pers. Tohumlarının <i>În Vitro</i> ' da Çimlendirilmesi..... | 23 |
| 2.6 Kotiledon Boğum ve Hipokotil Eksplantlarının <i>În Vitro</i> 'dan Elde Edilen Fideciklerden İzolasyonu..... | 23 |
| | |
| BÖLÜM 3 BULGULAR..... | 25 |
| | |
| BÖLÜM 4 TARTIŞMA..... | 31 |
| | |
| KAYNAKLAR..... | 39 |
| | |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 46 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil | Sayfa |
|--|-----------|
| <u>No</u> | <u>No</u> |
| 1. Kotiledon boğum eksplantından oluşan kalluslar..... | 29 |
| 2. Hipokotil eksplantından oluşan kalluslar..... | 30 |

TABLolar DİZİNİ

| Tablo | Sayfa |
|---|--------------|
| No | No |
| 1. Temel Murashige ve Skoog (1962) (MS) Ortamı..... | 24 |
| 2. TDZ ve IBA konsantrasyonlarının kotiledon boğum eksplantı üzerindeki etkileri..... | 25 |
| 3. BAP ve 2,4-D konsantrasyonlarının hipokotil eksplantı üzerindeki etkileri..... | 27 |

KISALTMALAR DİZİNİ

| | | |
|---------|---|-----------------------------------|
| 2,4-D | : | 2,4-dichlorophenoxy acetic asit |
| 2,4,5-T | : | 2,4,5-trichlorophenoxyacetic asit |
| BA | : | 6-benzyladenine |
| BAP | : | 6-benzil amino pürin |
| BBD | : | bitki büyüme düzenleyicileri |
| CW | : | hindistancevizi sütü |
| IAA | : | indole-3-acetic asit |
| IBA | : | indole-3-butyric asit |
| MS | : | Murashige ve Skoog besi ortamı |
| NAA | : | α -naphthalene acetic asit |
| TIBA | : | 2,3,5-triiodobenzoic asit |
| TDZ | : | thidiazuron |

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Bir ülkenin floristik zenginliği, o ülkede yayılış gösteren türlerin, özellikle de endemik türlerin sayısı ve çeşitli vejetasyon tiplerine sahip olmasıyla ölçülebilir. Anadolu, birçok tıbbi bitkinin yetişmesi için uygun iklim ve toprak özelliklerine sahip olup, yurdumuz bu nedenle, floristik açıdan çok zengindir. Ülkemiz sahip olduğu bitki zenginliği ile kıta özelliği gösterirken, mevcut bitkilerin oluşturduğu bitki örtüsü bakımından da bu zenginliği devam ettirmektedir (Umay ve Uğurlu, 2010). Türkiye’de yetişen 9000 civarında vasküler bitki türüyle ülkemiz dünya üzerinde zengin bir floraya sahiptir. 3000 kadarı (Ekim vd., 1989) endemik olan bu bitkiler arasında, *Lamiaceae* familyasının hem endemik hem de tıbbi ve aromatik bitkiler açısından önemi büyüktür. Yeryüzünün bütün bölgelerine yayılmış olan bu familya, özellikle Akdeniz bölgesi vejetasyonunun önemli bir kısmını oluşturur (Lawrence, 1963).

1.1 *Lamiaceae* (*Labiatae*) Familyası

Lamiaceae (*Labiatae* veya Ballıbabagiller), kozmopolit bir dağılım gösteren bir çiçekli bitkiler familyasıdır. Özellikle Kuzey yarımkürede ve en çok da Akdeniz çevresinde yayılış gösteren, tek ya da çok yıllık, genellikle otsu, nadiren çalılar veya ağaçları kapsayan (*Hyptis*) ve nadiren tırmanıcı (*Scutellaria*) bir ailedir (Heywood vd.,1993). Hemen hemen tüm habitat tipleri ve tüm yüksekliklerde yetişebilen *Lamiaceae* familyası üyelerinin dünyada yayılış göstermediği çok az bölge bulunmaktadır (Watson ve Dallwitz, 1978). Hedge (1992) familya üyelerinin dünya üzerinde özellikle altı geniş bölgede yayılış gösterdiklerini belirtmiştir:

1. Akdeniz ve Güneybatı Orta Asya
2. Shael’in güneyi, Afrika ve Madagaskar
3. Çin
4. Avustralya
5. Güney Amerika
6. Kuzey Amerika ve Meksika.

Buna ayrıca *Symphorematoideae* ve çoğu *Viticoideae* türlerinin yayılış merkezi olan Endonezya- Malezya Bölgesi de eklenebilir (Harley vd., 2004; Karabacak, 2009).

Familya üyeleri çok farklı yükseklik ve habitatlarda (nemli alan, orman altı ve içi, step, kayalık, kurak alanlar, yol ve tarla kenarları gibi) yetişebilirler. Çoğunlukla yüksek endemizm oranına sahiptirler. *Salvia*, *Scutellaria* gibi kozmopolit cinsler dünyanın hemen her yerinde yayılış göstermektedir. Bu familyaya ait bitkiler genellikle açık arazi bitkileridir; sadece birkaç cins tropikal yağmur ormanlarında yayılış göstermektedir (Watson ve Dallwitz, 1978). Örnek olarak *Gamphostemma* cinsi sadece tropikal yağmur ormanlarında bulunur (Hedge, 1986).

Lamiaceae familyası yaklaşık 236 cins ve 6900-7200 tür içerir. (Heywood vd. 1993; Raymond vd., 2004). World Checklist of Selected Plant Families'de *Lamiaceae* familyasına ait 7534 tür listelenmektedir (URL-1, 2015). En çok tür içeren cinsler *Salvia* (900), *Scutellaria* (360), *Stachys* (300), *Plectranthus* (300), *Hyptis* (280), *Teucrium* (250), *Vitex* (250), *Timus* (220) ve *Nepeta* (200) cinsleridir. (Raymond vd., 2004). *Clerodendrum* cinsi 400'den fazla tür içeriyordu, ancak 2010'da yapılan düzenlemeden sonra, bu cinse ait tür sayısı yaklaşık 150'ye indirilmiştir (Yuan vd., 2010).

Lamiaceae familyası, ülkemizde 45 cins, 546 tür ve 731 takson ile temsil edilmektedir (Davis, 1982; Baytop, 1991). Aynı zamanda ülkemiz *Lamiaceae* familyası için önemli bir gen merkezi durumundadır ve endemizm oranı %42'dir (Başer, 1994). Bu özelliği dolayısıyla endemik türler açısından ülkemizde ilk üç büyük familya arasına girmektedir. Bu türlerin çoğunluğu doğal olarak Akdeniz fitocoğrafik bölgesinde yoğunlaşmaktadır (Hedge, 1992). Familyanın Uluslararası Tehlike Kategorilerine (IUCN) giren çok tehlikede (CR) ve tehlikede (EN) kategorilerinde de önemli sayıda taksonu bulunmaktadır (Ekim vd., 2000).

Yaprakları karşılıklı, çiçekleri iki kanatlı, tek bakışumlu ve hemen her zaman erdişi, sapları dört köşelidir. Yapraklarında, kokulu yağ salgılayan küçük salgı bezleri bulunur. Dolayısıyla başta nane, kekik, adaçayı ve lavanta çiçeği olmak üzere bu familyaya ait çiçekler bol ıtırılı olur.

Bitkilerin genelde tüm organları aromatik bileşikler içerir. Familya üyeleri uçucu ve aromatik yağ içermelerinden dolayı, farmakoloji ve parfüm sanayinde de kullanılırlar. Birçok türünden eterik yağlar elde edilir. Aromatik koku ve lezzetleri ile baharat olarak kullanılır, çay şeklinde tüketilir ve *Coleus* gibi bazı cinsler ise süs bitkisi olarak yetiştirilirler. Ev bitkileri olarak tanınan *Coleus* ve *Plectranthus* renkli ve alacalı yaprakları için tropik iklimlerde doğal ortamda yetiştirilmektedir (Watson ve Dallwitz, 1978).

Yurdumuzda yetişen ve ev ilacı olarak kullanılan uçucu yağ yönünden zengin bitkilerin birçoğu *Lamiaceae* familyasına aittir. Fesleğen, nane, biberiye, adaçayı, kekik, mercanköşk, çördük ve lavanta gibi yaygın olarak kullanılan birçok aromatik bitki bu aileye dahildir.

Ailenin birçok üyesinin yaygın olarak kültürü yapılmaktadır. Bunun sebebi sadece bu bitkilerin aromatik nitelikleri değil, aynı zamanda yetiştirilmelerinin kolay olmasıdır. Altmış aşkın cins ılıman bölgelerde yetiştirilmektedir. Bunların en iyi bilinenleri *Mentha*, *Monarda*, *Nepeta*, *Origanum*, *Phlomis*, *Salvia*, *Stachys*, *Thymus* ve *Ajuga*'dır. Özellikle *Mentha*, *Origanum*, *Thymus* cinsleri aromatik özellikleri nedeniyle gıdalarda lezzet verici olarak kullanılır. Bununla birlikte bazı türlerin kültürü yapılmamakta, kullanım için özellikle doğal olarak yetişen bitkiler tercih edilmektedir. Örneğin hoş kokusu ve görüntüsüyle yaygın olarak "Lavanta" adıyla bilinen ve kullanılan *Lavandula* cinsinden elde edilen temel yağlar çoğunlukla yabancı bitkilerden elde edilmektedir. *Pogestemon* ve *Lavandula* cinslerine ait bazı türler parfümeri sanayinde çok sık kullanılmaktadır (Watson ve Dallwitz, 1978; Baytop, 1991).

Türkiye'de de doğal olarak yayılış gösteren *Thymus*, *Mentha*, *Origanum*, *Salvia* gibi cinsler besin veya baharat olarak tüketilmektedir (Baytop, 1991). *Ajuga genevensis* L., *Ajuga reptans* L., *Lavandula dentata* L., *Lavandula lanata* Boiss, *Lavandula vera* DC, *Physostegia virginiana* Benth, *Monarda fistulosa* L., türleri yurdumuzdaki park ve bahçelerde süs bitkileri olarak yer alan türlerdir (Oğuz ve Yayıntaş, 1987).

Lamiaceae ailesi bazı çalıları, tik gibi bazı ağaçları ve bazı sarmaşıkları da içerir. Genellikle bir üst dudak ve alt dudak görünümündeki taç yaprakları sebebiyle aileye *Labiatae* adı verilmiştir. Bu hala kullanılan bir alternatif isim olmakla birlikte, çoğu

botanikçiler şimdi bu aileyi "*Lamiaceae*" olarak adlandırmaktadırlar (Hill, 2000). *Labiatae* şeklindeki isimlendirme ilk kez 1789 yılında De Jussieu tarafından kullanılmıştır. *Lamiaceae* ismi ise ilk kez 1836 yılında Lindley tarafından önerilmiştir (Hedge, 1992). Dünyanın belli başlı büyük ve eski familyalarındandır. Familya ile ilgili fosil kayıtları yoktur. Kökenini Oligosen'e veya 70-90 milyon yıl öncesine dayanır (Hedge, 1986).

1.1.1 *Lamiaceae* (*Labiatae*) Familyasına Ait Bitkilerin Morfolojisi

Yapraklar genellikle basittir, daima karşılıklı olarak çıkarlar ve her çift yaprak bir önceki çiftle dik açı oluşturur. Buna "decussate", "opposite" veya "whorled" adı verilir. Gövdenin enine kesiti genelde kare şeklindedir, ancak bu ailenin tüm üyeleri için geçerli değildir. Bu dört köşeli gövde yapısı familya için ayırt edici bir özelliktir. Fakat bazı diğer bitki ailelerinde de bu gövde kesiti şekli görülebilir. Özellikle gövde köşelerinde iyi gelişmiş bir kollenkima dokusu bulunmaktadır (Metcalf ve Chalk, 1972; Özörgücü vd., 1991). *Lamiaceae* stomaları genel olarak diasitiktir (Seçmen vd., 1998).

Çiçekler 5 birleşik petal ve 5 birleşik sepal ile bilateral simetrik görünümündedir. Yapraklar stipulasızdır. Basit yapraklar bazen pennat, daima zıt (opposit), şekilleri ovat, eliptik, rotundat yapıdadır. Temel çiçek durumu brakte veya floral yaprakların koltuğunda taşınan vertisillastrum şeklindedir. Ayrıca vertisillastrumlar spika, kapitulum (baş), rasemus (salkım) veya kimoş şeklinde düzenlenmiş olabilir. Çiçekler hermafrodit veya erkek sterildir. Erkek steril türlerin çiçeklerindeki erkek organlarının indirgenmiş ve steril olmasından dolayı çiçekler dişi özelliktedir. *Mentha*, *Thymus*, *Nepeta*, *Ziziphora* gibi cinslerin birçok türünde böyle çiçeklerin oranı %50'ye varmaktadır. Böyle çiçeklerde korolla genellikle daha küçük ve daha açık renklidir (Watson ve Dallwitz, 1978).

Brakteler yapraklara benzer veya belirgin şekilde farklılaşmıştır. Brakteoller mevcut veya eksiktir. Kaliks genellikle 5 lopluk, üst lop 3, alt lop 2 dişlidir. Kalikte 5 sepal bir çan oluşturacak şekilde birleşmiştir. Kaliks bazen iki lobludur. Nadiren loplar veya dişler 1-1 veya 1-4 şeklindedir ya da kaliks aktinomorfudur ve dişleri yumuşak veya dikensi çıkıntılıdır (*Stachys* L., *Galeopsis* L.). Kalikte damarlar 5-20 arasındadır. Türlerin ayırımında bu damarların sayısı ve bağlantıları kullanılmaktadır. Çiçekler braktelerin veya üst yaprakların koltuğunda, genellikle halkalar oluşturacak şekilde düzenlenmiştir (Metcalf ve Chalk,

1950; Watson ve Dallwitz, 1978; Davis, 1982; Davis ve Leblebici, 1982; Tekeli , 2006; Deniz, 2007; Ersoy 2009)

Korolla gamopetal, zigomorfik ve bilabiat, tüpsü, genellikle üst dudak belirsiz (miğfer) 2 loplul, düz ya da çok az konkav, alt dudak genelde 3 loplul, nadiren üst dudak indirgenmiş ve alt dudak 5 loplul (*Teucrium*), ya da üstte 1 ve altta 4 loplul veya üst indirgenmiş belirsiz 2 dişli, alt dudak 3 dişli (*Ajuga*) yapıdadır. Bazen korolla iki dudaklı değildir ve 5 eşit dişe ayrılmıştır (*Mentha* L., *Lycopus* L. ve *Lavandula* L.). Bu durumda *Mentha*'da arkadaki iki dişin birleşmesiyle, 4 diş bulunur veya korolla aktinomorfudur. Androkeumda arkadaki stamen iz bırakmadan kaybolmuştur (nadiren bazı egzotik türler dışında). Stamenler birleşik beş petalden oluşan korolla yüzeyine yapışıktır. Petallere birleşik 2 ya da 4 stamen bulunur. Stamen sayısı 4 ve didinam (ender olarak *Mentha*'da birbirine eşit), ya da stamen sayısı ikidir ve üstteki çift genellikle alttaki çiftten daha kısadır. Bu durumda indirgenmiş stamen yani staminodlar bulunur (*Salvia* L., *Rosmarinus* L.). Didinam tip androkeumda, 2 büyük stamen önde (*Lavandula* L., *Melissa* L., *Thymus* L.) veya arkada (*Nepeta* L.) olur. Anter tekaları 2 ya da 1 gözlü, paralel ya da divergent, nadiren (*Salvia*' da) konnektiflerin uzamasıyla birbirinden ayrılmıştır. Korolla şekli ve stamen pozisyonu çok değişik olabilmektedir. Genellikle üst dudak ve alt dudak arasında belirgin bir ayırım mevcuttur. Ilıman bölgelerde yayılış gösteren cinslerin çoğunda üst dudak kancalıdır ve iki lobdan oluşur; alt dudak ise böceklerin nektar emmesine uygun bir platform oluşturacak şekilde üç lobludur (Metcalf ve Chalk, 1950; Watson ve Dallwitz, 1978; Davis, 1982; Davis ve Leblebici, 1982; Tekeli , 2006; Deniz, 2007; Ersoy 2009).

Ovaryum üst durumlu, 2 karpelli ve 4 ovüllü, 4 lopludur. Stilus genelde ginobaziktir, nadiren de ginobazik olmayıp, tepede üstten hafifçe ikiye ayrılmıştır (bifiddir). Ginobazik stilus familya için karakteristik bir özelliktir. Meyve 4 nutletli (nadiren daha az), genelde kuru, nadiren etlidir. Meyvenin 4 nutletli olması *Lamiaceae* familyası için tipiktir. Nutletler ıslatıldığında müsilaçlı veya değildir. Müsilaçlı nutlet yapısına sahip cinsler: *Acinos* Miller, *Dracocephalum* L., *Elsholtzia* Willd., *Glechoma* L., *Hyssopus* L., *Lallemantia* Fisch. & Mey, *Lavandula* L., *Melissa* L., *Melittis* L., *Mentha* L., *Micromeria* Benth, *Nepeta* L., *Ocimum* L., *Origanum* L., *Prunella* L., *Rosmarinus* L., *Salvia* L., *Satureja* L., *Thymbra* L., *Thymus* L. ve *Ziziphora* L'dir. Tohumlarda genelde besi dokusu bulunmaz. Embriyo genelde düzdür veya nadiren kampilotrop tohum taslağına karşılık

olarak, eğri bir embriyo bulunur (Metcalf ve Chalk, 1950; Watson ve Dallwitz, 1978; Davis, 1982; Davis ve Leblebici, 1982; Tekeli, 2006; Deniz, 2007; Ersoy 2009).

Trakeler genel olarak demetler şeklinde gruplaşmıştır. Odun yarı porludur. Trakeler küçük ve genellikle ışınsal bir bant şeklinde yerleşmiştir. Perforasyonlar basit geçitli, bazı cinslerde ise bölmelidir. Parankima çoğunlukla ışınsal bant şeklinde ve paratrakeal tiptedir. Işınsal heterojen, bir veya çok sıralıdır (Özörgücü vd., 1991). Genç gövdede primer vasküler dokular birer tane köşelerde olmak üzere demet halkalarını meydana getirir (Watson ve Dallwitz, 1978).

Lamiaceae familyasına ait bitkiler genellikle bütün yüzeylerinde tüylere sahiptir. Bu tüyler hem örtü hem de salgı tüyleri şeklindedir. Bu bitkilerin başlıca salgı organı olan salgı tüyleri generatif organlarda da bulunabilmektedir (Mihalik, 1992). Familya üyelerinde çok hücreli başlı kapitat salgı tüylerinin yanında değişik tipte tüylere de rastlanmaktadır (Özörgücü vd., 1991).

Salgı tüyleri, familyayı karakterize eden uçucu yağların kaynağıdır (Özyurt, 1986). *Lamiaceae* bitkilerinde, epidermis hücrelerinden gelişen salgı tüyleri, genellikle uçucu yağların sentezlendiği ve biriktirildiği organlardır. Olgun bir salgı tüyü bir sap ve bir baş kısmından meydana gelir. Hücre çeperleri ince ve selüloz yapısındadır. Kutikula ince ve düzdür. Salgı maddesi tüyün baş kısmındaki hücreler ile kutikula arasında toplanır. Bu bakımdan kutikula oldukça şişkindir. Bazen küçük bir darbe ile kutikula parçalanır ve salgı dışarı atılır (Özyurt, 1986).

Genellikle böceklerle bazen de kelebeklerle veya kuşlarla ilgili çeşitli tozlaşma mekanizmaları mevcuttur. Bunlardan en gelişmiş olanı *Salvia*'da görülmektedir. Böcek nektara girişi engelleyen uzun kıvrık staminal konnektif dokunun bir ucuna kafasıyla vurur. Diğer uç, eklem yerinin oynaklığı vasıtasıyla düşer ve böceğin sırtına polen bulaştırır. *Lamiaceae*'de tozlaşma genellikle böceklerle olmaktadır. Fakat uzun korolla tüpüne sahip bazı türler kuşlar vasıtasıyla da tozlaşabilmektedir (Watson ve Dallwitz, 1978).

1.1.2 *Lamiaceae* Familyasının Kimyasal Yapısı

Lamiaceae familyası kimyasal içerik açısından çok zengindir. Familya üyelerinde terpenoid, iridiod, fenolik bileşikler ve flavonoidler yaygın bir şekilde bulunur. (Naghibi vd., 2005). Familya üyelerinin çoğunda uçucu yağlar bulunmaktadır. Uçucu yağlardaki kısa zincir terpenoidlerin bazıları bu bitkilerin karakteristik koku ve tadını ortaya çıkarmaktadır. Birçok Akdeniz ve Avrupa ülkelerinde üretimi yapılan veya doğadan toplanan *Thymus*, *Lavandula*, *Melissa*, *Mentha* türleri değerli uçucu yağ kaynaklarıdır. *Lavandula* cinsine ait türler çeşitli hoş kokulu terpenoidler içermektedir ve bu özellikleri sayesinde parfümeri sanayisinde kullanılmaktadır. Lebdan diterpenoidleri *Ballota*, *Coleus*, *Lagichilus*, *Leonacite*, *Marrubium* ve *Sideritis*' in de yer aldığı familyanın 20 cinsinde bulunmaktadır. Üç halkalı diterpenoidler *Plectoranthus* ve diğer cinslerin yapraklarında ve çiçeklerinde bulunmaktadır ve bunlar antioksidan özelliklere sahiptir. Familya ayrıca büyük oranda fenolik asit içeren bitki türlerine sahiptir. Rosmarinik asit *Nepetaideae* altfamilyası türlerinde bulunmaktadır. Ayrıca flavonlar, flavanoller, flavanonlar, dihidroflavanoller ve çalkon (chalcones) yapısında flavonoidler de familyada yer alan birçok bitkide bulunmaktadır (Naghibi vd., 2005).

Lamiaceae familyasına ait bitkiler tıbbi tedavide önemli bir role sahiptir. Örneğin *Thymus* spp.'nin içerdiği thymol antibakteriyel özelliğe sahiptir. Familyanın birçok türü farmakolojik açıdan araştırılmıştır ve bu şekilde birçok geleneksel uygulamanın etkinliği kanıtlanmıştır (Naghibi vd., 2005).

1.1.3 Sınıflandırma

Lamiaceae familyası, genellikle 4 köşeli olan gövde yapısı, yaprakların dekussat dizilişli oluşu, çiçek durumlarındaki vertisillaster yapısı, kaliks ve korollanın bilabiat oluşu, ginobazik stilus yapısı, 4 nutletli meyve yapısı ile diğer familyalardan ayrılır. Anatomik açıdan baş kısmı 8 hücreli olan salgı tüyü yapısı (labiat tip salgı tüyü) familya için karakteristiktir (Ersoy, 2009).

Lamiaceae familyasında salgı tüylerinin morfolojisi, dağılımı ve sıklığı subfamilyaları ayırt etmeye yarayan karakterler olarak kullanılmaktadır (Ascensao vd., 1995). Ayrıca bazı

türlerin taksonomik ilişkilerinin belirlenmesinde tüy yapısı ve morfolojisi ek bir kriter olarak kullanılabilir (Isakova, 1972).

Familya içindeki cinslerin ayrılmasında ise: bitkinin tek veya çok yıllık oluşu, otsu, çalimsı veya ağaç şeklinde oluşu, tüylerin varlığı, tüy tipleri, tüylerin konumu, durumu ve yapısı, kaliks boyu ve damarlanma durumu, dişlerin yapısı, korollanın biçimi ve rengi, korollanın dudak ve diş yapılarındaki sayı ve şekil farkları, indirgenmiş veya körelmiş kısımları, stamen sayısı ve yapısı, stamenlerin korollanın üst dudağına göre konumu ayırt edici karakterler olarak kullanılır. *Thymus*, *Ziziphora* ve *Mentha* cinslerinde eşeyssel dimorfizm görülür. Bu cinslerde popülasyonun %50'sinde erkek verimsizdir. Böyle bir durumda dişi bitkiler genellikle küçük ve daha soluk renkli bir korolla yapısına sahiptir (Watson ve Dallwitz, 1978; Ersoy 2009)

Tüm *Lamiaceae* ailesi en son 2004 yılında revize edilmiş ve 236 cinse ayrılmıştır (Raymond vd., 2004). Bu sınıflamaya göre *Lamiaceae* yedi alt aileye ve bu alt ailelerin hiç birine dahil edilmeyen on cinse ayrılır. Alt aileler *Symphorematoideae*, *Viticoideae*, *Ajugoideae*, *Prostantheroideae*, *Nepetoideae*, *Scutellarioideae* ve *Lamioideae*dir. Herhangi bir alt aileye ait olmayan cinsler ise *Tectona*, *Callicarpa*, *Hymenopyramis*, *Petraeovitex*, *Peronema*, *Garrettia*, *Cymaria*, *Acrymia*, *Holocheila* ve *Ombrocharis*'dir (Harley vd., 2004).

2004'den sonra sınıflamada bazı değişiklikler yapılmıştır. *Tsoongia*, *Paravitex* ve *Viticipremna* cinsleri *Vitex*'e dahil edilmiştir (Bramley vd., 2009). *Huxleya* cinsi *Volkameria*'ya dahil edilmiştir (Yuan vd., 2010). *Kalaharia*, *Volkameria*, *Ovieda* ve *Tetraclea* , *Clerodendrum* cinsinden ayrılmıştır (Yuan vd., 2010). *Rydingia* cinsi de *Leucas*'dan ayrılmıştır (Scheen ve Albert, 2007).

1.2 *Acinos* Miller Cinsi

Lamiaceae familyasının bir üyesi olan *Acinos* cinsinin dünya üzerinde 10-11 kadar türü kayıtlı olup, tüm Avrupa'da, Orta Asya'da, Akdeniz'de, Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika'da yayılış gösterir (Bonnier, 1927; Bown, 1995). *Acinos* ismi Yunanca küçük aromatik bitki anlamına gelen *akinos* kelimesinden gelmektedir. Kabul edilen türlerin

listesi üzerinde botanikçiler arasında fikir birliği yoktur. IOPI (The International Organisation for Plant Information) *Acinos* Miller cinsini 11 türe ayırmaktadır. Bunlar *Acinos arvensis* (Lam.) Dandy, *Acinos corsicus* (Pers.) Getliffe, *Acinos graveolens*, *Acinos hungaricus* (Simonkai), *Acinos majoranifolius* (Miller), *Acinos orontius* (K.Mal'y), *Acinos rotundifolius* Pers., *Acinos suaveolens* (Sm.), *Acinos troodi* (Post) Leblebici ve *Acinos villosus* Jim.Perss. türleridir (Stojanovic vd., 2009). Her tür için kullanılan birden fazla sinonim mevcuttur. Ülkemizde ise başta Batı Anadolu olmak üzere, Anadolu'nun her yerine yayılmış 5 türü kayıtlıdır. Bunlardan biri, endemik 2 alt türle temsil edilmektedir (Davis, 1982; Davis vd., 1988). Bu türler *Acinos alpinus* (L.) Moench, *Acinos suaveolens* (Sm.) G.Don fil., *Acinos arvensis* (Lam.) Dandy ve *Acinos rotundifolius* Pers. türleri ile *Acinos troodi* Leblebici subsp. *vardaranus* Leblebici ve *Acinos troodi* Leblebici subsp. *grandiflorus* Hartvig&Strid alt türleridir (Davis, 1982; Davis vd., 1988; Kaya, 1997).

Acinos cinsinin bazı türleri kuvvetli veya hafif aromatik özellikler göstermekte, birbirlerinden bu yönüyle de ayrılabilir. Yine bazı türlerin halk arasında çay olarak ve tıbbi amaçla kullanılması bakımından da önemlidir. *Acinos* cinsi üyeleri süs bitkisi olarak da kullanılabilirler. Ayrıca kurak alanların yeşillendirilmesinde ve kentlerde bahçivandlıkta da kullanılabilir. Dolayısı ile az sayıda tür içermekle birlikte *Acinos* cinsi, ekonomik açıdan *Lamiaceae* ailesinin önemli bir genusunu oluşturur.

Acinos cinsi genel olarak, tek veya çok yıllık bitkiler olup, sıklıkla buruşuk (krispat) tüylü veya ince tüylüdür (puberulos). Yaprakları saplı, eliptik lanseolat (mızraksı) şekilden orbikular şekile kadar değişir. Yapraklar düz, 2-5 kıvrımlı damarlı, tam veya testere dişlidir (serrat). Vertisillasterler 1-12 adet olup, floral yaprakların koltuklarında yer alır. Çiçekler 2-12 adet olup, sapsız dorso-ventral olarak basık olan saplardan çıkmış şekildedir. Brakeoller lanseolatdan (mızrak şeklinde), subuluta (biz şeklinde) kadar değişen şekillerde olabilir. Kaliks tüpü hafif sigmoid (S şeklinde), tabana doğru şişkinleşmiş (nadiren kanatlı), ortaya yakın kısımlarda daralmış, 13 damarlı, hemen hemen iki dudaklı (subbilabiata), boğazı kalın sakal şeklinde tüylüdür. Korolla gümüşü ya da benzer renkli, üst dudakın ortası derin (emerjinat), alt dudak 3 lopludur. Stamenler 4 adettir, alt çift üst çiftten uzundur, fakat stamenler korolladan kısadır. Tekalar değişkendir. Stilus boyları eşit değildir. Nutletler obovoid ile oblong arasında değişen şekillerde ve tüsüzdür (Aktaş, 2001; Ersoy, 2009).

1.2.1 *Acinos rotundifolius* Pers.

Acinos rotundifolius Pers., değişik kaynaklarda *Acinos forminii*, *Acinos graveolens*, *Calamintha exigua*, *Calamintha forminii*, *Calamintha graveolens* (Bieb.) Benth., *Satureja graveolens* Caruel olarak da adlandırılmıştır (Stajenovic vd., 2009; URL-2, 2015).

Halk arasında dağ nanesi, filiskin ve kır yarpuzu olarak bilinir. Soğuk algınlığına karşı çay olarak kullanılır (Kaya, 1997).

Acinos rotundifolius Pers. bitkisi tek yıllık, 2-34 cm boyunda, gövdeler dik ya da yükselici, dört köşeli, genellikle tabandan itibaren dallanmış, yeşil ya da morumsu renkli, genellikle düzensiz dalgalı, kıvrık ve yoğun uzun tüylü, tüyleri 0,1-1,5 mm, salgı tüyü var veya eksiktir. Yapraklar yeşil, yeşil-mor, lanseolat- ovat ya da, obovattan orbikulata kadar değişen Şekillerde, 5-22 x2-16 mm, 2-13 mm'ye kadar saplı, tepede akut ya da mukronat, kenarda düz ya da tepeye doğru hafif veya belirgin serrat, tabanda genellikle kuneat-atenuat, nadiren obtus, damarlanma st yüzde belirsiz, alt yüzde belirgin, örtü tüyleri her iki yüzde de yoğun ya da seyrek, düz ya da düzensiz dalgalı, salgı tüyleri alt yüzde genellikle yoğun, st yüzde ise yalnız yaprak tabanında veya eksiktir. Saplarda az ya da çok sillidir. Floral yapraklar ovat- obovattan, lanseolata kadar değişen Şekillerde, uzunluğu 4,5-25 mm, genişliği 2-13 mm, çiçekleri açar, 3-12 mm'ye kadar saplı, tepede akut veya mukronat, kenarda düz ya da st kısım hafif veya belirgin serrat ve silli, tabanda kuneat-atenuat, damarlanma, örtü ve salgı tüyleri bakımından gövde yaprakları gibidir. Brakteoller 0,5-1,5 mm, subulat-lanseolat, kenarları sillidir. iek durumu vertisillerden oluşmuş, uzunca bir halde, versitiller 1-20 tane, 2-20 iekli, araları 2-65 mm, çiçekler 1-5,5 mm'ye kadar saplıdır. Kaliks yeşil, bazen yeşil-mor, 5-11 mm, kaliks tüpü dik, tabanda belirgin Őiřkin, beş dişli, alt dişler iki, 2-3,8 mm, st dişler , 1-2,5 mm subulat, kenarları silli, st dişler alt dişleri aşıyor, alt dişlere paralel ya da geriye kıvrık, örtü tüyleri yoğun ve uzun, krispat, hirsut, salgı tüyleri yoğun olup uzun ya da kısa tiptedir. Korolla kaliks içinde beyaz, kaliks dışında ise mor-leylak renkte olup alt dudak orta kısımda beyaz üzerine mor lekeli, tbn st kısmı kaliks dışında, 6,5-12 mm boyunda, bilabiat, st dudak dik, hafif emarginat, genişliği 1,2-2,8 mm, uzunluğu 1,8-3,5 mm, alt dudak  loblu, uzunluğu 1,8-3 mm, genişliği 2,8-5,5 mm, orta lob yan loblardan biraz daha uzun ve geniş, uçta obtus-trunkat ya da nadiren emarginat, kenarları düz, dış yüzey tüylü, tüyler tbn alt kısmında

daha kısa, dudakların altında salgı tüylü, alt dudak içte birbirine paralel iki sıra uzun ve kalın tüylü, üst dudak ince ve seyrek tüylüdür. Korolla tübü kısmen ya da tamamen yoğun ya da seyrek tüylüdür. Stamenler 4, didinam yapıdadır. Filamentler beyaz, alt stamenlerde 0,6-3,5 mm, üst stamenlerde 0,1-1,8 mm, tüysüzdür. Anterler mor-beyaz, 0,2-1 mm dir. Ovaryum 0,3-0,5 mm çapındadır. Stilus beyaz, ucu mor renkte, 8-13 mm, üst kısımda hafif tüylü, tepede 2 eşit olmayan loblu, kısa lob subulat, dik, 0,3-0,5 mm, uzun lob daha geniş ve geriye kıvrık olup, 0,8-1 mm dir. Nuks kahverengi, yüzeyi ağısı görünümde, 1,5-2 x 0,8-1 mm, obovoid-oblong, düz, tepede obtus- rotundatdır. Nisan- Ağustos aylarında çiçek açar. Kalkerli, taşlı yamaçlar, stepler, dere kenarları, mısır tarlaları ve nadaslı tarlalar, yol kenarları ve kayalıklarda yetişir. 0- 2200 m'ye kadar rakımda yetişir. Güney Avrupa, Güney Rusya, Kafkasya, ve İç Asya'da bulunur. Türkiye'de ise tüm Anadolu'da yaygın olarak bulunur (Davis, 1982; Davis vd., 1988; Kaya, 1997).

1.2.2 Acinos Cinsinde Sekonder Metabolitler

Lamiaceae familyası üyelerinin çoğu uçucu yağlar, aromatik yağlar ve benzeri sekonder metabolitler bakımından zengindir ve bu sebeple tıp, eczacılık, gıda, kozmetik ve parfümeri gibi alanlarda oldukça büyük öneme sahiptir (Başer, 1993).

Kendine has renk, koku, tat ve görünümüne sahip uçucu yağlarda terpenik hidrokarbonlar ve bunların oksijenli türevleri ile, organik asitler (benzoik asit, sinnamik asit, setik asit), fenoller (timol, karvakrol, kavikol), ketonlar (karvon, kafur, pulegon), aldehidler (benzaldehyd, sitral, sinnamik aldehid), esterler (benzil benzoat, bornil asetat, geranil asetat, fenol esterleri (anethol, eugenol, safrol) ve diğer bileşikler (indol, kumarin) bulunur. Uçucu yağların koku ve tadı oksijenli bileşiklerden ileri gelmektedir (Kaya, 1997).

Uçucu yağlarda 2000'i aşkın kimyasal madde tespit edilmiştir. Bunların %90 kadarını terpenik maddeler oluşturur. Pek azı aromatik türevlerin terpenlerle karışımı halindedir. Düz zincirli hidrokarbondan oluşup kokulu olan ve etken maddeyi oluşturanlar çok azdır. Terpenler iki izopren molekülünün kondensasyonu ile oluşurlar ve $(C_5H_8)_n$ genel formülüne uyarlar. İzopren bir hemiterpendir. İki izopren molekülünden oluşan on karbonlu terpenlere monoterpen, üç izopren molekülünden oluşan onbeş karbonlu terpenlere seskiterpen, dört izopren molekülünden oluşan yirmi karbonlu terpenlere diterpen, yirmibeş karbonlulara sesterpen, otuz karbonlulara triterpen adı verilir. Otuzdan

fazla karbon atomu içeren terpenler ise politerpen olarak isimlendirilir (Tyler vd., 1988; Tanker ve Tanker, 1990).

Uçucu yağlarda özellikle monoterpen ve seskiterpenlere sık rastlanır. Uçucu yağlarda bulunan 150'yi aşkın monoterpen ve 1000 kadar seskiterpen yapıları bileşik saptanmıştır. Monoterpenlerden doğada en sık bulunanları α ve β pinenlerdir ve özellikle çam ağacında bulunurlar; plastik ve parfümeri sanayinde kullanılırlar (Tyler vd., 1988).

Bütün bitki metabolizmalarında, sekonder metabolit olarak bulunan ve çok sayıda farklı nitelik ve miktarlarda çeşitli fenolik bileşikler mevcuttur (Saldamlı, 2007). Bu bileşiklerin bitkileri bazı zararlılara karşı korumada rolleri vardır. Bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanan fenolik bileşikler bitkilerde en yaygın bulunan maddeler grubu olup, günümüzde binlerce fenolik bileşiğin yapısı tanımlanmıştır (Kafkas vd., 2006). Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunabilirler. Fenolik bileşiklere, beslenme fizyolojisi açısından olumlu etkilerinden dolayı "biyoflavonoid" adı da verilmektedir. Bazı kaynaklarda P faktörü (permeabilite faktörü) veya P vitamini olarak da adlandırılmaktadırlar (Saldamlı, 2007). Ayrıca gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler, enzim inhibisyonuna neden olmaları ve değişik gıdalarda kalite kontrol kriteri olmaları gibi nedenlerle de önem taşımaktadırlar (Saldamlı, 2007).

Bitkisel materyallerde bulunan fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılırlar. Fenolik asitler de hidrosibenzoik ve hidrosisinamik asitler olarak iki gruba ayrılırlar.

Hidrosibenzoik asitler, bitkisel gıdalarda genellikle eser miktarda bulunurlar. C₈-C₁ fenilmetan yapısındadır. Bunlar arasında salisilik asit, *m*-hidrosibenzoik asit, gallik asit, vanilik asit sayılabilir. Hidrosisinamik asitler ise C₆-C₃ fenilpropan yapısındadırlar. Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellikler gösterirler. Bunlar arasında ; kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asitleri sayılabilir (Saldamlı, 2007; Erbil, 2012).

Flavonoidlerin karbon iskeleti ise, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C₆-C₃-C₆) yapısındadırlar. Yapısal olarak beş gruba ayrılırlar (Saldamlı, 2007; Erbil, 2012):

1. Antosiyanidinler
2. Flavonlar ve flavonollar
3. Flavanonlar
4. Kateşinler ve löykoantosiyanidinler
5. Proantosiyanidinler

Antosiyanidinler doğada serbest halde bulunmazlar, şekerlerle glikozit yapmış olarak bulunurlar ve antosiyanin adını alırlar. Antosiyanidinler meyve ve sebzelerin pembe, kırmızı ve mor tondaki çeşitli renklerini veren suda çözülebilir nitelikteki renk pigmentleridir. Antosiyaninler bağlanan şekerlere ve bağlanma pozisyonuna göre adlandırılırlar. Antosiyaninler bir aglikon (antisiyanidin), şeker ve bazen fenolik ve minör organik asitlerden oluşur. Şeker kısmı genellikle ramnoz, galaktoz, ksiloz ve arabinozdan meydana gelir. Ayrıca *p*-kumarik, kafeik ve ferrulik asit gibi asitlerle de açillenmiş olabilir (Erbil, 2012).

Flavonlar ve flavonollar da Antosiyanidinler gibi şekerlerle glikozit halinde bağlanmış olarak bulunurlar (Saldamlı, 2007).

Flavanonlar özellikle turunçgillerde yaygın olarak bulunurlar. En önemlileri naringin, hesperidin ve naringenindir. Özellikle elma ve armutlarda bulunan dihidrokalkon yapısındaki bileşiklerden floretin ve floridzin önemlidir (Saldamlı, 2007).

Kateşinlerin kimyasal yapıları, flavon-3-ol'dür. Kateşinler gıdalarda yaygın olarak bulunan flavonoid grubunu oluştururlar. Hem kimyasal hem de enzimatik olarak hava oksijeni ile kolaylıkla kondanse olarak proantosiyanidinleri oluştururlar (Saldamlı, 2007).

Kateşinlerden veya löykoantosiyanidinlerden oluşan polimerik yapılara proantosiyanidinler denir. Sadece epikateşin/kateşin kondensasyonu ile oluşuyorsa prosiyanidin, kateşin/gallokateşin kondensasyonu ile oluşuyorsa prodelfinidin denir. Bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunan proantosiyanidinler, epikateşin ve kateşin kombinasyonlarından oluşan dimerlerdir (Saldamlı, 2007).

Fenolik bileşikler bitki ve hayvansal kökenli pek çok gıdanın tat ve aromasına katkıda bulunabilirler. Gıdalarda acılık ve burukluğun kaynağı olan fenolik bileşiklerin önemli bir

bölümü meyve, sebze ve bunlardan elde edilen ürünlerin lezzetinin oluşmasında çok önemlidir. Fenolik bileşikler bazı baharat ve otların lezzeti üzerine de etkili olabilmektedir. Anethol, estragol, eugenol, timol ve karkavol çoğu baharat ve otların toplam duyusal karakteristiklerine katkısı olan uçucu fenolik bileşiklerdir (Erbil, 2012).

Acinos türleri sekonder metabolitler açısından oldukça zengindir. Türkiye’de yetişen *Acinos* türlerinde A. Kaya (1997) tarafından, gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi tekniği ile tespit edilmiş olan uçucu yağ bileşikleri şunlardır:

α -pinen, β -pinen, limonen, 1,8-sineol, γ -terpinen, p-simen, nonanal, 1-okten-3-ol, α -kubeben, menton, α -kopaen, α -kamfolen aldehit, pentadekan, dekanal, α -burbonen, kafur, β -burbonen, benzaldehid, α -gurjunen, linalool, linalool- β -kubeben, oktanol, linalil asetat, pinokarvon, bornil asetat, hegzadekan β -elemen, β -elemen, β -karyofillen, β -karyofillen-terpinen-4-ol, alloaromadendren, β -siklositral, tuyopsen, mirtenal, mentol, pulegon, nonanol, cis-verbenol, trans-pinokarveol, p-menta-1,5-dien-8-ol, trans-verbenol, γ -gurjunen, heptadekan, heptadekan- α -terpineol, - α -terpineol, γ -muurolen, α -terpenil asetat, leden, borneol, verbenon, germakren-D, α -muurolen, trans-p-ment-2-en-1,8-diol, α -kadinen, bisiklogermakren, (E)-2-undekenal, dekanol, δ -kadinen, γ -kadinen, oktadekan, mirtenol, 3,7-guayadien, (E,E)-2,4-dekadienal, tridekanal, β -demaskon, β -demaskenon, (E)-anethol, trans-karveol, kalamenen, p-simen-8-ol, (E)-geranil-aseton, benzilaseton, nonadekan, epikubebol, tetradekanal, α -kalakoren-I, 1,5-epoksi salvial-4 (14)-en, şıobunol, kubebol, β -iyonon, 1-endo-burbonanol, 1-dodekanol, , 1-dodekanal , α -kalakoren-II, izokaryofillenoksit, karyofillenoksit, metil öjenol, 11-norburbonan-1-on, ledol, germakren D-4-ol, kubenol, oktanoik asit, 1-epikubenol, globulol, heneikosan, viridiflorol, hegzahidrofarnesil aseton, spatulenol, hegzahidrofarnesil aseton+ spatulenol, nonanoik asit, t-kadinol, dokosan, timol, t-muurolol, δ -kadinol, trans- α -bergamotol, karvakrol, α -kadinol, selin-11-en-4- α -ol, okso- α -ylangen, dekanok asit, dekanok asit-izofitol, trikosan, karyofilladienol, izopimaradien, manoiloksit, farnesil aseton, karyofillenol-II, tetrakosan, 4-isopropil-6-metil-1,2,3,4-tetradihidronaftalen-1-on, pentakosan, dodekanoik asit, abietatrien, 9-hegzakosen, hegzakosan, fitol, epi-3-manool, heptakosan, tetradekanoik asit, oktakosan, pentadekanoik asit, nonakosan, , hegzadekanoik asit, trikontan, α -humulen, eremofilen, geranilasetat, 2-tridekanon, 8,13-epoksi-15,16-dinorlabd-12-en, sandarakopimaradien, 1-hegzadekanol, 8- α -13-oksi-14-en-epilabdan, sabinen, δ -3 karen, mirsen, mirsen- α -fellandren, α -terpinen, α -tuyen, kamfen, hegzanal, β -fellandren, (E)-2-

hekzenal, amilfuran, (Z)- β -osimen, , (E)- β -osimen, 5-metil-3-heptanon, m-simen, terpinolen, oktanal, tridekan, 3-oktanilasetat, 6-metil-5-hepten-2-on, 1-hekzanol, alloosimen, 1-oktenil asetat, 6-metil-3-heptanol, (E)-2-oktenal, α -p-dimetilstiren, 1-heptanol, trans-1,2-limonenepoksit, (A,Z)-2,4-heptadienal, α -ylangen, 2-etil hegzanol, α -kopaen + α -kamfolen aldehit+ dihidroedulanII, α -kopaen+ pentadekan+ izomenton, α -kopaen+ α -kamfolen aldehit, (E,E)-2,4-heptadienal, (E)-2-nonenal, cis-sabinen hidrat, trans-p-ment-2-en-1-ol, α -trans- β -bergamoten, (EZ)-2,6-nonadienal, 6-metil-3,5-heptadien-2-on+ timol metil eter, terpinen-4-ol, karvakrol metil eter, 2-okten-1-ol, alloaromadendren+ cis-dihidrokarvon, trans-dihidrokarvon, (E)-2-dekenal, pulegon+ cis-verbenol, (E)- β -farnesen, p-menta-1,5-dien-8-ol, δ -terpineol, trans-verbenol, p-vinilanol, p-menta-1,8-dien-4-ol, α -terpinil asetat, γ -muurolen+ borneol, α -muurolen+ β -bisabolen, β -bisabolen, geranial, trans-p-ment-2-en-1,8-diol, eremofilen, α -selinen, karvon, (E,E)- α -farnesen, geranilasetat, geranilasetat+ naftalen, naftalen, β -seskifellandren, metil salisilat, kadina-1,4-dien, kumin aldehit, mirtenol+nerol, mirtenol, nerol,3,7-guayadien, kabreuva oksit VI, kalamenen+ geraniol, geraniol, (E)-geranil-aseton+ timil asetat, hekzanoik asit, 1-metil-naftalen, karvakril asetat, dodesil asetat, geranil isovalerat, (E)-nerolidol, humulen epoksit-II, kumin alkol, etil hegzadekanoat, sandarakopimaradien, etil linoleat, geranil linalool, eikosanal, etil linolenat, benzil benzoat, metil pimarit, 3-metil- siklopentanon, 6-metil-3-heptanol, cis-1,2-limonen epoksit, trans-1,2-limonen epoksit, izomenton, cis-isopulegon, trans- isopulegon, terpinen-4-ol, p-ment-3-en-8-ol, neoizomentol, piperiton, perilla aldehit, piperitenon, pentanal, junipen, aromadendren, (Z)-3-hekzen-1-il-benzoat, nonanoik asit+ t-kadinol, neoizomentol ve asetofenon.

Acinos türlerini, essansiyel yağ asidi verimi ve kompozisyonu açısından iki gruba ayırmak mümkündür (Stojanovic vd., 2009):

1. Çok miktarda essansiyel yağ asidi sentezleyen, ve özellikle de temel bileşen olarak, pulegon, menton ve isomenton gibi monoterpenlerden zengin olanlar (*A. Majoranifolius*, *A. Suaveolens*).
2. Az miktarda essansiyel yağ asidi sentezleyen, ve özellikle de temel bileşen olarak, seskiterpenlerden zengin olanlar. (Bir istisna olarak, bu grupta yer alan *A. Arvensis*'in Yunanistan'dan toplanan türleri, temel bileşen olarak, pulegon, menton ve isomenton gibi monoterpenlerden zengindir).

Acinos türlerinden elde edilen seskiterpenler arasında en fazla germakren-D bulunur. (Bir istisna olarak, Jovanovic vd. (2002) *A. Hungaricus*'da temel bileşenin karyofillen oksit olduğunu; Skaltsa vd. (1999) ise *A. Alpinus*'da major bileşenin germakren-A olduğunu bildirmişlerdir.) (Stojanovic vd., 2009; Jovanovic vd., 2002; Skaltsa vd., 1999)

Aynı türün değişik bölgelerden toplanan popülasyonlarında essansiyel yağların miktar ve kompozisyonu da değişmektedir (Kaya ,1997; Kaya vd., 1999a; Kaya vd., 1999b; Kaya vd., 1999c).

Jovanovic vd. (2008), *A. Hungaricus* ve *A. alpinus*'da kloroform-metanol ekstraktındaki temel bileşenin linolenik asit olduğunu bildirmiştir. α -linolenik asit, bir n-3 essansiyel yağ asidi olup kardiyovasküler riski azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu bileşiğin beyin iskemisi ve epilepsiye karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (Stojanovic vd., 2009; Jovanovic vd., 2008).

Acinos türlerinden birçok flavonoid ve flavonoid glikozidi izole edilmiştir. *Acinos* türlerinin metanol ekstraktlarında, en sık rastlanan flavonlar, apigenin, luteolin ve krisoerioldur. Flavon glikozidleri olarak ise en çok, luteolin-7-O- rutinosid, sinarosid, linarin ve fortunalin bulunur. Kampferol ve kersetin gibi flavonollara ise daha az rastlanır. Flavanonların glikozidik formları olan, narirutin, hesperidin, neoponsirin, pauserin, portsirin gibi bileşikler de *Acinos* türlerinde mevcuttur. Flavonoidlerin bir çoğu, 7. karbon atomunda şekerlerle birleşmiştir. En sık görülen monoglikozidler, O-glukozidlerdir. Diglikozidler arasında rutinosidler sayılabilir. Gerek flavonoidler, gerekse onların glikozidleri, besin takviyesi olarak kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin, kanser, kalp hastalığı, prostatit, katarakt, allerji, inflamatuvar hastalıklar ve KOAH'a karşı koruyucu etkisi olduğunu destekleyen çalışmalar mevcuttur (Stojanovic vd., 2009).

1.3 Bitkilerde Kallus Kültürü

Aseptik koşullarda yapay bir besin ortamında hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından kontrollü çevre koşullarında yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesi, bitki doku kültürü olarak adlandırılır. Bitki doku kültürü, bitki biyoteknolojisi ve bitki genetik mühendisliğinde kullanılan temel araştırma metotları arasında yer alır. Bitki doku kültürlerine, yeni bitki çeşitleri geliştirilmesi ve var olan çeşitlerde genetik

değişim oluşturulmasında, kaybolmakta olan türlerin korunmasında, çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, türler arası melezlemelerden sonra embriyo kültürü eldesinde, haploid bitki üretiminde anter (polen) veya yumurtalık (ovül) kültürü temininde, somaklonal varyasyon oluşturulmasında, *in vitro* seleksiyon, *in vitro* dölleme, *in vitro* germlazm korunması, somatik hücre melezmesi (protoplast füzyonu), gen transferi, sekonder metabolit üretimi, kimeralar, mikroçoğaltım ve sentetik tohum üretimi gibi birçok değişik amaçla başvurulmaktadır. Bitki kültürleri bitki ıslahı uygulamalarında kullanıldığı gibi, hastaliksız bitki üretiminde de büyük ölçüde kullanım alanı bulmuştur (Gözükırmızı, 2015; Babaoğlu vd., 2001).

Bitki doku kültürü yapılırken, apikal meristem ve mezofil gibi dokular; kök, gövde ve yaprak gibi organlar; meristematik hücreler, kallus hücreleri gibi hücre ve hücre kısımları bitkiden ayrılır ve bunlar steril koşullarda yapay besin ortamları üstünde *in vitro* olarak yetiştirilir. Bu şekilde elde edilen değişime açık hücre ve dokulardan (kallus) yeni bitkiler yani klonlar ya da bitkisel ürünler (primer ve sekonder metabolitler) elde edilir. Bitki doku kültürü çalışmalarında bitkiden ayrılarak ortama konulan parçaya eksplant denir. Eksplant, küçük bir bitki olabileceği gibi organ, embriyo, tek hücre ve hatta çeperi kaldırılmış hücre (protoplast) olabilir. Önemli olan eksplanttaki hücrelerde totipotensi yeteneğinin bulunmasıdır. Totipotensi ise zigotta görülen ve mitoz bölünmelerle somatik hücrelere geçen tam bir bitki oluşturma özelliğidir.

Günümüzde küresel ısınma ve iklim değişikliği nedeniyle toprak veriminin azalması, sürdürülebilir olmayan tarım uygulamaları ile toprağın fakirleşmesi, dünya nüfusunun hızla çoğalması ve besin ihtiyacının artmasına paralel olarak, tahıllar başta olmak üzere sebze, meyve ve tüm bitkisel ürünleri yetiştirmek için tarım alanlarının kısıtlı olması, bilim insanlarını, insanlığı bekleyen beslenme sorununu çözmeyi amaçlayan araştırmalara yöneltmiştir. Tarımsal sorunların çözülmesi için mikroçoğaltım, gen aktarımı ile bitkilere çeşitli özellikler (kuraklığa dirençli, pestisitlerden etkilenmeyen veya vitamin, protein ve diğer besleyici öğelerce içeriği zenginleştirilmiş tahıllar vb.) kazandırarak verimi artırmak gibi biyoteknolojik yollar kullanılması sorunun çözümü yolunda atılan en önemli adımı oluşturmaktadır.

Tıbbi ve aromatik bitkilerin ilaç ve kozmetik sanayinde kullanımı da çok yaygındır. Tıbbi bitkilerin ilaç sanayinde hammadde olarak kullanılması, bu bitkilerin doğadan aşırı

miktarda toplanmasına neden olmakta ve türlerin nesilleri tehlike altına girebilmektedir. Bilim insanları bu soruna da biyoteknolojik yöntemlerle çözüm önerileri sunmuş ve başarılı uygulamalarla ilaç etken maddesi olan sekonder metabolitler bitki doku veya hücrelerince sentezlenmesi sağlanmıştır (Curtin, 1983).

Kallus kültürü kök, gövde, apikal meristem, kotiledon, yaprak gibi organlardan alınan küçük parçaların (eksplant), kallus (bitki yara dokusu) oluşturmak için besin ortamlarına ekilmesiyle yapılan yöntemdir. Kallus oluşumu inkübasyon süresine, ortam sıcaklığına, fotoperiyoda, bitkinin kallus oluşturabilme yeteneğine göre değişir. Elde edilen kalluslardan sekonder metabolit üretimi, süspansiyon kültürü, protoplast kültürü ve füzyonu, mikroçoğaltım yapılabilir (Yağcı vd., 2008; Yağcı, 2011).

Bitki doku ve hücre kültürü teknikleri kullanılarak yapılan sekonder metabolit üretiminin avantajları şunlardır (Ramachandra-Rao ve Ravishankar 2002; Razdan, 2003; Yağcı vd., 2008; Yağcı, 2011):

1. Üretim daha güvenilir, basit ve tahmin edilebilirdir.
2. Normalde ana bitkide bulunmayan bileşiklerin üretilmesine olanak sağlar.
3. Politik, coğrafik ve mevsimsel engellerden bağımsız üretim yapılabilir.
4. Karmaşık bitki ekstraksiyonlarıyla karşılaştırıldığında fitokimyasalların izolasyonu daha çabuk ve etkili yapılabilir.
5. *In vitro* olarak üretilen bileşikler tüm bitkideki bileşikler ile doğrudan paraleldir.
6. Tarlada yetişen bitkide istenmeyen bileşikler hücre kültüründe elimine edilebilir.
7. Hücre kültürleriyle bitkinin kendisinden elde edilen fitokimyasalların miktarı karşılaştırıldığında hücre kültürlerinden çok daha fazla miktarda ürün elde edilebilir, hatta üretim endüstriyel boyuta taşınabilir.
8. Hücre kültürleri deney kurmak için mükemmel bir modeldir.
9. Hücre kültüründe genetik uygulamalara yönelik işaretlemeler ve değişimler yapılabilir.
10. Temel araştırmalara (örneğin metabolik ve biyokimyasal yolların anlaşılmasında) yol gösterici tayanlar yapılabilir.

11. Ucuz öncü moleküller kullanılarak, yeni bileşiklerin tekli veya çoklu enzim sistemleriyle biyotransformasyonu gerçekleştirilebilir.

Bitki doku ve hücre kültürü teknikleri kullanılarak sekonder metabolit üretiminin bazı dezavantajları da vardır. Sekonder metabolit üretiminde stabil olmayan hücre hatları, düşük verim, yavaş gelişme ve üretimi arttırmada yaşanan sorunlar gibi geliştirilmesi gereken konular bu dezavantajların başlıcalarını oluşturmaktadır (Ramachandra-Rao ve Ravishankar, 2002).

Bitkilerde sekonder metabolitlerin *in vitro* üretimi coşku uyandıran bir alandır (Smith, 1996). Ancak, bu kimyasalların uygun ekonomik üretimi yüksek verimli hücre kültürlerinin geliştirilebilmesi ile mümkündür (Smith, 1996). Diğer yandan doku kültürleri, doğal bitki pigmentleri ve farmasötiklerin sentezine giden metabolik yolların ortaya çıkarılması amacıyla yapılan laboratuvar çalışmalarında da kilit önemdedir (Smith, 1996). Çeşitli tıbbi bitkilerde değerli sekonder metabolitler bitki kültürü teknikleri ile *in vitro* olarak üretilmektedir (Tripathi ve Tripathi, 2003).

Bitki hücre kültürleri, biyoaktif sekonder metabolitlerin biyolojik öneminin *in vitro* araştırılmasında ve bioprocessing uygulamaları için doğal ürünler üretiminde de büyük önem taşımaktadır (Walker vd., 2002).

Bitki kaynaklı kimyasallar uzun zamandır yetiştirilen bitkilerden *in vivo* olarak elde edilmektedir, ama günümüzde artık genel eğilim bu sekonder metabolitlerin üretilmesinde çeşitli *in vitro* kültür teknikleri kullanılması yönündedir (Smith, 1996). Bu *in vitro* kültür tekniklerinin birçok avantajı vardır. Bitki üretimindeki potansiyel siyasi ve coğrafi sınırların ortadan kaldırılması, iklim koşullarındaki dalgalanmalardan korunulması, hastalıklar, zararlılar ve toprak sorunlarından kaçınılması en önemli avantajlardır. *In vitro* kültür teknikleri kullanılarak, sekonder metabolitlerin ekstrakte edileceği kallus ve hücre süspansiyon kültürleri hızlıca elde edilebilir. Buna ek olarak, bitki kaynaklı kimyasallar düşük maliyetle ve seri şekilde üretilir.

Ayrıca, bu ürünlerin *in vitro* üretimi, kontrollü mikro çevre şartlarında, bitki metabolik yollarının derinlemesine araştırılması için mükemmel yol oluşturmaktadır. Sekonder

metabolitler, bitki yaprakları ve çiçeklerinden elde edilebildiği gibi kallus-hücreleri ve hücre süspansiyon kültürlerinden de elde edilebilirler (Pepin vd., 1995).

Çeşitli faktörlerin kallus hücrelerinde sekonder metabolitlerin birikimine etki ettiği gösterilmiştir. Bunlardan en önemlisi kültür ortamının kimyasal yapısıdır. Bitki hormonları, karbon kaynağı ve konsantrasyonu, azot kaynağı ve konsantrasyonu en önde gelen faktörlerdir (Mori ve Sakurai, 1994). Bunun dışında kültür ortamının fiziksel durumu, ortamın pH değeri, nem, ışık ve sıcaklık önemli faktörlerdir (Gözükırmızı, 2015).

Sonuç olarak, *in vitro* koşullarda kallus oluşumunun sağlanması, özellikle bitkiler tarafından üretilen sekonder metabolitlerin üretimi ve bu metabolitlerin üretiminin artırılması açısından büyük bir öneme sahiptir. Bu nedenle bu çalışmada birkaç farklı eksplant kullanılarak daha önce hiç çalışılmamış olan *Acinos rotundifolius* Pers. için kallus oluşum protokolü geliştirmek amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

MATERYAL ve YÖNTEM

2.1 Bitki Materyali

Bu çalışmada doğal yetiştirme ortamından toplanmış olan *Acinos rotundifolius* Pers. bitkisinin tohumları, bitkisel materyal olarak kullanılmıştır. Bitkinin tür teşhisi Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde yapılmıştır. Bitki örneği Fırat Üniversitesi herbaryumunda mevcuttur.

2.2 Sterilizasyon

Cam malzeme ve ekipmanların sterilizasyonu, besin ortamı ile hormonların sterilizasyonu ve tohumların sterilizasyonu için kullandığımız teknikler aşağıda ayrı ayrı açıklanmıştır.

2.2.1 Cam Malzeme ve Ekipmanların Sterilizasyonu

Kullanılacak petri, erlen gibi cam malzemeler ile pens, bisturi gibi ekipmanlar 160 °C de 4 saat Pasteur fırınında tutularak sterilizasyonları sağlanmıştır.

2.2.2 Besin Ortamı ve Hormon Sterilizasyonu

Bu çalışmada, kullanılmış olan MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamı 1,5 atmosfer basınç altında 121 °C de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Besin ortamlarının 1,5 atmosfer basınç altında 121 °C de 25 dakika tutulmaları sonucunda besin ortamlarının karamelize olduğu görülmüştür. Hormonların stok solüsyonları hazırlanarak bunlardan IBA ve TDZ'nin yapısı sıcaklık etkisiyle bozulacağından filtre sterilizasyonu sonucu besin ortamına otoklavlama sonrasında eklenmiştir. 2,4-D ve BAP ise besin ortamı otoklavlanmadan önce ilave edilmiş ve besin ortamıyla birlikte sterilizasyona tabi tutulmuştur.

2.2.3 Tohumların Sterilizasyonu

Her bitki tohumunun yüzeysel olarak bakteri, mantar ve benzeri organizmalardan temizlenebilmesi için gerekli dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresi farklıdır. Dolayısıyla en uygun dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresinin belirlenmesi önemlidir (Yıldız, 2000). Tohum yüzey sterilizasyonunda hidrojen peroksit, cıva, gümüş nitrat ve antibiyotikler kullanılabilir. Ancak ticari sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) en yaygın kullanıma sahiptir (Özcan ve Özgen, 1996). Tohumlarının yüzey sterilizasyonunda % 100 ticari çamaşır suyu (ACE-Türkiye, % 5 NaOCl) ile 20 dakika muamele edilmiştir. Bu süre sonunda tohumlar 3 defa steril saf sudan geçirilerek durulanmıştır. Durulanan tohumlar MS ortamında çimlenmeye alınmıştır. Bu sterilizasyon şekli sonunda kontaminasyon gözlenmemiştir. Bu nedenle çalışmada bu yöntemin kullanılması tercih edilmiştir.

2.3 Büyüme Ortamları ve Kültür Koşulları

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri ile % 3 sukroz içeren ve % 0,65 plant agar ile (Duchefa) katılaştırılan temel besin ortamı kullanılmıştır (Tablo 1). Ortam hazırlandığında çift distile saf su kullanılmış olup, gerektiğinde (2,4-D ve BAP kullanımında) besin ortamına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1 N NaOH ve 1 N HCl kullanılarak 5,8'e ayarlanmıştır. Tüm kültürler 16/8 ışık/karanlık fotoperiyodunda $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ beyaz floresans ışıklandırmasında iklim dolabında 24 ± 2 °C sıcaklıkta inkübe edilmişlerdir. Denemeler 3 tekerrürlü olacak şekilde planlanmış ve bu tekrarların standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

2.4 Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri Duchefa şirketinden temin edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicileri uygun çözücülerde çözdürüldükten sonra istenilen miktarda ve oranda stok solüsyonları hazırlanmıştır. Hormonlardan IBA ve TDZ'nin yapısı ısı etkisiyle bozulduğu için ortamlar steril edildikten sonra, filtre sterilizasyonuna tabi tutularak ortama ilave edilmiştir. Stok çözeltiler 1g/L olarak hazırlanmıştır. Çalışmanın amacına uygun konsantrasyon ayarlanarak ortama ilave edilmiştir. 2,4-D ve BAP ise ortamlar otoklavda steril edilmeden önce ilave edilmiştir. Hazırlanan hormonların stok

solüsyonları +4 °C de saklanmıştır. Kullanılacak bitki büyüme düzenleyicilerinin çeşit ve konsantrasyonları literatürden yararlanılarak belirlenmiştir.

2.5 *Acinos rotundifolius* Pers. Tohumlarının *İn Vitro*' da Çimlendirilmesi

Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril magentalar içerisinde %3 sukroz içeren ve %0,65 agar ile katılaştırılan MS besin ortamında 24±2 °C de çimlendirilmiştir. Bu çalışmada kotiledon boğum ve hipokotil eksplantları tohumların çimlenmesinden sonra gelişen fidelerden eksplant olarak kullanılmak üzere alınmıştır.

2.6 Kotiledon Boğum ve Hipokotil Eksplantlarının *İn Vitro*' dan Elde Edilen Fideciklerden İzolasyonu

Kotiledon boğum ve hipokotil eksplantları steril şekilde yetiştirilen fidelerden elde edilmiştir. Bu eksplantlar birkaç mm uzunluğunda parçalara ayrılarak kallus oluşum ortamına aktarılmıştır. Steril magentalar içerisinde MS besi ortamında uygun bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonları eklenerek 16/8 ışık/karanlık fotoperiyodunda 500 µmol m⁻²sec⁻¹ floresans ışıklandırmasında iklim dolabında (Fitotron, Sanyo, Gellenkamp PLC, UK) inkübe edilmiştir. Bütün çalışmalar steril hava akışlı kabin içerisinde yapılmıştır.

Tablo 1: Temel Murashige ve Skoog (1962) (MS) ortamı

| <u>Bileşikler</u> | <u>Konsantrasyon (mg/l)</u> |
|---|-----------------------------|
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 440 |
| KNO ₃ | 1900 |
| NH ₄ NO ₃ | 1650 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 370 |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 22,3 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8,6 |
| H ₃ BO ₃ | 6,2 |
| KI | 0,83 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,025 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,25 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,25 |
| Na ₂ EDTA.2H ₂ O | 37,3 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 27,8 |
| Glycine | 2,0 |
| Nicotinic Acid | 0,5 |
| Thiamine-HCl | 0,1 |
| Pyridoxine-HCl | 0,5 |
| Myo-inositol | 100 |

BÖLÜM 3

BULGULAR

Bu çalışmada *Acinos rotundifolius* Pers. bitkisinin tohumları *in vitro* ortamda çimlendirilmiş, 10 günlük fidelerden alınan kotiledon boğum ve hipokotil kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Kotiledon boğum eksplantları 0,04, 0,08, 0,12, 0,16, 0,2, 0,24, 0,28, 0,32 mg/L TDZ ve 0,2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında, hipokotil eksplantları ise 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 mg/L BAP ve 0,5 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Bu hormon konsantrasyonlarının kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve kallus ağırlığı üzerindeki etkileri gözlemlenmiştir. TDZ ve IBA konsantrasyonlarının kotiledon boğum eksplantı üzerindeki etkileri Tablo 2 de, BAP ve 2,4-D konsantrasyonlarının hipokotil eksplantı üzerindeki etkileri ise Tablo 3 de gösterilmiştir.

Tablo 2: TDZ ve IBA konsantrasyonlarının kotiledon boğum eksplantı üzerindeki etkileri.

| Hormonlar | | Kallus oluşum oranı (%) | Rejenere sürgün oranı (%) | Kallus ağırlığı (mg)* |
|------------|------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------|
| TDZ (mg/L) | IBA (mg/L) | | | |
| 0,04 | 0,2 | % 100 | 0 | 463,40±1,66 |
| 0,8 | 0,2 | % 100 | 0 | 446,20±2,54 |
| 0,12 | 0,2 | % 100 | 0 | 435,90±1,57 |
| 0,16 | 0,2 | % 100 | 0 | 286,30±1,65 |
| 0,2 | 0,2 | % 100 | 0 | 274,60±0,07 |
| 0,24 | 0,2 | % 100 | 0 | 249,80±1,36 |
| 0,8 | 0,2 | % 100 | 0 | 232,51±0,70 |
| 0,32 | 0,2 | % 100 | 0 | 216,27±0,49 |

* En az üç tekrarla elde edilen ortalama± standart sapmayı ifade etmektedir.

Kullanılan bütün hormon konsantrasyonlarında, kotiledon boğum eksplantlarının tamamında %100 oranında kallus oluşumu gözlenmiş olup sürgün rejenerasyonunun oluşmadığı tespit edilmiştir (Şekil 1). Kallus ağırlığı açısından en verimli ortamın 0,04

mg/L TDZ + 0,2 mg/L IBA içeren MS besin ortamı olduğu, bu ortamda $463,40 \pm 1,66$ mg ağırlığında kallus oluşumu olduğu gözlemlenmiştir. TDZ miktarındaki artışa bağlı olarak kallus ağırlığında azalmanın olduğu tespit edilmiştir. 0,08 mg/L TDZ+0,2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında $446,20 \pm 2,54$ mg ağırlığında, 0,12 mg/L TDZ+0,2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında $435,90 \pm 1,57$ mg ağırlığında, 0,16 TDZ+0,2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında $286,30 \pm 1,65$ mg ağırlığında, 0,2 TDZ+0,2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında $274,60 \pm 0,07$ mg ağırlığında, 0,24 TDZ+0,2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında $249,80 \pm 1,36$ mg ağırlığında, 0,28 TDZ+0,2 mg/L IBA içeren besin MS ortamında $232,51 \pm 0,70$ mg ağırlığında, 0,32 TDZ+0,2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında $216,27 \pm 0,49$ mg ağırlığında kallus oluşumunun olduğu belirlenmiştir. Kullandığımız TDZ ve IBA konsantrasyonlarının kotiledon boğum eksplantında, kallus oluşumu için iyi bir kallus oluşum protokolü oluşturduğu ancak sürgün rejenerasyonunun bu kombinasyonlarda gözlenmemesinden dolayı, sürgün oluşumu için iyi bir kombinasyon olmadığı sonucuna varılabilir.

Hipokotil eksplantları 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 mg/L BAP ve 0,5 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında kültüre alınmış olup hormon konsantrasyonlarının kallus oluşumu oranı, sürgün oluşum oranı ve kallus ağırlığı üzerindeki etkileri Tablo 3’de gösterilmiştir.

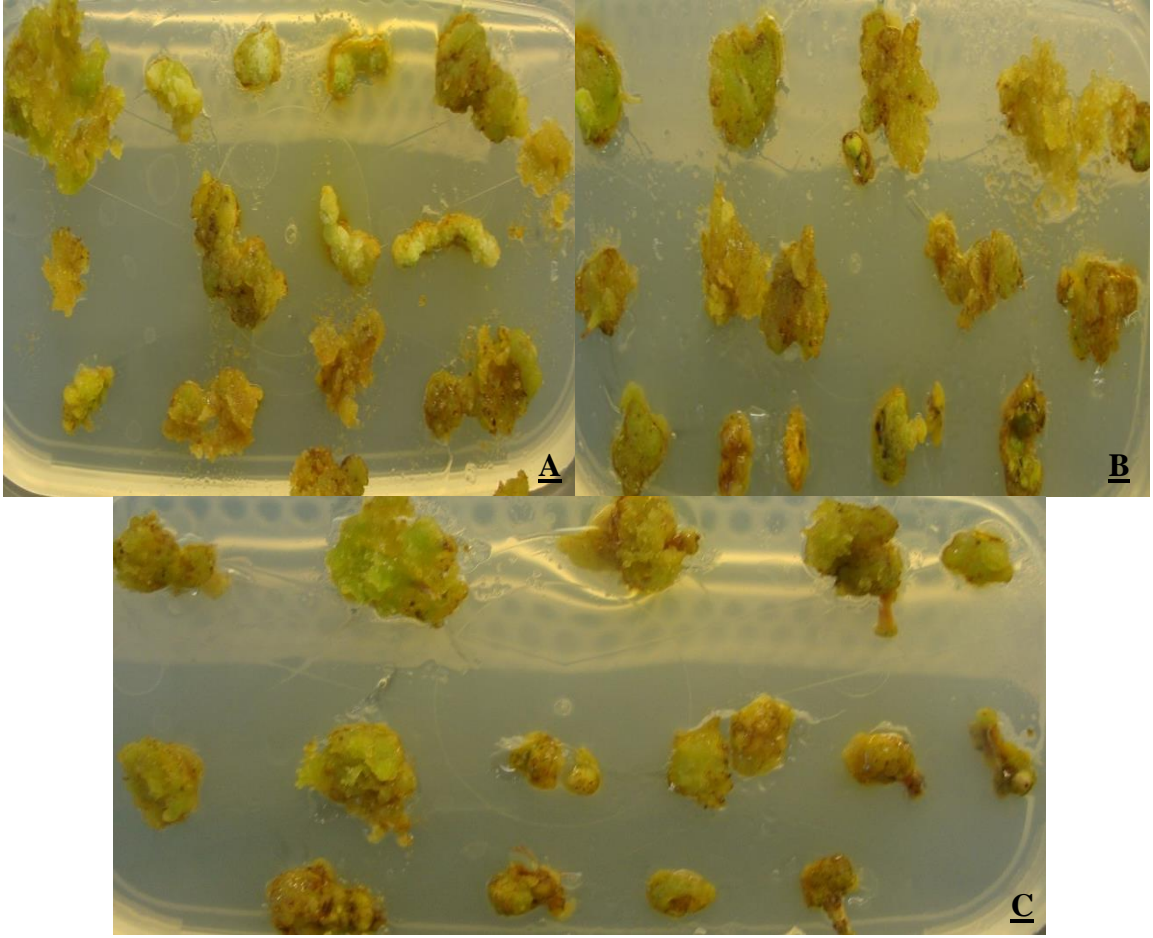
Tablo 3: BAP ve 2,4-D konsantrasyonlarının hipokotil eksplantı üzerindeki etkileri.

| Hormonlar | | Kallus oluşum oranı (%) | Rejenere sürgün oranı (%) | Kallus ağırlığı (mg)* |
|-----------|--------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------|
| BAP(mg/L) | 2,4-D (mg/L) | | | |
| 1 | 0,5 | % 100 | 0 | 479,28±0,96 |
| 2 | 0,5 | % 100 | 0 | 452,18±1,26 |
| 3 | 0,5 | % 100 | 0 | 361,86±0,72 |
| 4 | 0,5 | % 100 | 0 | 395,48±2,03 |
| 5 | 0,5 | % 100 | 0 | 303,16±1,63 |
| 6 | 0,5 | % 100 | 0 | 252,09±0,47 |
| 7 | 0,5 | % 100 | 0 | 201,06±1,80 |
| 8 | 0,5 | % 100 | 0 | 196,37±1,05 |

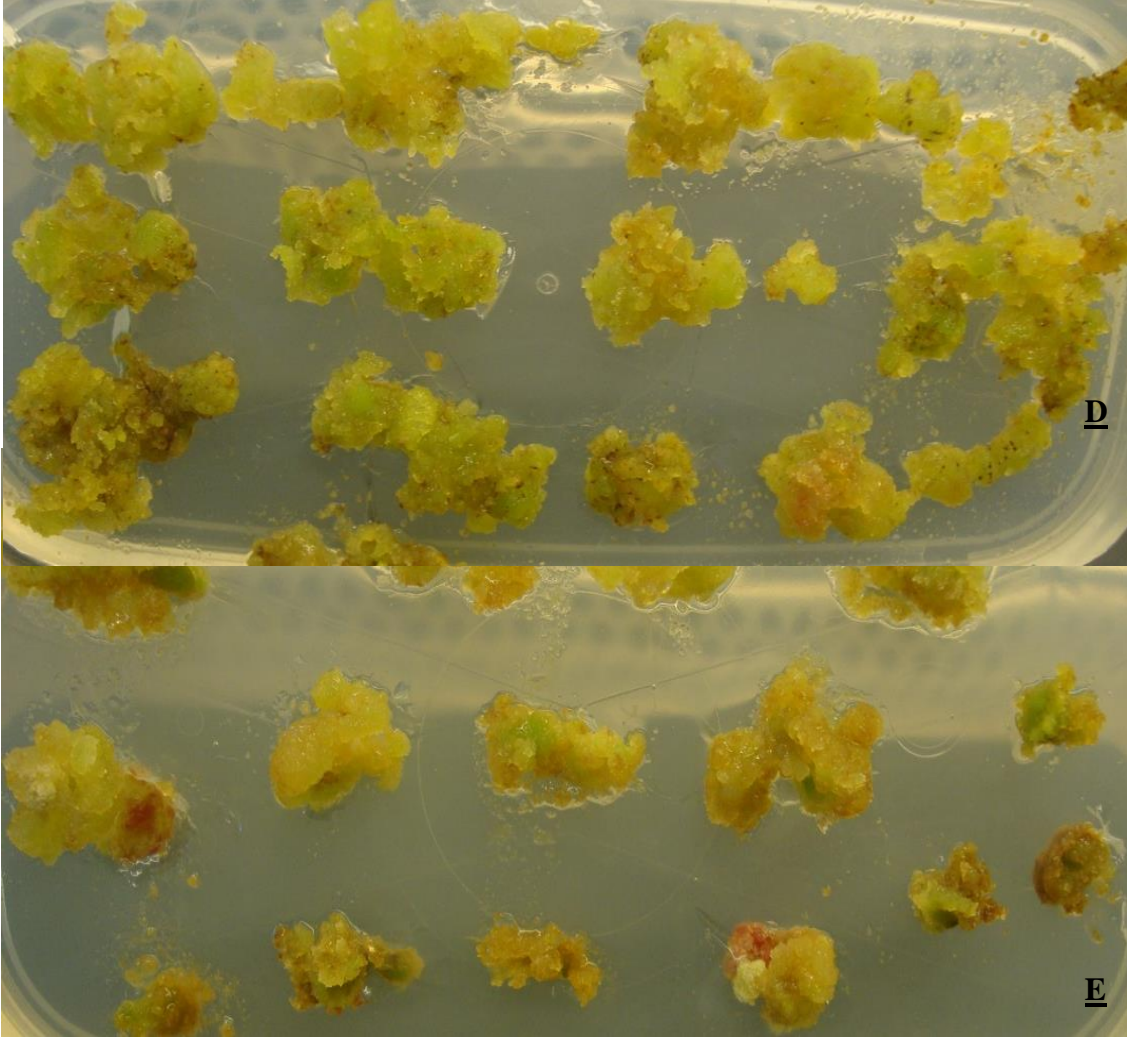
* En az üç tekrarla elde edilen ortalama± standart sapmayı ifade etmektedir.

Kullanılan bütün hormon konsantrasyonlarında, hipokotil eksplantlarında kallus oluşumu %100 oranında olup, bu konsantrasyonlarda sürgün rejenerasyonu oluşmamıştır (Şekil 2). Kallus ağırlıklarına bakıldığında en ağır kallusların 1 mg/L BAP+0,5 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında 479,28±0,96 mg ağırlığında olduğu belirlenmiştir. BAP konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kallus ağırlığının azaldığı ancak 4 mg/L BAP+0,5 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamının bir istisna oluşturduğu gözlemlenmiştir. 2 mg/L BAP+0,5 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında 452,18±1,26 mg ağırlığında, 3 mg/L BAP+0,5 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında 361,86±0,72 mg ağırlığında, 4 mg/L BAP+0,5 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında 395,48±2,03 mg ağırlığında, 5 mg/L BAP+0,5 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında 303,16±1,63 mg ağırlığında, 6 mg/L BAP+0,5 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında 252,09±0,47 mg ağırlığında, 7 mg/L BAP+0,5 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında 201,06±1,80 mg ağırlığında, 8 mg/L BAP+0,5 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında 196,37±1,05 mg ağırlığında kallus oluşumunun olduğu gözlemlenmiştir. Kullandığımız BAP ve 2,4-D konsantrasyonlarının hipokotil eksplantında kallus oluşumu için iyi bir kallus oluşum protokolü oluşturduğu ancak sürgün rejenerasyonunun bu kombinasyonlarda gözlenmemesinden dolayı, sürgün rejenerasyonu için iyi bir hormon kombinasyonu oluşturmadığı sonucuna ulaşılabilir. Hipokotil ve kotiledon boğum eksplantları, kallus ağırlıkları açısından karşılaştırılacak olursa genel olarak hipokotil eksplantından daha ağır kallusların oluştuğu belirlenmiştir.

Tedavi amaçlı kullanılan tıbbi ve aromatik bitkilerin kültürü çok az yapılmakta olup doğal yetişme ortamlarından toplanılmaktadır. Eczacılık sanayinde de ilaç etken maddesi olarak tıbbi ve aromatik bitkilerden büyük oranda yararlanılmaktadır. Bu alıŐmamızda tıbbi ve aromatik bir bitki olan *Acinos rotundifolius* Pers.'in kotiledon boğum ve hipokotil kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılıp farklı oranlardaki TDZ-IBA ve BAP-2,4-D kombinasyonlarının etkisiyle *in vitro* kallus oluşumu için ilk defa bir kallus oluşum protokolü geliştirilmiştir. Bu protokolün önemli bir tıbbi ve aromatik bitki olan *Acinos rotundifolius* Pers.'in sekonder metabolitlerinin büyük ölçekli üretiminde de iyi bir protokol olacağını mit etmekteyiz.



Şekil 1: 0,32 mg/L TDZ+0,2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında kotiledon boğum eksplantından oluşan kalluslar (A).0,08 mg/L TDZ+0,2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında kotiledon boğum eksplantından oluşan kalluslar (B). 0,04mg/L TDZ+0,2mg/L IBA içeren MS besin ortamında kotiledon boğum eksplantından oluşan kalluslar (C).



Şekil 2: 1 mg/L BAP+0,5 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında hipokotil eksplantından oluşan kalluslar (**D**). 8 mg/L BAP+0,5 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında hipokotil eksplantından oluşan kalluslar (**E**).

BÖLÜM 4

TARTIŞMA

Lamiaceae familyasının hem endemik hem de tıbbi ve aromatik bitkiler açısından önemi büyüktür. Bu familyaya ait olan *Acinos* Miller cinsi çok sayıda önemli sekonder metabolit sentezlemekte olup (Kaya ,1997; Kaya vd., 1999a; Kaya vd., 1999b; Kaya vd., 1999c), *Acinos* türleri birçok Akdeniz ülkesinde tıbbi bitki olarak kullanılmaktadır (Stojanovic vd., 2009). Bu cinse ait bitkilerin halk tıbbında antiemetik, antiinflamatuvar, analjezik, antiseptik, diüretik, antidiyareik, sindirim düzenleyici, antiastmatik, kilo verdirici, stimülan, afrodisiak, antivertigo, taşıt tutmasına karşı proflaktik, antimigren, ağız antiseptiği, antiromatizmal, sedatif, spazmolitik, antidiyabetik, safra kesesi şikayetlerini yatıştırıcı ve dismenoreyi giderici olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Karousou vd., 2007; Bown, 1995). *Acinos* türlerinin tıbbi bitki olarak kullanımını destekleyen yeterli biyokimyasal ve klinik çalışma yapılmamıştır (Stojanovic vd., 2009).

Kaya (1997), *Acinos rotindofolius*'un kompleks bir tür olduğunu ve değişik bölgelerden toplanan örneklerde gaz kromatografisi/ kütle spektrometrisi tekniği ile yapılan uçucu yağ analizi sonuçlarının büyük ölçüde farklılık içerdiğini tespit etmiştir. Germakren D ve heksadekanoik asit ana bileşikler olmakla birlikte, örneklerin birçoğunda tanımlanamayan çok sayıda bileşik olduğu sonucuna varılmıştır. Sivrihisar, Araç, ve Susurluk'dan toplanan örneklerde tanımlanabilen bileşik yüzdeleri sırasıyla % 65,34, 72,86, 81,51 düzeyinde kalmıştır. Yeni veya tanımlanamamış bileşiklerin varlığı bu tür üzerinde daha kapsamlı araştırmalar yapılması gerektiğini göstermektedir. *In vitro* koşullarda kallus oluşumu sağlamak özellikle bitkiler tarafından üretilen sekonder metabolitlerin üretimi, bu metabolitlerin üretiminin artırılması ve tanımlanabilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir. Bu nedenle bu çalışmada kotiledon boğum ve hipokotil eksplantları kullanılarak daha önce hiç çalışılmamış olan *Acinos rotundifolius* Pers. için kallus oluşum protokolü geliştirmek amaçlanmıştır.

In vitro kallus oluşturma protokolü her bir türün her eksplantı için, besleyici ortam, sıcaklık, ışık, kültür süresi ve gerekli fitohormonlar açısından farklılık gösterir. Bu çalışmada doğal yetiştirme ortamından toplanmış olan *Acinos rotundifolius* Pers. bitkisinin tohumları, bitkisel materyal olarak kullanılmıştır.

Birçok tıbbi bitkide değerli sekonder metabolitlerin eldesi amacıyla kallus oluşumunu sağlamak ve bunun için en iyi sonuç veren hormon konsantrasyonlarını belirlemek büyük önem taşımaktadır. Literatürde çeşitli sitokin ve oksin kombinasyonlarının kallus oluşumu üzerine etkilerini değerlendiren ve en uygun kallus oluşturma protokolünü araştıran önemli sayıda çalışma mevcuttur.

Negi (2011), kanser tedavisinde kullanılan vinkristin, vinblastin ve vindisklinin elde edildiği *Catharanthus roseus* bitkisinde en verimli kallus oluşturma protokolünü belirlemek amacıyla, sitokinler grubundan Kinetin ve BAP ile oksinler grubundan IAA, IBA, NAA, ve 2,4-D hormonlarının çeşitli kombinasyonlarının etkilerini araştırmıştır. MS besin ortamında yapılan çalışmada, 1mg/L Kinetin veya 1mg/L BAP ile birlikte 1mg/L 2,4-D veya 1mg/L IAA kullanımının iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Ayrıca 2mg/L Kinetin veya 2mg/L BAP kullanılan tüm kombinasyonlar ile 0,5 mg/L 2,4-D veya 0,5 mg/L IAA kullanılan tüm hormon kombinasyonlarında yeşil kallus oluşumu gözlenmiştir.

Catharanthus roseus bitkisini araştıran diğer bir grup ise en verimli kallus oluşturma protokolününün 1,5 mg/L 2,4-D ve 0,5 mg/L Kinetin ile oluştuğunu bildirmişlerdir (Saifullah ve Khan, 2011). Bizim sonuçlarımız da 1mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D kombinasyonunun *Acinos rotundifolius* Pers. bitkisinde kallus oluşumunda en etkili kombinasyon olduğunu göstermektedir. En etkili BAP konsantrasyonunun 1 mg/L olması şeklindeki bulgumuz Negi ile uyumaktadır.

Ahmad ve arkadaşları (2010), *Ruta graveolens* L. bitkisinde 10 µM 2,4-D kullanımı ile maksimum kallus oluşumu gözlemlemiş, artan ve azalan 2,4-D konsantrasyonlarında kallus oluşumunun azaldığını bildirmişlerdir. Değişik konsantrasyonlarda tek başlarına veya kombinasyon halinde, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic asit (2,4,5-T), 2,4-dichlorophenoxy acetic asit (2,4-D), 6-benzyladenine (BA), kinetin, indole-3-acetic asit (IAA), indole-3-butyric acid (IBA), α-naphthalene acetic asit (NAA) kullanımının araştırıldığı çalışmada maksimum kallus indüksiyonunun 10 µM 2,4,5-trichlorophenoxyacetic asit (2,4,5-T) içeren MS ortamında olduğu bulunmuştur. Sitokinlerden BA'nın kallus indüksiyonunda kinetinden daha etkili olduğu bulunmuştur. 2,4,5-T hormonunun *in vitro* kallus oluşumuna etkisi literatürde çok az araştırmaya konu olmuştur. Bu yüzden *Acinos rotundifolius* Pers. dahil olmak üzere diğer bitkilerde de 2,4,5-T etkisi ile kallus oluşumunun araştırılmasında yarar vardır.

Nurul vd. (2013), geleneksel Çin tıbbında kullanılan bir bitki olan Goji (*Lycium barbarum*) yaprak ve nodal eksplantlarında çeşitli BAP ve 2,4-D kombinasyonlarında kallus oluşumunu incelemiş, 0,3 mg/L 2,4-D ile birlikte 0,1 veya 0,3 mg/L BAP kullanılan MS ortamının yaprak eksplantlarında, 0,1 mg/L BAP ile birlikte 0,3 veya 0,5 mg/L 2,4-D içeren MS ortamının ise nodal eksplantlarda en iyi sonucu verdiğini bulmuşlardır.

Vinothkumar vd. (2006), Hindistan'da öksürüğe karşı kullanılan *Pseudarthira viscida* (L.) Wight and Arn. bitkisinde 0,2-1 mg/L lik BAP konsantrasyonları ile kallus oluşumu izlendiğini, en fazla kallus oluşumunun 0,2 mg/L konsantrasyonunda oluştuğunu, düşük BAP konsantrasyonlarında sürgün gelişimi olmadığını bildirmişlerdir.

Mukherjee vd. (2013) Hindistan'da yetişen ve ağır metalleri ortamdan uzaklaştırma çalışmalarında inceleme konusu olan *Clerodendrum indicum* (L.) bitkisinde NAA+Kinetin ve 2,4-D+ Kinetin kullanımının sonuçlarını değerlendirmişler ve kallus formasyonu için en uygun kombinasyonun 1 µM NAA + 3,0µM Kinetin ve 0,5 µM 2,4-D + 3,0 µM Kinetin olduğunu bulmuşlardır.

Sinha ve Bandyopadhyay (2011), Endonezya'da aft ve hemoroid tedavisinde kullanılan tıbbi bir bitki olan *Ipomoea obscura* (L.) Ker-Gawl'da kallus oluşturma amacıyla 0,5-10 mg/L IAA+5-10 mg/L BAP, 0,5-10 mg/L IBA+5-10 mg/L BAP, 0,5-10 mg/L NAA+1,25-10 mg/L BAP, 0,5-10 mg/L 2,4-D+10 mg/L BAP kombinasyonlarının etkisini araştırmışlardır. Yaprak eksplantlarında en iyi kallus oluşumunun 10 mg/L 2,4-D+10mg/L BAP ile oluştuğunu gözlemişler, nodal eksplantlardan kallus elde edememişlerdir.

Bae vd. (2012) Kore'de yetişen ve nesli tükenme tehlikesi altında olan, *Iris dichotoma* Pall. bitkisinde kallus oluşturmak üzere yaptıkları çalışmada, 0-3 mg/L 2,4-D kullanımının ve 0-3 mg/L NAA kullanımının etkisi araştırılmıştır. En yüksek kallus oluşum oranı yaprak eksplantlarında 1 mg/L 2,4-D ile 10,2%, 0,5 mg/L NAA ile 11,6% oranında, rhizom eksplantlarında 0,1 mg/L 2,4-D ile 73,8%; 0,5 mg/L 2,4-D ile 73,7%, 1 mg/L NAA ile 90,4% oranında, kök eksplantlarında 0,1 mg/L 2,4-D ile 45,5% ve 0,1 mg/L NAA ile 51,4% oranında elde edilmiştir. En büyük kallus uzunluğu 3 mg/L NAA kullanımı ile elde edilmiştir.

Brezilya savanlarında yetişen bir ağaç olan ve halk tıbbında skatrizan olarak kullanılan *Euphorbiaceae* ailesinden *Croton urucurana* Baill.'de kallus oluşturma amacıyla yapılan bir çalışmada, 2,4-D oksininin 4,0 mg/ L konsantrasyonda BAP yokluğunda en iyi kallus oluşumunu sağladığı, ortama 2 mg/L BAP eklendiğinde kallus oluşumunun daha az ve ağırlığının değişken olduğunu bulunmuştur (Lima vd., 2008). Aynı şekilde Santos vd. (2005) de *Salix humboldtiana*'da kallus oluşturmak için en iyi protokolün 4 mg/L konsantrasyonda 2,4-D kullanımı olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da 2,4-D kullanılması kallus oluşumunu sağlamıştır.

Bizim çalışmamız da Nurul vd. (2013) ile ve Vinothkumar vd. (2009) ile uyum içindedir. Hipokotil eksplantlarımızda 0,5 mg/L 2,4-D kullanılmış ve *Acinos rotundifolius* Pers. bitkisi için 1-8 mg/L BAP ile kombine edildiğinde 100% oranında kallus oluşumu gözlenmiştir. En yüksek kallus ağırlığı 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D kullanımı ile elde edilmiştir. Ayrıca Lima'nın ve Santos'un önerdiği şekilde BAP içermeyen ve değişik 2,4-D konsantrasyonlarının çalışılması da gereklidir.

Ozias-Akins ve Vasil (1983), *Triticum aestivum* (buğday) bitkisinde Gamborg B5 ortamında 2,4-D'nin farklı miktarlarının (0; 0,4; 1,0; 4,0 ve 8,0 mg/l) kallus oluşumu ve gelişimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bulgularına göre 2,4-D miktarındaki artışla birlikte eksplant başına kallus taze ağırlığı ve hücre sayısı artmaktadır. 2,4-D'nin 2 mg/L ve daha yüksek miktarlarında kallusların düzensiz büyüdükleri, ancak hücre bölünmesinin arttığı, aynı zamanda kallus oluşumu ve gelişimi için 2 mg/L 2,4-D miktarının optimum olduğu bildirilmiştir.

Özdemir ve Türker (2014a) tarafından yabancı aspir (*Carthamus persicus* Wild) bitkisi ile yapılan bir çalışmada eksplant kaynağı olarak sürgün uçları kullanılmış, kallus oluşumunun en fazla 1 mg/L BAP + 1 mg/L NAA ve 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA içeren MS besin ortamında olduğu, sürgün rejenerasyonu için en uygun ortamın 0,50 mg/L BAP + 0,25 mg/L NAA içeren MS besin ortamı olduğu; eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, eksplant başına düşen ortalama kök sayısı ve ortalama kök uzunluğu açısından en verimli ortamın 0,50 mg/L BAP+ 0,25 mg/L NAA içeren MS besin ortamının olduğu belirlenmiştir. Aynı yazarlar 16 *Lens culinaris* Medik. (mercimek) çeşidinin beş farklı eksplantını kullanılarak Murashige ve Skoog (MS) ortamında farklı bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) ile yaptıkları çalışmada kotiledon eksplantlarında 4

mg/L BAP ile 16 çeşidin altısında kallus elde ederken, 4 mg/L BAP+ 1mg/L 2,4-D ile 16 çeşitten 15 inde kallus oluşumu gözlemişlerdir (Özdemir ve Türker, 2014b).

Zheng vd. (1998) *Allium cepa* 'da kallus oluşumunda en önemli faktörün besin ortamındaki 2,4-D konsantrasyonu olduğunu bildirmişlerdir. Bizim de çalışmamızda da 2,4-D içeren MS besin ortamında kallus elde etmemiz bu bulguyu desteklemektedir.

Jabeen vd. (2006), Himayala bölgesinde, Kaşmir- Kumaon arasında yetişen tıbbi bir bitki olan *Aconitum heterophyllum* 'da 2,4-D hormonunun 0,1-0,4 mg/L konsantrasyonda kallus oluşumuna yol açtığını, NAA kullanımının ise kallus oluşumu için daha yüksek konsantrasyonda (0,6 mg/L) etkili olduğunu, fakat bu yüksek konsantrasyonda kullanıldığında tüm 2,4-D deneylerine göre daha yüksek oranda kallus oluşumu gözlendiğini tespit etmişlerdir. Nodal segmentlerden yapılan kültürlerde, BAP (1 mg/L) ve NAA (1 mg/L) kombinasyonunun sürgün rejenerasyonuna yol açtığını, fakat BAP (1 mg/L) ve 2,4-D (1 mg/L) kombinasyonunun sürgün rejenerasyonunda başarısız olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar bizim bulgularımız ile uyum içindedir. Hipokotil eksplantlarımızda 1-8 mg/L BAP ve 0,5 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında kallus oluşumu gözlenmiş olup, sürgün rejenerasyonunun bu konsantrasyonlarda oluşmadığı belirlenmiştir. Giri vd. (1993), *Aconitum heterophyllum* ve Watad vd. (1995) *Aconitum napellus* ile benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

Aslam vd. (2006), ekstraktı antiseptik, antipiretik, diüretik ve vasodilatatör etkiye sahip *Artemisia scoparia* 'da kallus oluşturmak için çeşitli konsantrasyonlarda 2,4-D, 2,4-D+BA, 2,4-D+Kinetin, 2,4-D+IAA, 2,4-D+NAA, Kinetin, BA, BA+IBA, BA+NAA, BA+IAA, Kinetin+IBA, Kinetin+NAA kombinasyonlarının etkisini değerlendirmişlerdir. Aynı çalışmada oksinlerin sürgün oluşumuna etkisi de araştırılmıştır. 2,4-D ile NAA kombinasyonunun çeşitli konsantrasyonlarda sürgün ucu eksplantlarından kallus oluşumunda etkili olduğunu, tek başına 2,4-D kullanımı ile de kallus oluştuğunu ama kallojenik cevabın düşük ve yapısının bozuk olduğunu bildirmişlerdir. 2 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA ve 1 mg/L Kinetin + 0,5 mg/L NAA ile yüksek oranda sürgün oluşumu izlenmiştir.

Tarafımızdan yapılan çalışmada kotiledon boğum eksplantlarında IBA ile birlikte çeşitli konsantrasyonlarda TDZ kullanımının ve hipokotil eksplantlarında 2,4-D ile birlikte çeşitli

konsantrasyonlarda BAP kullanımının 100% oranında kallus oluşumuna yol açtığı ve kullanılan kombinasyonlarda sürgün oluşumu olmadığı saptanmıştır. Aslam'ın yukarıda özetlenen çalışmasının da desteklediği gibi, birçok başka çalışma ile de uyumlu olarak (Bennici vd., 1988; Chawla ve Wenzel, 1987) yüksek oksin konsantrasyonları, düşük sitokin konsantrasyonları ile kombine edildiğinde abondan hücre proliferasyonu ve kallus formasyonuna yol açmaktadır. Ayrıca TDZ kullanımının kültürde sürgün rejenerasyonunu sağladığı ve artan TDZ konsantrasyonunun kallus oluşumunu baskıladığı bilinmektedir (Ahmed ve Anis, 2012). Sonuçlarımız bu literatür verisi ile uyumludur.

Pankreastan insülin salgılanmasını uyardığı tespit edilen (Krishna vd., 2012) ve Sri Lanka'da tip II diyabet tedavisinde kullanılan *Gymnema sylvestre* R. Br. (Retz.) bitkisi üzerinde yapılan bir çalışmada 4 mg/L' nin altındaki 2,4-D konsantrasyonlarında kallus oluşumu olmadığı, 5 mg/L konsantrasyonda maksimum kallus formasyonu izlendiği ve daha yüksek 2,4-D konsantrasyonlarında kallus oluşumunun hızla azaldığı tespit edilmiştir (Kaushalya ve Senarath, 2013). BAP kallus oluşturmakta Kinetin'den daha etkili bulunmuştur (Kaushalya ve Senarath, 2013). Bizim çalışmamızda hipokotil eksplantları 0,5 mg/L lik sabit 2,4-D konsantrasyonuna maruz bırakılmıştır. Araştırdığımız tüm BAP konsantrasyonlarında kallus oluşumu gözlenmiştir. İlerki çalışmalarda *Acinos rotundifolius* Pers. için de daha yüksek 2,4-D konsantrasyonları araştırılabilir.

Van Eck ve Kitto (1990), *Mentha piperita* L. ve *Mentha spicata* L.'de kallus ve sürgün oluşumunda 2,4-D, BA, Zeatin, NAA, 2,3,5-triiodobenzoic asit (TIBA), hindistancevizi sütü (CW) ve adenin sülfatın etkilerini araştırmıştır. Çalışmada kotiledon ve hipokotil eksplantlarından kallus oluşturmanın zor olduğunu, en fazla kallus oluşum oranının *Mentha spicata* L. için kotiledonlarda 0,5 mg/L BA+0,5 mg/L 2,4-D; 2 mg/L BA; 2 mg/L BA + 0,5 mg/L 2,4-D; 2 mg/L BA + 2 mg/L 2,4-D; 2 mg/L BA + 5 mg/L 2,4-D; 5 mg/L BA + 2 mg/L 2,4-D; 5 mg/L BA + 10 mg/L 2,4-D kombinasyonları ile 20% oranında, hipokotillerde 0,5 mg/L 2,4-D; 2 mg/L 2,4-D; 0,5 mg/L BA + 0,5 mg/L 2,4-D; 0,5 mg/L BA + 2 mg/L 2,4-D; 0,5 mg/L BA + 5 mg/L 2,4-D; 2 mg/L BA; 2 mg/L BA + 2 mg/L 2,4-D; 2 mg/L BA + 5 mg/L 2,4-D; 5 mg/L BA + 0,5 mg/L 2,4-D; 5 mg/L BA + 2 mg/L 2,4-D; 10 mg/L BA; 10 mg/L BA + 0,5 mg/L 2,4-D; 10 mg/L BA + 2 mg/L 2,4-D ile 20% oranında olduğu tespit edilmiştir. *Mentha piperita* L. için kotiledonlarda 5 mg/L 2,4-D ve 2 mg/L BA+2 mg/L 2,4-D ile 40% oranında kallus oluşumu sağlanmıştır. Hipokotillerde ise 5 mg/L BA + 0,5 mg/L 2,4-D ve 10 mg/L BA + 0,5 mg/L 2,4-D kullanımı ile kallus

oluşumu gerçekleştirmiştir. Sadece *Mentha piperita* L.'dan sürgün oluşumu elde edilmiştir. *Acinos* Miller cinsi gibi *Lamiaceae* familyasına ait olan *Mentha* cinsine ait iki yakın tür arasında bu denli farklılık olması ilgi çekicidir.

Pal vd. (1985), yine *Lamiaceae* familyasına ait olan, *Leucosceptrum canum* türünde 0,5 mg/L 2,4-D ve CW kullanımı ile regeneratif kallus oluşumu gözlemişlerdir. Françoise vd. (2007), rosmarinik asit elde etmek için *Lamiaceae* familyasından *Zataria multiflora* Boiss. bitkisinden kallus oluşturmuşlardır. Bu çalışmada 2,4-D ve kinetin ile MS ortamında kahverengi kallus oluştuğu, en iyi sonucun Gamborg ortamında (B5), 0,75mg/L BAP kullanımı ile meydana geldiğini, Gamborg ortamında oluşan kallusların yeşil renkli ve MS ortamına göre 3,6 kez fazla olduğunu tespit etmişlerdir. *Lamiaceae* familyasına ait, ayurveda tıbbında yara merhemi ve ateş düşürücü olarak kullanılan *Coleus vettiveroids* K.C. Jacob bitkisi ile yapılan bir çalışmada MS ortamında yaprak eksplantlarından 2 mg/L IAA ilavesi ile veya 1,5 mg/L 2,4-D ilavesi ile kallus oluştuğu görülmüştür (Kamal vd., 2013).

Yaptığımız çalışmada tüm kombinasyonlarda 100% oranında kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Yukarıda alıntılanan çalışmaların da ispatladığı gibi *Lamiaceae* familyasında değişik cinslerde olduğu gibi, türler arasında da gerekli hormonlar açısından büyük farklılık vardır. Kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu için gerekli hormon konsantrasyonları her tür için bağımsız olarak belirlenmelidir (Narayanaswamy, 2005). Kullandığımız BAP ve 2,4-D konsantrasyonlarının *Acinos rotundifolius* Pers. bitkisinin hipokotil eksplantlarında, TDZ ve IBA kombinasyonlarının kotiledon boğum eksplantlarında kallus oluşumu için iyi bir kallus oluşum protokol oluşturduğu görülmektedir.

Tedavi amaçlı kullanılan tıbbi ve aromatik bitkilerin kültürü çok az yapılmakta olup, bunlar doğal yetişme ortamlarından toplanılmaktadır. Eczacılık sanayinde de ilaç etken maddesi olarak tıbbi ve aromatik bitkilerden büyük oranda yararlanılmaktadır. Bu çalışmamızda tıbbi ve aromatik bir bitki olan *Acinos rotundifolius* Pers. in kotiledon boğum ve hipokotil kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılıp farklı oranlardaki TDZ-IBA ve BAP-2,4-D kombinasyonlarının etkisiyle *in vitro* kallus oluşumu için ilk defa bir kallus oluşum protokolü geliştirilmiştir. Bu protokolün önemli bir tıbbi ve aromatik bitki

olan *Acinos rotundifolius* Pers. in sekonder metabolitlerinin büyük ölçekli üretiminde de iyi bir protokol olacağını ümit etmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Ahmad, N., Faisal, M., Anis, M., Aref, I.M. (2010). *In vitro* callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Ruta graveolens* L.. *South African Journal of Botany*, 76: 597–600.
- Ahmed, M.R., Anis, M. (2012). Role of TDZ in the quick regeneration of multiple shoots from nodal explant of *Vitex trifolia* L.-an important medicinal plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(5): 957-966.
- Aktaş, K. (2001). Bazı *Lamiaceae* (*Labiatae*) Türleri Üzerinde Taksonomik bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Manisa, 98 s.
- Ascensao, L., Marques, N., Pais, M.S. (1995). Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis Leonurus* (*Lamiaceae*). *Annals of Botany*, 75(6): 619-626.
- Aslam, N., Zia, M., Chaudhary, M.F. (2006). Callogenesis and direct organogenesis of *Artemisia scoparia*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(9): 1783-1786.
- Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (2001). *Bitki Biyoteknolojisi -I- Doku Kültürü ve Uygulamaları*. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.
- Bae, K.H., Yoo, K.H., Lee, H.B., Yoon, E.S. (2012). Callus induction and plant regeneration of *Iris dichotoma*, an endangered species. *Journal of Plant Biotechnology*, 39:182–188.
- Başer, K.H.C. (1993). Essential oils of Anatolian *Labiatae*: A profile. *Acta Horticulturae*, 333: 217-237.
- Başer, K.H.C. (1994). Essential oil of *Labiatae* from Turkey-Recent, *Lamiales Newsletter*, 3: 6-11.
- Baytop, A. (1991). *Farmasotik Botanik Ders Kitabı*. İstanbul Eczacılık Fakültesi Yayın No: 3687.
- Bennici, A., Caffaro, L., Dameri, R.M., Gastaldo, P., Profumo, P. (1988). Callus formation and plantlet regeneration from immature *Triticum durum* Desf. embryos. *Euphytica*, 39(3): 255-263.
- Bonnier, G. (1927). *Flora Complete Illustree en Couleurs de France, Suisse et Belgium*, Tome 9. Brussels.
- Bown, D. (1995). *Encyclopedia of Herbs & Their Uses*. The Herb Society of America, Dorling Kindersley, New York, 228.

- Bramley Gemma L.C., Forest F. ve de Kok Rogier P.J. (2009). Troublesome tropical mints: re-examining generic limits of *Vitex* and relations (*Lamiaceae*) in South East Asia. *Taxon*, 58(2):500-510.
- Chawla, H.S., Wenzel, G. (1987). Regeneration potential of callus from wheat and barley. *Archiv Für Züchtungsforschung*, 17: 337-343.
- Curtin, M.E. (1983). Harvesting profitable products from plant tissue culture. *Biotechnology*, 1: 644-657.
- Davis, P.H. (1982). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. University Press, Edinburgh, 1: 297.
- Davis, P.H., Leblebici, E. (1982). *Acinos*. In *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. University Press, Edinburgh, 7:331-335.
- Davis P.H., Mill R.R., Tan K. (1988). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, University Press, Edinburgh, 10: 207-208.
- Deniz G., (2007). Türkiye’de Yetişen *Ziziphora* L. (*Lamiaceae*) Taksonlarının Moleküler Sistematığı. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, 67 s.
- Ekim T., Koyuncu M., Erik S., İlarıslan R. (1989). *Türkiye’nin Tehlike Altındaki Nadir ve Endemik Bitki Türleri*. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği Yayını, Ankara, Seri No:18:5.
- Ekim T., Koyuncu M., Vural M., Duman H., Aytac Z. ve Adıguzel N. (2000). *Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı - Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler*. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Van 100. Yıl Üniversitesi, Ankara.
- Erbil N. (2012). Ardahan Yöresinde Yetişen *Lamiaceae* (Labiatae) Familyasına Ait Bazı Türlerin Biyoaktiviteleri. Doktora Tezi, Kahramanmaraş Sütçüimam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, 161 s.
- Ersoy H. (2009). EDTU Herbaryumunda Bulunan *Lamiaceae* (Ballıbabagiller) Familyasının Revizyonu. Doktora Tezi, EDTU, Trakya Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne, 234 s.
- Françoise, B., Hossein, S., Halimeh , H., Zahra, N.F. (2007). Growth optimization of *Zataria multiflora* Boiss. tissue cultures and rosmarinic acid production improvement. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10: 3395-3399.
- Giri, A., Ahuja P.S., Kumar, P.V.A. (1993). Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Aconitum heterophyllum* Wall. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32(2): 213-218.
- Gözükırmızı, N. (2015). <http://aves.istanbul.edu.tr/nermin/dokumanlar>, İstanbul Üniversitesi Akademik Bilgi Sistemi, 20.06.2015.

- Harley R.M., Atkins S., Budantsev A.L., Cantino P.D., Conn B.J., Grayer R.J., Harley M.M., de Kok R.P.J., Krestovskaja T.V., Morales R., Paton A.J., Ryding O., Upson T. (2004). *Labiatae*. In: Kubitzki K.(editor) ve Kadereit J.W.(volume editor), *The Families and Genera of Vascular Plants Volume VII*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg: 167-275.
- Hedge I.C. (1986). Labiatae of South-West Asia: Diversity, distribution and endemism. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, B*, 89: 23-35.
- Hedge I.C. (1992). A global survey of the biogeography of the Labiatae. In Harley R.M. and Reynolds T. (eds.) *Advances in Labiatae Science*. Royal Botanic Gardens Kew, London, 7-17.
- Heywood, V.H., Brummitt, R.K., Seberg, O., Culham, A. (1993). *Flowering Plant Families of the World*. Firefly Books, Ontario, Canada.
- Hill, G. (2000). Botany global issues map. *Eurasia.V*.
- Isakova, Z.M. (1972). Morphological features of seedlings of some species of the genus *Salvia* L.. *Doklady TSKhA*, 187: 159-163.
- Jabeen, N., Shawl, A.S., Dar, G.H., Jan, A., Sultan, A. (2006). Callus induction and organogenesis from explants of *Aconitum heterophyllum* –*Medicinal Plant, Biotechnology*, 5(3): 287-291.
- Jovanovic, T., Kitic, D., Palic, R., Stojanovic, G., Ristic, M. (2002). Chemical composition of the essential oil of *Acinos hungaricus* (Simonkai) Silic. *Journal of Essential Oil Research*, 14:29-30.
- Jovanovic, T., Palic, R., Kitic, D., Risti, M., Zlatkovic, B. (2008). Fatty acids of *Acinos alpinus* and *A. hungaricus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 44:231-233.
- Kafkas, E., Bozdoğan, A., Burgut, A., Türemiş, N., Paydaş Kargı, S., Cabaroğlu, T. (2006). Bazı üzüksü meyvelerde toplam fenol ve antosiyanin içerikleri. *II. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu*, Tokat: 309-312.
- Kamal, B.S., Padmaja, V., Dharmapalan, B. (2013). Induction of callus from leaf and petiole of the plant *Coleus vettiveroids* K .C. Jacob. *Scholars Academic Journal of Biosciences*, 1(6):326-328.
- Karabacak, E. (2009). Türkiye'nin Avrupa-Sibirya Fitocoğrafik Bölgesindeki *Salvia* L. (*Lamiaceae*) Cinsinin Revizyonu. Doktora Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale, 341 s.
- Karousou, R., Balta, M., Hanlidou, E., Kokkini, S. (2007). "Mints", smells and traditional uses in Thessaloniki (Greece) and other Mediterranean countries. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(2): 248-257.

- Kaushalya, N. ve Senarath, W. (2013). Callus induction and *in vitro* plantlet regeneration of *Gymnema sylvestre* R. Br. (Retz.) and the phytochemical screening of natural plants and callus cultures. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, 23(2): 201-210.
- Kaya, A. (1997). Türkiye’de YetiŖen *Acinos Miller* Türleri Üzerinde Morfolojik, Anatomik ve Kimyasal AraŖtırmalar. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, EskiŖehir, 149 s.
- Kaya, A., BaŖer, K.H.C., Demirci, B., Koca, F. (1999a). The essential oil of *Acinos alpinus* (L.) Moench growing in Turkey. *Flavour Fragrance Journal*, 14: 55-59.
- Kaya, A., BaŖer, K.H.C., Tumen, G., Koca, F. (1999b). The essential oil of *Acinos suaveolens* (Sm.) G. Don fil., *Acinos arvensis* (Lam.) Dandy and *Acinos rotundifolius* Pers. growing wild in Turkey. *Flavour Fragrance Journal*, 14: 60-64.
- Kaya, A., BaŖer, K.H.C., Koca, F. (1999c). Essential oils of *Acinos troodi* (Post) Leblebici subsp. vardaranus Leblebici and subsp. grandiflorus Hartvig & Strid.. *Flavour Fragrance Journal*, 14: 50-54.
- Krishna, R.B., Reddy, S.R.R., Javangula, H., Swapna, D. ve Reddy, K.J. (2012). Isolation and characterization of gymnemic acid from *Gymnema sylvestre* R. Br in the control of diabetes. *Journal of Life Sciences and Pharma Research*, 2(1): 27-29.
- Lawrence, G.M.H. (1963). *Taxonomy of Vascular Plants*. 8.Ed., The Macmillan Co., New York, 690.
- Lima, E.C., Paiva, R., Nogueira, R.C., Soares, F.P., Emrich, E.B., Silva, A.A.N. (2008). Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill.. *Ciência e Agrotecnologia* 32 (1): 17-22.
- Metcalf, C.R.; Chalk, L. (1950). *Anatomy of the Dicotyledones*. Oxford University Press, 1041.
- Metcalf, C.R. ve Chalk, L. (1972). *Anatomy of Dicotyledon*. Vol:1, Clarendon Press, Oxford, 502-535.
- Mihalik, E. (1992). Histological detection of sudanophilic lipids in some Lamiaceae. *Acta Horticulturae*, 306: 259-267.
- Mori, T., Sakurai, M.J. (1994). Production of anthocyanin from strawberry cell suspension cultures: Effect of sugar and nitrogen. *Journal of Food Science*, 59: 588-593.
- Mukherjee, A., Bandyopadhyaya, A., Duttaa, S. ve Basub, S. (2013). Phytoaccumulation of iron by callus tissue of *Clerodendrum indicum* (L). *Chemistry and Ecology*, 29 (6): 564–571.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–494.

- Naghibi, F., Mosaddegh, M., Motamed, S.M., Ghorbani, A. (2005). Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2, 63-79.
- Narayanaswamy, S. (2005). *Plant Cell and Tissue Culture*. Tata Mc-Graw Hill Publishing Co. Ltd., 6th reprint, Plant Cell Tissue Culture: 27-28.
- Negi, R.S. (2011). Fast *in vitro* callus induction in *Catharanthus roseus* - A medicinally important plant used in cancer therapy. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 21(4): 597-603.
- Nurul, I.O., Asmah, A., Norrizah, J.S., Shamsiah, A. (2013). Callus induction and somatic embryogenesis from leaf and nodal explants of *Lycium barbarum* L. (Goji). *Biotechnology*, 12(1): 36-45.
- Oğuz, G., Yayıntaş, A. (1987). *Park ve Bahçelerimizin Süs Bitkileri*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı İşleri, Bornova, İzmir.
- Ozias-Akins P. ve Vasil, I. K. (1983). Improved efficiency and normalization of somatic embryogenesis in *Triticum aestivum* (wheat). *Protoplasma*, 117: 40-44.
- Özcan, S. ve Özgen M. (1996). Bitki genetik mühendisliği. *Kökem Dergisi*, 1(1): 69-95.
- Özdemir, F.A., Türker, M., (2014a). Yabani aspir'in (*Carthamus persicus* Wild) *in vitro* çoğaltımında farklı BAP-NAA kombinasyonlarının etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Journal of Agricultural Sciences*, 24(1): 30-35.
- Özdemir, F.A., Türker, M. (2014b). *In vitro* plant regeneration influence by BAP and IBA in lentils (*Lens culinaris* Medik.). *Journal of Applied Biological Sciences*, 8 (1): 22-27.
- Özörgücü, B., Gemici, Y., Türkan, İ. (1991). *Karşılaştırmalı Bitki Anatomisi*. Ege Üniversitesi, Bornova, İzmir.
- Özyurt, M.S. (1986). *Bitki Anatomisi I*. Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları No: 38, Fen Kesimi Yayınları No: 9, Biyoloji Bölümü Yayınları No:2, Erzurum.
- Pal, A., Banerjee, A. ve Dhar, K. (1985). *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis from leaf explants of *Leucosceptum canum* Sm.. *Plant Cell Reports*, 4:281-284.
- Pepin, M., Archambault, J., Chavarie, C., Cormier, F. (1995). Growth kinetics of *Vitis vinifera* cell suspension cultures: I. Shake flask cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 47: 131-138.
- Ramachandra Rao, S. ve Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20:101-153.
- Razdan, M. K. (2003). *Introduction to Plant Tissue Culture*. Science Publishers, India.

- Saifullah, A. ve Saifullah Khan I. (2011). Callus induction and cell suspension culture production of *Catharanthus roseus* for biotransformation studies of (-)-caryophyllene oxides. *Pakistan Journal of Botany*, 43(1): 467-473.
- Saldamlı, İ. (2007). *Gıda Kimyası*. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 463-492.
- Santos, B. R., Paiva, R., Martinotto, C. Nogueira, R.C., Paiva, P.D.O. (2005). Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). *Ciência Rural*, 35 (3): 510-514.
- Scheen A.C. ve Albert V.A. (2007). Nomenclatural and taxonomic changes within the *Leucas* clade (Lamioideae; Lamiaceae). *Systematics and Geography of Plants*. 77(2):229-238.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L. ve Leblebici, E. (1998). *Tohumlu Bitkiler Sıstematiği*. 5. Baskı, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, Bornova-İzmir: 276-280.
- Sinha, T. ve Bandyopadhyay, A. (2011). Induction of callogenesis in *Ipomoea obscura* (L.) Ker-Gawl, a little known medicinal plant. *African Journal of Biotechnology*, 10(82): 19161-19166.
- Stojanovic, G., Golubovic, T., Kitic, D., Palic, R. (2009). *Acinonos* species: Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13) : 1240-1247.
- Skaltsa H., Lazaris D., Loukis A. (1999). Composition of the essential oil of *Acinos Alpinus* (L.) Moench from Greece. *Journal of Essential Oil Research*, 11:35-37.
- Smith M.A.L. (1996). Secondary Product Expression *In vitro*. In: Trigiano, R. N. Ve Gray D.J. (eds.), *Plant Tissue Phytochemistry, Phytobiology, Culture; Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 305-309.
- Tanker, M. ve Tanker, N. (1990). *Farmakognozi*, 2.Cilt. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayın No: 65, Ankara, 269-297.
- Tekeli, Ç. (2006). Lamiaceae Familyasına Ait Bazı Türler Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun, 85 s.
- Tripathi, L., Tripathi, J. N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2 (2): 244-253.
- Tyler, V.E., Brady, L.R., Robbers, J.E. (1988). *Pharmacognosy*. Lea and Febiger, Philadelphia, 9th ed.,103-107.
- Umay, A., Uğurlu, E. (2010). Beylikova (Eskişehir) ilçesinin florasına katkılar. *Ot Sistemik Botanik Dergisi*, 17 (1):133-150.

- URL-1 (2015). <http://apps.kew.org/wcsp/incfamilies.do>, World Checklist Of Selected Plant Families, Royal Botanic Gardens, 20.06.2015.
- URL-2 (2015). <http://www.pfaf.org>, Plants for a Future, 20.06.2015
- Van Eck, J.M., Kitto, S.L. (1990). Callus initiation and regeneration in *Mentha*. *Hortscience*, 25(7):804-806.
- Vinothkumar, D., Britto, S.J., Sebastinraj, J., Robinson, J.P. ve Senthilkumar, S. (2009). Callus regeneration from stem explants of *Pseudarthra viscida* (L.) Wight and Arn. – a vulnerable medicinal plant. *African Journal of Biotechnology*, 8 (17): 4048-4051.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Vivanco, J.M. (2002). Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John Wort). *Phytochemistry*, 60: 289-293.
- Watad, A.A., Kochba, M., Nissim, A., Gaba, V. (1995). Improvement of *Aconitum napellus* micropropagation by liquid culture on floating membrane rafts. *Plant Cell Reports*, 14(6): 345-348.
- Watson L. ve Dallwitz, M. T. (1978). *The Families of Flowering Plants*. Oxford University Press, London.
- Yağcı, C., Toker, M.C. ve Toker, G. (2008). Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoidler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 1(1): 47-58.
- Yağcı Tüzün, C. (2011). *Gentiana olivieri griseb.*'de Kallus ve Süspansiyon Kültürlerinde Bulunan Bazı Sekonder Metabolitler. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 124 s.
- Yıldız, M. (2000). Keten (*Linum usitatissimum* L.) Bitkisinde Adventif Sürgün Rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara, 108 s.
- Yuan, Y.W., Mabberley, D.J., Steane, D.A.; Olmstead, R.G. (2010). Further disintegration and redefinition of *Clerodendrum* (Lamiaceae): Implications for the understanding of the evolution of an intriguing breeding strategy. *Taxon*, 59 (1): 125–133.
- Zheng, S., Henken, B., Sofiari, E., Jacobsen, E., Krens, F.A. (1998). Factors influencing induction, propagation and regeneration of mature zygotic embryo-derived callus from *Allium cepa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53: 99–105.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Hayati Ortaeskinazi
Doğum Tarihi : 03.05.1964
Doğum Yeri : İstanbul
Ünvanı : Beyin ve Sinir Cerrahisi Uzmanı
Görev Yeri : Özel Bartın Yaşam Tıp Merkezi
İş Adresi : Kırtepe Mah. 168. Cad. No:9a
74100/Bartın

Eğitim Durumu

Uzmanlık Eğitimi : Bakırköy Ruh ve Sinir Hastalıkları Hastanesi (1990-1996)
Fakülte : İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp F(1983-1990) Dp.Nt:80.30
Ortaokul-Lise : İstanbul Alman Lisesi (1975-1983)
İlkokul : Işık Lisesi İlkokulu (1970-1973)
Özel Dost İlkokulu (1973-1975)

Bitirdiği Diğer Fakülteler :

Anadolu Ü. İktisat Fakültesi (1993-1997) Dipl. Notu:78
Anadolu Ü. Büro Yönetimi (1997-1999) Dipl. Notu:80
Anadolu Ü. Turizm ve Otelcilik (1999-2001) Dipl. Notu:83
Anadolu Ü. İşletme Fakültesi (2001-2003) Dipl. Notu:76
Anadolu Ü. Veteriner Sağlık(2005-2007)Dipl.Notu:87.53(A)
Anadolu Ü. Halkla İlişkiler (2007-2009) Dipl. Notu:75(A)
Anadolu Ü. Fotoğrafçılık (2012-2014)Dipl. Notu:3.94(A)
Anadolu Ü. Türk Dili Ve Edebiyatı (2014-...)

Yabancı Dil

İngilizce (KPDS: 94, ÜDS: 93,750)
Almanca (KPDS: 91)
Fransızca (KPDS: 71)
İspanyolca(KPDS:60)
Rusça(A1)

| | |
|-----------------------------|--|
| Yurtdışı Stajları | <p>1) Universitaetsklinik Eppendorf -Hamburg (1987) Genel Cerrahi ve Organ Transplantasyonu</p> <p>2) U. d'Alcala Hospital General Insalud –Guadalajara (1988) Genel Cerrahi ve Nöroşirürji</p> <p>3) Medizinische Hochschule Hannover (1989) Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi ve El Cerrahisi</p> |
| Verilen Dersler | <p>1. Fiziyojji, Bartın Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 2013-2014 bahar yarıyılı</p> <p>2. İnsan Genetiği ve Kalıtsal Hastalıklar, Bartın Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 2014-2015 güz yarıyılı</p> |
| Mikroşirürji Eğitimi | Bakırköy Ruh ve Sinir Hastalıkları Hastanesi, 1995-1996 |
| Mesleki Deneyim | <p>-1990-1996 Bakırköy Ruh ve Sinir Hastalıkları Hastanesi'nde beyin ve sinir cerrahisi uzmanlık eğitimi</p> <p>-Ocak- Kasım1996'da Bakırköy Ruh ve Sinir Hastalıkları Hastanesi'nde nöroşirürji uzmanı</p> <p>- 1996'da Bartın ilinde ilk nöroşirürji kliniğini kurdu.</p> <p>-1996-2013 Bartın Devlet Hastanesi'nde travma, intrakranial tümörler, spinal cerrahi, stabilizasyon, pediatrik nöroşirürji, periferik sinir cerrahisi, şant prosedürleri, mikrocerrahi vs. alanlarda 9000'i aşkın nöroşirürjikal girişim</p> <p>-2014-2015 Bartın Özel Yaşam Tıp Merkezi nöroşirürji uzmanı</p> |
| Başarılan Sınavlar | <p>FMGEMS Basic Science (1990): 78</p> <p>Sağlık Bakanlığı Yabancı Dil Sınavı (1997): 95</p> |
| Takdirname | 09.03.2010 Sağlık Bakanlığı Yılın Doktoru Ödülü |

Tabip Odası Çalışmaları

Bartın Tabip Odası Başkanlığı (2001)

Bartın Tabip Odası Denetim Kurulu Başkanlığı
(1999-2000 ve 2000-2001 dönemleri)

Bartın Tabip Odası Onur Kurulu Üyeliği (2002-2015)

Katıldığı Uluslararası Kongreler

- 1) 11 th International Congress of Neurological Surgery, Amsterdam (1997)
- 2) 4 th International Congress on Spine Surgery, İzmir (1996)
- 3) 3 rd International Bakırköy Days (1996)
- 4) World Federation of Neurosurgical Societies Educational Course, Antalya (1994)
- 5) 2 nd International Bakırköy Days (1993)
- 6) 1 st International Bakırköy Days (1990)
- 7) 2 nd Congress of the Mediterranean Society of Therapy (1986)

Yurtdışı Yayınlar

- 1) Ortaeskinazi H., Postalıcı L., Kepoğlu Ü., Oral Z., Spinal Meningiomas, Chir Organi Mov, 1998; 83(1-2):191-195
- 2) Ortaeskinazi H., Kepoğlu Ü., Postoperative Intracranial Hematomas, Clinical Neurology and Neurosurgery, 1997, Vol:99, Issue: 1001: 59-60
- 3) Kepoğlu Ü., Ortaeskinazi H., Effect of Egb 761 in Experimental Acute Spinal Cord Injuries, Clinical Neurology and Neurosurgery, 1997, Vol:99, Issue: 1001: 143

Yurtdışı Bildiriler

- 1) Postoperative Intracranial Hematomas, Ortaeskinazi H., Kepoğlu Ü., 11 th International Congress of Neurological Surgery, Amsterdam (1997), poster bildiri
- 2) Effect of Egb 761 in Experimental Acute Spinal Cord Injuries, Kepoğlu Ü., Ortaeskinazi H., 11 th International Congress of Neurological Surgery, Amsterdam (1997), poster bildiri

Katıldığı Ulusal Kongreler ve Eğitimler

- 1) Liderlikte İletişim Eğitim Pr. CTS(2013)
- 2) TS EN ISO 9001 Kalite Yönetim Sistemi Temel E.(2011)
- 3) TS EN ISO 9001 Kalite Yönetim Sistemi İç Tet. E.(2011)
- 4) T.C. Sağlık Bakanlığı CPR Eğ.(2010)
- 5) Türk Nöroşirürji Derneği 24. Bilimsel Kongresi (2010)
- 6) Türk Nöroşirürji Derneği 23. Bilimsel Kongresi (2009)
- 7) Kafa Travmasında Güncel Kavramlar Sempozy.(2006)
- 8) Spinal ve Periferik Sinir Cerrahisi Yaz Okulu(2006)
- 9) Türk Nöroşirürji Derneği 20. Bilimsel Kongresi (2006)
- 10) TCSağlık Bakanlığı Hasta Hakları Uygulamaları E(2005)
- 11) New Technological Developments in Health Care (2005)
- 12) Servikal Dejeneratif Disk Hastalığı Kongresi (1999)
- 13) 3.Uluslararası Bakırköy Günleri Nöroşirürji(1997)
- 14) Servikal Dejeneratif Disk Hastalığı Kongresi (1999)
- 15) Omurga Cerrahisi, Türk Nöroşirürji Derneği Sonbahar Sempozyumu (1996)
- 16) Amerikan Hastanesi Spinal Cerrahi Toplantısı (1996)
- 17) Orbita Tümörleri, Türk Nöroşirürji Derneği Sonbahar Sempozyumu (1995)
- 18) Türk Nöroşirürji Derneği 9. Bilimsel Kongresi (1995)
- 19) Kranial Endovasküler Girişimler, Türk Nöroşirürji Derneği Sonbahar Sempozyumu (1994)
- 20) Türk Nöroşirürji Derneği 7. Bilimsel Kongresi (1993)
- 21) Pediyatrik Nöroşirürji, Türk Nöroşirürji Derneği Sonbahar Sempozyumu (1993)
- 22) Kafa Kaidesi Cerrahisi ve Stereotaktik Nöroşirürji, İstanbul Tıp Fakültesi 5. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu (1992)
- 23) Spinal Kord Travmaları, Türk Nöroşirürji Derneği Sonbahar Sempozyumu (1992)
- 24) 1. BARİLEM GÜNLERİ (1992)

Yurtiçi Yayınlar ve Bildiriler

- 1) Spinal Meningiomas, Postalıcı L., Ortaeskinazi H., Kepoğlu Ü., Sözlü Bildiri, 4th International Congress on Spine Surgery, 1996
- 2) Cervical Discopaties and Degenerative Disease, Kepoğlu Ü., Şentürk İ., Tutkan İ., Arslan B., Tatarlı N., Ortaeskinazi H., Bilgiç S., Oral Z., Sözlü Bildiri, 4th International Congress on Spine Surgery, 1996
- 3) Spinal Mass Lesions, Kepoğlu Ü., Arslan B., Şentürk İ., Tutkan İ., Ortaeskinazi H., Dülgeroğlu Ö., Karakaya B., Oral Z., Poster Bildiri, 4th International Congress on Spine Surgery, 1996
- 4) Meningomiyelosellerde Rotasyon Flebi ve Lumboperitoneal Şant Uygulaması, Kepoğlu Ü., Ortaeskinazi H., Postalıcı L., Oral Z., Bilgiç S., Poster, Türk Nöroşirürji Derneği 10. Bilimsel Kongresi (1996)
- 5) Stereotaktik Girişimler, Ortaeskinazi H., Keşmer K., Kepoğlu Ü., Karakaya B., Oral Z., Bilgiç S., Poster, Türk Nöroşirürji Derneği 10. Bilimsel Kongresi (1996)
- 6) Subdural Hematomlar, Keşmer K., Ortaeskinazi H., Kepoğlu Ü., Oral Z., Poster, Türk Nöroşirürji Derneği 10. Bilimsel Kongresi (1996)
- 7) Posterior Fossa Tümörleri, Kepoğlu Ü., Bozkurt G., Ortaeskinazi H., Oral Z., Poster, Türk Nöroşirürji Derneği 10. Bilimsel Kongresi (1996)
- 8) Servikal Disk ve Dar Kanal Patolojilerinde Cerrahi Tedavi, Kepoğlu Ü., Tutkan İ., Şentürk İ., Arslan B., Dülgeroğlu Ö., Ortaeskinazi H., Bilgiç S., Oral Z., Poster, Türk Nöroşirürji Derneği 10. Bilimsel Kongresi (1996)
- 9) Dorsolomber İnstabilite, Kepoğlu Ü., Bilgiç S., Oral Z., Arslan B., Ortaeskinazi H., Tutkan İ., Keşmer K., Postalıcı L., Poster, Türk Nöroşirürji Derneği 10. Bilimsel Kongresi (1996)

- 10) Beyin Abselerinde Tedavi Sonuçları, Sözlü Bildiri, Ortaeskinazi H., Türk Nöroşirürji Derneği 9. Bilimsel Kongresi (1995)
- 11) Servikal Disk ve Dar Kanal Patolojilerinde Cerrahi Tedavi, Serbest Bildiri, Oral Z., Elmacı İ., Bozkurt G., Bilgiç S., Karakaya B., Karakuş A., Ortaeskinazi H., Türk Nöroşirürji Derneği 8. Bilimsel Kongresi (1994)
- 12) Çocukluk ve Adolesan Çağında Kolelitiazis, Olgu Bildirimi, Köksoy F., Güven A., Ortaeskinazi H., Soybir G., Aker Y., Taksim Hastanesi Tıp Bülteni, Vol.22, pp 57-59 , 1992
- 13) Meme Anomalileri, Koç İ., Tunçel M., Aker Y., Ortaeskinazi H., Taksim Hastanesi Tıp Bülteni, Vol.21, pp 49-52, 1991
- 14) Seftriaksonun Klinik Uygulamada Kırk Olgudaki Değerlendirilmesi, Aker Y., Köksoy F., Soybir G., Köse H., Ortaeskinazi H., Taksim Hastanesi Tıp Bülteni, Vol.21, pp 90-91 , 1991
- 15) Diabetes Mellituslu Hastalarda Serebrovasküler Hastalık, Tireli H., Baybaş S., Yılmaz N., Aysal F., Ortaeskinazi H., Demir H., IV. Nöroloji Kongresi, 1991

İletişim

Telefon no. : İş: 0378-2288080
Ev: 0378-2283344
Cep: 0532-5124104

e-posta : hortaeskinazi@yahoo.com

Tarih : 24/06/2015