

***BRYUM CAPILLARE* HEDW., *SPHAGNUM PALUSTRE* L. VE *THAMNOBRYUM ALOPECURUM* (HEDW.) GANGULEE’NİN DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMLERİYLE ÇOĞALTILMASI, BİYOLOJİK AKTİVİTE VE FENOLİK İÇERİKLERİNİN TESBİTİ**

Yasin HAZER

**Bülent Ecevit Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalında
Doktora Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

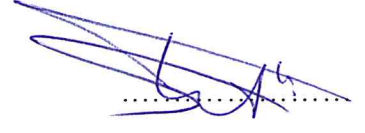
ZONGULDAK

Mart 2015

KABUL:

Yasin HAZER tarafından hazırlanan "*BRYUM CAPILLARE* HEDW., *SPHAGNUM PALUSTRE* L. VE *THAMNOBRYUM ALOPECURUM* (HEDW.) GANGULEE'NİN DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMLERİYLE ÇOĞALTILMASI, BİYOLOJİK AKTİVİTE VE FENOLİK İÇERİKLERİNİN TESBİTİ" başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 03/02/2015

Başkan : Doç. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN
Bülent Ecevit Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN
Gazi Üniversitesi



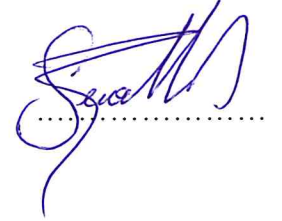
Üye : Yrd. Doç. Dr. Gülsüm YALDIZ
Abant İzzet Baysal Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. Muhammet ÖREN
Bülent Ecevit Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. Şenol ALAN
Bülent Ecevit Üniversitesi



ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım./..../2015


Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”


Yasin HAZER

ÖZET

Doktora Tezi

***BRYUM CAPILLARE* HEDW., *SPHAGNUM PALUSTRE* L. VE *THAMNOBRYUM ALOPECURUM* (HEDW.) GANGULEE’NİN DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMLERİYLE ÇOĞALTILMASI, BİYOLOJİK AKTİVİTE VE FENOLİK İÇERİKLERİNİN TESBİTİ**

Yasin HAZER

Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN

Şubat 2015, 127 sayfa

Bu çalışmada *Bryum capillare* Hedw., *Sphagnum palustre* L. ve *Thamnobryum alopecurum* (Hedw.) Gangulee türlerinin *in vitro* doku kültürü, antioksidan aktivitesi, total fenol içeriği ve 12 fenolik bileşik standardı kullanılarak HPLC-UV analiziyle kantitatif miktar tayininin yapılması amaçlandı. *B. capillare* ve *T. alopecurum* türlerinin olgun kapsüllerinin sporları ve gametofitin uç sürgünleri kullanılarak, *S. palustre*’nin ise sporofit evresine rastlanmadığından yalnızca gametofitin kapitulum kısımları kullanılarak *in vitro* kültürleri yapıldı. 8 farklı modifiye MS (Murashige and Skoog 1962) besin ortamına (farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ve/veya şeker eklenerek) ekimi yapılan bu üç türün *in vitro* doku kültürü ile rejenerasyonları başarıyla sağlandı. *B. capillare* spor kültürü ve gametofit kültüründe en iyi büyüme gösteren ortam MS₃ (30 g/l sakkaroz, 0,5 mg/l kinetin, 0,5 mg/l 2,4 D)’tür. *S. palustre* gametofit kültüründe en iyi büyümenin görüldüğü ortam MS₁ (şekersiz, bitki büyüme düzenleyicisiz)’dir.

ÖZET (devam ediyor)

T. alopecurum spor kültüründe en iyi büyümenin gerçekleştiği ortam MS₃ (30 g/l sakkaroz, 0,5 mg/l kinetin, 0,5 mg/l 2,4 D) iken gametofit kültüründe bu ortam MS₁ (bitki büyüme düzenleyicisiz ve şekerli)'dir. Üç türün doğadan toplanan taze örneklerinin antioksidan aktivitesi, DPPH (2,2 difenil 1, pikril hidrazil) serbest radikali giderim aktivitesi metoduyla, total fenol miktarı ise Folin-Ciocalteu metoduyla yapılmıştır. BHT (bütil hidroksitoluen), BHA (bütil hidroksianisol) ve askorbik asit ile bu üç türün antioksidan aktivitesi karşılaştırıldığında en yüksek DPPH serbest radikali giderme aktivitesi %85 civarında *B. capillare*'de görüldü. Total fenol içeriği bakımından gallik asit eşdeğerine göre en yüksek *B. capillare* ekstraktının ortalama 0,034±0,004 mg/g, *S. palustre* 0,032±0,004 mg/g ve *T. alopecurum* ise 0,0065±0,0015 mg/g içeriğe sahip olduğu saptanmıştır. Üç türün doğadan Kasım ve Mayıs (2012) aylarında toplanmış taze örnekleri, farklı tarihlerde toplanmış *B. capillare* ve *T. alopecurum* herbaryum örnekleri ile *in vitro* doku kültürü ile üretilen örnekler arasında 12 farklı fenolik bileşiğin (gallik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, taksifolin, rosmarinik asit, kaempferol, genistein, quercetin, biokanin A, daidzein, formononetin, şikimik asit) HPLC-UV ile kantitatif tayinleri yapıldı. Türler arasında 12 farklı bileşikte en yüksek miktarı veren tür *B. capillare* oldu. *B. capillare* spor kültüründe en yüksek miktarda MS₄ ortamında şikimik asit 261,65±21,84 mg/g, gametofit kültüründe en yüksek miktarda MS₆ ortamında şikimik asit 220,4±17,3 mg/g, herbaryum örneklerinde ise en yüksek miktarda 9. ayda toplanan ekstraktlarında gallik asit 1,20±0,4 mg/g. *S. palustre* gametofit, *T. alopecurum* spor ve gametofit kültürlerinde en yüksek miktarda şikimik asit sırasıyla MS₄ 251,88±88,3 mg/g, MS₈ 120,92±41,4 mg/g, MS₁ 118,6±47,7 mg/g ortamlarında saptanmıştır. Ancak herbaryum örneklerinde ise en yüksek miktarda 4. ayda toplanan ekstraktlarında şikimik asit 3,52±1,84 mg/g olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre bu üç tür, etkin bir şekilde *in vitro* kültür ortamlarında üretildi ve ayrıca fenolik bileşikler yönünden zengin ve dikkate değer antioksidan aktiviteye de sahip oldukları saptandı.

Anahtar Sözcükler: *Bryum capillare*, *Sphagnum palustre*, *Thamnobryum alopecurum*, *in vitro* Doku Kültürü, Antioksidan Aktivite, Total Fenol İçeriği

Bilim Kodu: 401.03.00

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PROPAGATING OF *BRYUM CAPILLARE* HEDW., *SPHAGNUM PALUSTRE* L. VE *THAMNOBRYUM ALOPECURUM* (HEDW.) GANGULEE WITH TISSUE CULTURE METHODS, IDENTIFYING BIOLOGICAL ACTIVITY AND PHENOLIC CONTENT

Yasin HAZER

Bülent Ecevit University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Hatice ÇÖLGEÇEN

February 2015, 127 pages

In this study, it is aimed to find out the quantitative amount of *Bryum capillare* Hedw., *Sphagnum palustre* L. ve *Thamnobryum alopecurum* (Hedw.) Gangulee species, which have important roles in the ecosystem, via HPLC-UV analysis by using the *in vitro* tissue culture, antioxidant activity, total phenol content and 12 phenolic compound standart. For *in vitro* cultures, spores of the mature capsules and apical shoots of gametophyte of *B. capillare* and *T. alopecurum* species were used, whereas for *S. palustre* L. species only the capitulum parts of gametophyte were used due to the fact that its sporophytes stage of was not seen. Through *in vitro* tissue culture, the regeneration of these three species which were cultivated (by adding various concentrations of plant growth regulators and/or sugar) in 8 different modified MS (Murashige and Skoog 1962) nutrient medium was successfully achieved. In *B. capillare* spores culture and gametophyte culture, the medium which showed the best growth was MS₃ (30 g sucrose, 0,5 mg/l kinetin, 0,5 mg/l 2,4 D). In *S. palustre* gametophyte culture, the best growth was observed in MS₁ (plant growth regulator and sugar free) medium. While the best

ABSTRACT (continued)

growth in *T. alopecurum* spores culture was observed in MS₃ (30 g sucrose, 0,5 mg/l kinetin, 0,5 mg/l 2,4 D) medium, in gametophyte culture it was MS₁ (plant growth regulator and sugar free). The antioxidant activity of the fresh samples of these three species that have been collected from nature was done with the DPPH (2,2 diphenyl 1, picryl hydrazyl) free radical scavenging activity method, while their total phenol amount was identified with the Folin-Ciocaltae method. When the antioxidant activity of these three species was compared with BHT (butylated hydroxytoluene), BHA (butylated hydroxyanisole) and ascorbic acid, the highest free radical scavenging effect, nearly about 85%, was seen in *B. capillare*. In terms of total phenol content, according to gallic acid equivalents, it was defined that the highest *B. capillare* extract had an approximate content of 0,034±0,002 mg/g, *S. palustre* 0,031±0,004 mg/g and *T. alopecurum* had the content of 0,0065±0,0015 mg/g on the average. On the fresh samples of three species collected from nature in November and May (2012), the *B. capillare* and *T. alopecurum* herbarium samples collected at different times and the other samples which were grown with *in vitro* tissue culture, 12 different phenolic compounds (gallic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, taxifolin, rosmarinic acid, kaempferol, genistein, quercetin, biochanin A, daidzein, formononetin, shikimic acid) were determined quantitatively by means of HPLC-UV. Among the species in 12 different compounds, *B. capillare* had the highest amount. In *B. capillare* spores culture, the highest amount of shikimic acid was in MS₄ medium 261,65±21,84 mg/g, in gametophyte culture, the highest amount of the same acid was in MS₆ medium 220,4±17,3 mg/g, while in herbarium samples the highest amount of gallic acid collected from the 9-month-old extracts was 1,20±0,4 mg/g. The highest amounts of shikimic acid in *S. palustre* gametophyte culture, *T. alopecurum* spores culture and in gametophyte culture were determined in MS₄ medium 251,88±88,3 mg/g, in MS₈ medium 120,92±41,4 mg/g and in MS₈ medium 120,92±41,4 mg/g respectively. However, in herbarium samples the highest amount of shikimic acid collected from the 4-month-old extracts was seen as 3,52±1,84 mg/g. By means of the obtained results, these three species were found to be rich in phenolic compounds and also with antioxidant activity.

Key Words: *Bryum capillare*, *Sphagnum palustre*, *Thamnobryum alopecurum*, *in vitro* Tissue Culture, Antioxidant Activity, Total Phenol Content

Science Code: 401.03.00

TEŞEKKÜR

Bu çalışma esnasında benden ilgi, öneri ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç.Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN'e (BEÜ) ve Prof. Dr. Güray UYAR'a (GÜ),

Tez süresince çalışmalarımı izleyerek fikir ve tecrübeleri ile çalışmamı yönlendiren değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN'a (GÜ) ve ayrıca tür teşhislerinde yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Muhammet ÖREN'e (BEÜ),

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Hasan ÇABUK'a (BEÜ), Yrd. Doç. Dr. Şevket ATA'ya (BEÜ), Yüksek Biyolog Havva ATAR'a (BEÜ) ve Uzman Kimyager Soner ÇAKAR'a (BEÜ),

Tez çalışmamı yürütmemde kolaylıklar sağlayan, Bülent Ecevit Üniversitesi Yabancı Diller Yüksek Okulu Müdürü Okşan DAĞLI ve Müdür Yardımcısı Eda Baki ZENGİN'e ve ayrıca ingilizce çevirilerimde yardımcı olan Okutman Esin ÖZDEMİR'e,

2012-10-06-12 numaralı “*Bryum capillare* Hedw., *Sphagnum palustre* L. ve *Thamnobryum alopecurum* (Hedw.) Gangulee'nin Doku Kültürü Yöntemleriyle Çoğaltılması, Biyolojik Aktivite ve Fenolik İçeriklerinin Tesbiti” başlıklı proje kapsamında yapılan bu çalışmayı maddi destekleyen Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Bugünlere gelmemde büyük katkıları olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, tezin her aşamasında desteği ve sabrı nedeniyle annem Mümine HAZER ve babam Nazmi HAZER'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
BÖLÜM 1 GİRİŞ	1
1.1 <i>Bryum capillare</i> Hedw. HAKKINDA TANITICI BİLGİLER	5
1.2 <i>Sphagnum palustre</i> L. HAKKINDA TANITICI BİLGİLER	6
1.3 <i>Thamnobryum alopecurum</i> (Hedw.) Gangulee HAKKINDA TANITICI BİLGİLER	7
1.4 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ	8
1.4.1 Bitki Doku Kültüründe Organogenez	11
1.4.2 Bitki Doku Kültüründe Mikroçoğaltım	13
1.4.3 Bitki Hücre Süspansiyon Kültürleri	15
1.4.4 Bitki Doku Kültüründe Sekonder Metabolit Üretimi	15
1.4.5 Besin Ortamında Bulunan Maddeler	16
1.4.5.1 Makro Elementler	16
1.4.5.2 Mikro Elementler	17
1.4.5.3 Vitaminler	17
1.4.5.4 Şekerler	17
1.4.5.5 Jel Yapıcı Maddeler	17
1.4.5.6 Bitki Büyüme Düzenleyicileri	17
1.5 SERBEST RADİKALLER	20

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

1.6 ANTİOKSİDANLAR.....	22
1.6.1 DPPH Serbest Radikali Temizleme Aktivitesi	24
1.7 FENOLİK BİLEŞİKLER	25
1.7.1 Toplam Fenolik Madde Tayini	29
1.8 YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)	30
1.8.1 Hareketli Faz Deposu ve Hareketli Faz	31
1.8.2 Pompa	32
1.8.3 Enjeksiyon Loopu	33
1.8.4 Kolonlar	34
1.8.5 Dedektörler	36
1.8.6 HPLC ile Miktar Tayini	38
BÖLÜM 2 LİTERATÜR ÖZETİ.....	39
2.1 BRYOFİTLERDE YAPILAN <i>in vitro</i> DOKU KÜLTÜRÜ, ANTİOKSİDAN AKTİVİTE, TOTAL FENOL TAYİNİ ve BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARININ ÖZETLERİ	39
BÖLÜM 3 MATERYAL VE METOT	47
3.1 MATERYAL.....	47
3.2 METOD.....	49
3.2.1 Besin Ortamlarının Hazırlanması	49
3.2.1.1 Stok Çözeltiler.....	49
3.2.1.1.1 Major Tuz Stok Çözeltisi (10x), (g/l).....	49
3.2.1.1.2 Minör Tuz Stok Çözeltisi (100x), (mg/l).....	50
3.2.1.1.3 Demir Stok Çözeltisi (100x), (g/l).....	51
3.2.1.1.4 B5 Gamborg Vitamin Stok Çözeltisi (100x),(g/l)	51
3.2.1.1.5 Bitki Büyüme Düzenleyicileri.....	52
3.2.1.1.5.1 2,4 Diklorofenoksi Asetik Asit Stok Çözeltisi (mg/ml)	52
3.2.1.1.5.2 Kinetin Stok Çözeltisi (mg/ml).....	52
3.2.1.1.6 pH Ayarlanması.....	52

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

3.2.1.1.7 Besin Ortamının Sterilizasyonu.....	53
3.2.1.1.8 Laboratuvar Temizliği ve Sterilizasyonu	53
3.2.1.1.9 Kullanılan Malzemenin Sterilizasyonu	53
3.2.1.1.10 Saf Su Sterilizasyonu.....	53
3.2.1.1.11 Eksplant Sterilizasyonu	53
3.2.1.1.12 Ekim Aşaması.....	54
3.2.1.1.13 Ekimi Yapılan <i>in vitro</i> Kültürlerde Karşılaşılan Kontaminasyon Problemi	54
3.2.1.1.14 İnkübasyon ve Alt Kültür İşlemi	54
3.2.1.1.15 İstatistik Analiz.....	54
3.3 DPPH SERBEST RADİKALİ GİDERİM AKTİVİTESİ YÖNTEMİ.....	55
3.3.1 <i>B. capillare</i> , <i>S. palustre</i> ve <i>T. alopecurum</i> Ekstraksiyon Çözeltilerinin Hazırlanması.....	55
3.3.2 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	56
3.3.3 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesinde Kullanılacak Cihaz	57
3.3.4 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesinin UV-Spektrofotometre Okunması.....	57
3.3.5 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesinin Hesaplanması	58
3.4 TOPLAM FENOL MİKTAR TAYİNİ	58
3.4.1 Toplam Fenol Miktar Tayini için <i>B. capillare</i> , <i>S. palustre</i> ve <i>T. alopecurum</i> Ekstraksiyon Çözeltilerinin Hazırlanması.....	58
3.4.2 Toplam Fenol Miktar Tayininde Kullanılacak Cihaz	59
3.4.3 Toplam Fenol Miktar Tayini Çözeltilerinin Hazırlanması	59
3.5 HPLC-UV ANALİZLERİ	60
3.5.1 HPLC-UV Analizleri İçin Farklı Tarihlerde Toplanan <i>B. capillare</i> , <i>S.</i> <i>palustre</i> ve <i>T. alopecurum</i> 'un Herbaryum Örnekleri, Doğadan Toplanan Taze Örnekleri ve 8 Farklı MS Ortamında Yetiştirilen <i>in vitro</i> Kültürlerin Ekstraksiyon Çözeltilerinin Hazırlanması.....	60
3.5.2 HPLC-UV Analizi için Standartların Kromatogramı	61
3.5.3 HPLC Analizlerinde Kullanılan Cihaz ve Kolon Bilgileri	63
3.5.4 HPLC-UV Analizi Gradyent Elüsyon Programları	63

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

BÖLÜM 4 ARAŞTIRMA BULGULARI.....	65
4.1 <i>Bryum capillare</i> , <i>Sphagnum palustre</i> ve <i>Thamnobryum alopecurum</i> 'un <i>in vitro</i> KÜLTÜRLERİNİN 8 FARKLI MS ORTAMINDA BÜYÜME MİKTARLARININ İSTATİSTİKSEL İNCELENMESİ.....	65
4.1.1 <i>B. capillare</i> 'nin <i>in vitro</i> Spor ve Gametofit Kültür Sonuçları	65
4.1.2 <i>S. palustre</i> 'nin <i>in vitro</i> Gametofit Kültür Sonuçları	68
4.1.3 <i>T. alopecurum</i> 'un <i>in vitro</i> Spor ve Gametofit Kültür Sonuçları.....	70
4.2 <i>Bryum capillare</i> , <i>Sphagnum palustre</i> ve <i>Thamnobryum alopecurum</i> 'un DOĞADAN TOPLANAN TAZE ÖRNEKLERİNİN DPPH SERBEST RADİKAL GİDERME AKTİVİTESİ ve TOTAL FENOL TAYİNİ.....	74
4.2.1 DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi	74
4.2.2 Folin-Ciocaltaeu Yöntemine Göre Toplam Fenol Sonuçları.....	75
4.2.3 Fenolik Bileşiklerin Kantitatif olarak HPLC-UV ile Belirlenmesi	76
BÖLÜM 5 SONUÇ TARTIŞMA	103
KAYNAKLAR.....	113
ÖZGEÇMİŞ	127

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>		<u>Sayfa</u>
1.1	Karayosunlarının hayat siklusu.....	2
1.2	<i>Sphagnum</i> sabunu	4
1.2	<i>Bryum capillare</i> ; a- genel görünüş, b- yaprak, c- peristom dişleri.	6
1.3	<i>Sphagnum palustre</i> L. a- genel görünüş b- kapsüllerin görünümü c- gövde yaprağı kesiti d- yaprak enine kesit	7
1.4	<i>Thamnobryum alopecurum</i> ; a- genel görünüş, b- dal yaprağı, c- yaprak ucu, d- yaprak ortası hücreleri	8
1.5	DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü	24
1.6	DPPH radikalinin bir antioksidanla reaksiyonu sonucu indirgenmesi	25
1.7	Fenolik bileşiklerin oluşum yolu.	26
1.8	Fenolik asitlerin Temel Kimyasal Yapısı a) Benzoik asit b) Sinamik asit	27
1.9	Flavonoidlerin C6-C3-C6 iskelet yapısı	28
1.10	Bir HPLC cihazının şematik gösterimi.....	31
3.1	Türkiye'nin kareleme sistemi.	47
3.2	<i>Bryum capillare</i> kapsüllerinden ortamları aktatırlan sporların görüntüleri.....	48
3.3	Türlerin ilk ekimlerine ait görseller a) <i>B. capillare</i> spor kültürü b) <i>B. capillare</i> gametofit apikal uç kültürü c) <i>S. palustre</i> gametofit kapitulum uç kültürü d) <i>T. alopecurum</i> spor kültürü e) <i>T. alopecurum</i> gametofit apikal uç kültürü	49
3.4	BHT çözeltilisinin DPPH ile reaksiyona girdikten sonra aldığı renk	58
3.5	Standartların HPLC-UV kromatogramları (100ppm) (254 nm): (1) gallik asit, (2) kafeik asit, (3) p-kumarik asit, (4) taksifolin, (5) rosmarinik asit, (6) kaemferol, (7) genistein, (8) kuersetin, (9) biokanin A.	62
3.6	Standartların HPLC-UV kromatogramları (250ppm) (254 nm): (1) daidzein (2) formononetin.....	62
3.7	Standartların HPLC-UV kromatogramları (100 ppm) (230 nm): (1) Şikimik Asit.	63

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

4.1	<i>B. capillare in vitro</i> spor kültürü gelişiminin gösterilmesi a, b) 1-2 haftalık; c, d) 3-4 haftalık; e, f) 6-8 haftalık; g, h,) 10-12 haftalık; j, k) 14-16 haftalık; l) 18 haftalık; m, n, o) 20-24 haftalık spor kültürleri; ve <i>in vitro</i> gametofit kültürünün gelişiminin gösterilmesi p) ilk ekim; r, s) 2-4 haftalık; t) 8 haftalık; u, v) 12-16 haftalık; y) 20 haftalık; z) 24 haftalık gametofit kültürleri.....	66
4.2	<i>B. capillare</i> sporlarının farklı MS ortamlarındaki <i>in vitro</i> kültürlerinin 6 aylık ortalama çap büyüme miktarlarının (mm) karşılaştırılması.....	67
4.3	<i>B. capillare</i> gametofit apikal uç <i>in vitro</i> kültürlerinin farklı MS ortamlarındaki 6 aylık ortalama çap büyüme miktarlarının (mm) karşılaştırılması.....	67
4.4	<i>B. capillare</i> spor ve gametofit apikal uç <i>in vitro</i> kültürlerinin MS ₃ ortamındaki aylık ortalama çap büyüme miktarlarının (mm) karşılaştırılması.....	68
4.5	<i>S. palustre in vitro</i> gametofit kültürünün gelişiminin gösterilmesi a) ilk ekim; b, c, d) 2-4 haftalık; e, f) 6-8 haftalık; g, h) 12-16 haftalık; i) 20 haftalık; j) 24 haftalık gametofit kültürleri	69
4.6	<i>S. palustre</i> gametofit kapitulum <i>in vitro</i> kültürlerinin farklı MS ortamlarındaki 6 aylık ortalama çap büyüme miktarlarının (mm) karşılaştırılması.....	69
4.7	<i>S. palustre</i> gametofit apikal uç <i>in vitro</i> kültürlerinin MS ₁ ortamındaki aylık ortalama çap büyüme miktarları (mm)	70
4.8	<i>T. alopecurum in vitro</i> spor kültürü gelişiminin gösterilmesi a, b) 2-4 haftalık; c, d) 8-10 haftalık; e, f) 14-16 haftalık; g) 22 haftalık; ve <i>in vitro</i> gametofit kültürünün gelişiminin gösterilmesi h) ilk ekim; i,j) 8-10 haftalık; k) 20 haftalık gametofit kültürleri	71
4.9	<i>T. alopecurum</i> sporlarından ekimi yapılan kültürlerin farklı ortamlar üzerindeki 6 aylık ortalama büyüme miktarlarının (mm) karşılaştırılması	72
4.10	<i>T. alopecurum</i> gametofit apikal uç eksplantının MS ₁ ortamındaki <i>in vitro</i> kültürünün 6 aylık ortalama çap büyüme miktarı.....	72
4.11	<i>T. alopecurum</i> 'un MS ₃ ortamındaki spor ve MS ₁ ortamındaki gametofit apikal uç eksplantlarının <i>in vitro</i> kültürlerinin aylık ortalama çap büyüme miktarlarının (mm) karşılaştırılması	73
4.12	BHT, BHA, askorbik asidin ve bryofit ekstraksiyonlarının antioksidan aktivitesinin DPPH serbest radikal giderme aktivitesi yüzdelerinin karşılaştırılması.....	74

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

4.13	Toplam fenolik madde tayini için gallik asit standardı kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği.....	75
4.14	Bitki ekstrelerinin ortalama total fenol miktarları grafiği.....	76
4.15	Doğadan toplanan <i>Bryum capillare</i> taze örneğinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standartta HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	78
4.16	<i>Bryum capillare</i> Herbaryum 3. Ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standartta HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	79
4.17	<i>Bryum capillare</i> Herbaryum 9. Ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standartta HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	79
4.18	<i>Bryum capillare in vitro</i> spor kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS ₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standartta HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	80
4.19	<i>Bryum capillare in vitro</i> gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS ₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standartta HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	80
4.20	Doğadan toplanan <i>Bryum capillare</i> taze örneğinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formonetin standardında HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	81
4.21	<i>Bryum capillare</i> herbaryum 3. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formonetin standardında HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	81
4.22	<i>Bryum capillare</i> herbaryum 9. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formonetin standardında HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	82
4.23	<i>Bryum capillare in vitro</i> spor kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS ₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formonetin HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	82
4.24	<i>Bryum capillare in vitro</i> gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS ₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formonetin HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	83
4.25	Doğadan toplanan <i>Bryum capillare</i> taze örneğinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit standardında HPLC-UV kromatogramı (230 nm).....	83
4.26	<i>Bryum capillare</i> herbaryum 3. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit standardında HPLC-UV kromatogramı (230 nm).....	84

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

4.27 <i>Bryum capillare</i> herbaryum 9. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit standardında HPLC-UV kromatogramı (230 nm)	84
4.28 <i>Bryum capillare in vitro</i> spor kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS ₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit HPLC-UV kromatogramı (230 nm).....	85
4.29 <i>Bryum capillare in vitro</i> gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS ₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit HPLC-UV kromatogramı (230 nm).....	85
4.30 Doğadan toplanan <i>Sphagnum palustre</i> taze örneklerinin HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	88
4.31 <i>Sphagnum palustre in vitro</i> gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS ₁ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standart HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	89
4.32 <i>Sphagnum palustre in vitro</i> gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS ₁ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formononetin HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	89
4.33 <i>Sphagnum palustre in vitro</i> gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS ₁ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit HPLC-UV kromatogramı (230 nm).....	90
4.34 Doğadan toplanan <i>Thamnobryum alopecurum</i> taze örneklerinin 9'lu standart HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	93
4.35 <i>Thamnobryum alopecurum</i> herbaryum 4. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standartta HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	94
4.36 <i>Thamnobryum alopecurum in vitro</i> spor kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS ₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standartta HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	94
4.37 <i>Thamnobryum alopecurum in vitro</i> gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS ₁ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standartta HPLC-UV kromatogramı (254 nm)	95
4.38 Doğadan toplanan <i>Thamnobryum alopecurum</i> taze örneğinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formononetin standardında HPLC-UV kromatogramı (254 nm)	95

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

4.39	<i>Thamnobryum alopecurum</i> herbaryum 4. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formonetin standardında HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	96
4.40	<i>Thamnobryum alopecurum</i> herbaryum 7. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formonetin standardında HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	96
4.41	<i>Thamnobryum alopecurum in vitro</i> spor kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS ₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formonetin HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	97
4.42	<i>Thamnobryum alopecurum in vitro</i> gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS ₁ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formonetin HPLC-UV kromatogramı (254 nm).....	97
4.43	Doğadan toplanan <i>Thamnobryum alopecurum</i> taze örneğinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit standardında HPLC-UV kromatogramı (230 nm).....	98
4.44	<i>Thamnobryum alopecurum</i> herbaryum 4. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit standardında HPLC-UV kromatogramı (230 nm).....	98
4.45	<i>Thamnobryum alopecurum</i> herbaryum 7. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit standardında HPLC-UV kromatogramı (230 nm).....	99
4.46	<i>Thamnobryum alopecurum in vitro</i> spor kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS ₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit HPLC-UV kromatogramı (230 nm).....	99
4.47	<i>Thamnobryum alopecurum in vitro</i> gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS ₁ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit HPLC-UV kromatogramı (230 nm).....	100

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>		<u>Sayfa</u>
1.1	<i>Bryum capillare</i> Hedw.'nin bilimsel sınıflandırması	5
1.2	<i>Sphagnum palustre</i> L.'nin bilimsel sınıflandırması.....	7
1.3	<i>Thamnobryum alopecurum</i> (Hedw.) Gangulee'nin bilimsel sınıflandırması	8
1.4	Bitki Doku Kültürünün Tarihsel Gelişimi	11
1.5	Bitki büyüme düzenleyicilerinin gruplandırılması	19
1.6	Bazı radikaller ve reaktifler	22
1.7	Antioksidanların sınıflandırması.....	24
1.8	HPLC-UV analizlerinde kullanılan fenolik bileşikler ve formülleri	28
3.1	<i>In vitro</i> doku kültüründe kullanılan 8 farklı MS ortam içeriği	48
3.2	MS ortamlarında kullanılan majör tuzlar.....	50
3.3	MS ortamlarında kullanılan minör tuzlar.....	51
3.4	MS ortamlarında kullanılacak demir stoğu.....	51
3.5	MS ortamlarında kullanılacak B5 Gamborg vitamin stoğu.....	52
3.6	12 farklı standart fenolik bileşiğin alıkonma zamanları	61
3.7	Farklı 9 standardın (gallik asit, kefeik asit, <i>p</i> -kumarik asit, taksifolin, rosmarinik asit, kaempferol, genistein, kuersetin ve biokanin A) HPLC-UV gradiyent elüsyon programı	64
3.8	Daidzein + Formononetin standartlarının HPLC-UV gradiyent elüsyon programı	64
3.9	Şikimik asit standardının HPLC-UV gradiyent elüsyon programı.....	64
4.1	Yüksek antioksidan aktiviteleri olduğu bilinen BHT, BHA, askorbik asidin ve bryofit türleri ekstraksiyon DPPH serbest radikal giderme aktivitesi yüzdeleri	74
4.2	Bitki ekstrelerinin ortalama total fenol miktarları	75
4.3	<i>B. capillare</i> 'nin taze örnekleri, herbaryum örnekleri ve <i>in vitro</i> kültür örneklerinin HPLC-UV analizleri sonucu bulunan fenolik bileşik miktarları.....	86
4.4	<i>S. palustre</i> 'nin taze örnekleri ve <i>in vitro</i> kültür örneklerinin HPLC-UV analizleri sonucu bulunan fenolik bileşik miktarları	91

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam ediyor)

- 4.5 *T. alopecurum*'un taze örnekleri, herbaryum örnekleri ve *in vitro* kültür örneklerinin HPLC-UV analizleri sonucu bulunan fenolik bileşik miktarları..... 101

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2,4-D	: Diklorofenoksiasetik asit
BAP	: Benzilaminopürin
BA	: Benziladenin
KIN	: Kinetin
2iP	: izo pentil adenin
TDZ	: thidiazuron
IBA	: indol butirik asit
IAA	: indol asetik asit
2,4-D	: 2,4-diklorofenoksi asetik asit
NAA	: naftalen asetik asit
Pikloram	: 4-amino-3,5,6-trikloropikolinik asit
GA3	: Gibberellik asit
vd.	: Ve diğerleri
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
g	: Gram
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
O ₂ ⁻	: Süperoksit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
NaOCl	: Sodyum hipoklorit)
NaDCC	: Sodyum dikloroizosiyanürat

KISALTMALAR

MS	: Murashige and Skoog (1962)
B5	: Gamborg Vitamin (1968)

BÖLÜM 1

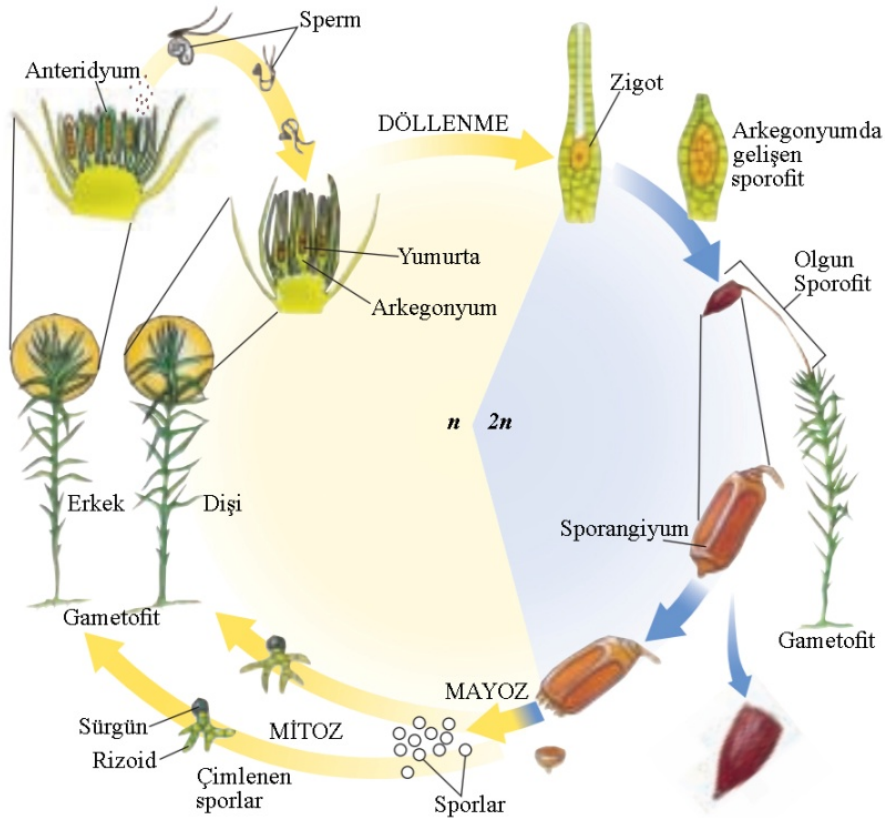
GİRİŞ

Bryofitler, tohumlu bitkilerden sonra bitkiler aleminin en büyük ikinci grubunu oluşturur. Daha önce Bryophyta bölümü altında üç sınıfta incelenen bryofitler, yapılan moleküler filogeni çalışmalarıyla, Bryobiotina alt alemi (subkingdom) altında, 3 bölümde (divisio) ele alınmasının daha doğru olacağı ortaya konmuştur. Bu bölümler; Bryophyta (karayosunları, yaklaşık 13.000 tür), Marchantiophyta (ciğerotları, yaklaşık 5.000 tür), Anthocerotophyta (boynuzotları, yaklaşık 150 tür)'dan oluşmaktadır (Glime 2009, Goffinet and Shaw 2009, Ören 2010). Türkiye bryofit florasına bakıldığında, 776 karayosunu, 177 ciğerotu, 4 boynuzsu ciğerotu yayılış göstermektedir (Abay 2014).

Bryofitlerde genel olarak, haplodiplont döl almaşı görülür. Hayat döngüsünde haploit (n) gametofiti, diploit (2n) sporofit takip etmektedir. Karasal bitkiler içerisinde vasküler bitkilerin aksine hayat döngülerinde gametofitin dominant olduğu tek bitki grubu bryofitlerdir (Vanderpoorten and Goffinet 2009).

Doğada yeşil olarak dikkat çeken kısımları gametofitlerdir ve ortama alt kısımda oluşan tek veya çok hücreli kök benzeri yapılarla (rizoit) tutunurlar. Gametofitin gövde kısmı, vasküler sistemden ve diğer bazı özelliklerden yoksun olduğundan gövdemsi yapı kaulit, yapraklar ise gerçek bir yaprağın özelliklerini taşımadığı için fillit (yapraksı yapı) olarak isimlendirilir. (Wyatt 1985). Gametofit üzerinde yer alan anteridyumlarda üretilen erkek gametler (sperm), arkegonyumlarda üretilen dişi gameti (yumurta) döllenmek için suya bağımlıdır. Erkek gamet, yağmur suları veya üstlerinden akan su içinde hareket ederek kemotaksi ile ulaşır ve dişi gameti döller. Döllenme arkegonyumda meydana gelir, oluşan zigot mitozla embriyoyu oluşturur oda gelişerek sporofiti meydana getirir. Sporofit gelişerek, arkegonyumunu enine ayırır ve üst kısmı ile yükselir. Sporofitin üst kısmına kaliptra adı verilir ve sporofit olgunlaştığında düşer. Olgun bir sporofit, gametofitten minerallerin ve suyun alındığı ayak, yukarı doğru uzayan seta (kapsül sapı), kapsül ve kapsülü örten kaliptradan oluşur.

Sporangiumlarda oluşan spor ana hücreleri ($2n$), mayoz bölünme geçirerek sporları (n) oluşturur. Oluşan sporlar bryofit gruplarında farklı dağılım mekanizmaları gösterir. Genelde olgunlaşan sporlar kurak dönemlerde ortama dağılırlar. Sporlar düştükleri ortamlarda şartlar çimlenmeye uygun olduğunda ipliksi yapılar oluşarak protonemal evre başlar. Protonema, karayosunuları hayat siklusunun haploid safhasındaki ilk evredir. Gerçek karayosunuları sınıfında (Bryopsida) haploid sporlar çimlendiğinde 2 ipliksi yapı olan kloronema ve kaulonema oluşur. Kloronema, çimlenen spor ile oluşan ilk ipliksi yapıdır. Hücreleri bol sayıda dairesel kloroplastlıdır ve renksiz hücre duvarları ipliksi uzun aksise dikey yönlüdür. Ayrıca düzensiz dallanmalarıyla ayırt edilirler. Kaulonema hücreleri ise kloronemaya göre kloroplastları nispeten uzun ve hücre duvarları obliktir. Protonema evresi geliştikçe kaulonema hücreleri sürgünler geliştirerek sürgün apikal hücrelerini oluşturur ve sonrasında bu yapılar gelişerek gametofiti meydana getirir (Şekil 1.1) (Jang and Dolan 2011). Gerçek karayosunularından farklı olarak Sphagnopsida sınıfında kloronema ve kaulonema oluşumu gözlenmez. Diğer karayosunularından bir çok yönüyle farklılık gösteren bu sınıfta sporlar çimlendiğinde ilk olarak tallus ve ipliksi protonema oluşur ve ardından sınırsız apikal büyüme gösteren gametoforlar gelişir (Beike et al. 2014).



Şekil 1.1 Karayosunularının hayat siklusunu (Raven and Johnson 2001)'den değiştirilerek.

Bryofitler klorofil-a, klorofil-b, ksantofil ve karoten ihtiva etmekte, hücre çeperleri ise selüloz içermektedir. Sporofit ve gametofit ligninleşmiş doku içermemektedir. Fotosentez, su ve minerallerin alınmasını tüm yüzeyleri ile yaparlar. Bryofitlerin yapraklarında stomaları olmadığından su kaybını ve gaz değişimini kontrol edemediklerinden poikilohidrik (su durumlarını çevrenin nem durumuna göre ayarlayabilen) bitkilerdir. Gelişmiş bir iletim sistemleri olmadığından suyun taşınmasında rol oynayan yüzeysel kapiller sisteme sahiptirler. Eşeyssel dağılımları sporofitlerde üretilen sporlarla olmaktadır. Bir çok bryofit türü bu yüzden geniş alanlara dağılabilmektedirler. Bryofitlerde üreme için mutlak suya gereksinim vardır. Döllenmenin gerçekleşmesi için spermilerin su ile arkegoniyuma taşınması gerekir. Bu yüzden döllenme genelde yakın mesafedeki bitkiler arasında olabilmektedir (Glime 2009, Goffinet and Shaw 2009, Ören 2010).

Bryofitlerin en büyük grubu olan karayosunları diğer gruplarla karşılaştırıldığında çok sayıda yapısal çeşitlilik göstermelerinin yanı sıra evrimsel olarak da daha gelişmişlerdir. Bu grubun en önemli karakteristik özelliği, türlerin çoğunda sporların dağılımında rol oynayan ve dağılımı kontrol eden higroskopik (nemi seven) peristom dişlerine sahip olmasıdır (Glime 2009).

Karayosunları görünüm olarak akrokarp ve pleurokarp karayosunları olarak iki büyük gruba ayrılırlar. Akrokarp karayosunu olan *Bryum capillare* ve *Sphagnum palustre*, gametofit substrata dik olarak bulunur, sporofit ise gametofitin veya ana dalların uç kısmında yer alır. Pleurokarp karayosunu olan *Thamnobryum alopecurum*'da ise gametofit genellikle substrata paralel olarak gelişir ve ikincil gövdelere veya yan dallara sahiptir. Sporofit ana gövde veya dallar üzerinde küçük tomurcuk benzeri yan dallarda gametofite dik olarak bulunur. *Fontinalis* gibi karayosunu türleri kladokarp özellik göstermektedir ve gametangiyumları kısa yan dallar üzerindedir (Smith 2004).

Karayosunları iyon değişim mekanizmaları, pürüzlü yüzeysel yapıları, havadaki partiküllerin alıkonulmasını sağlamaları, yıl içerisinde bulunabilmelerinin kolay olması, ihtiyaçlarından daha yüksek seviyelerde metal biriktirebilmeleri gibi çeşitli özelliklere sahip olmasından dolayı gelişmiş ülkelerde uzun yıllardan beri hava ve su kirliliği haritalarının çıkarılmasında biyomonitör olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda ülkemizde de biyomonitör karayosunları kullanılarak atmosferik ağır metal kirliliği çalışmaları yapılmaktadır (Uyar et al. 2007a, b, 2008, 2009, Ören 2010).

Geçmişten günümüze bryofitlerinin günlük hayatta kullanım alanları incelendiğinde *Loeskeobryum brevirostre* (Brid.) M. Fleisch. türü geçmişte sargı bezi olarak *Hypnum* türleri ise kesici aletlerin paketlenmesinde kullanılmıştır. *Polytrichum commune* Hedw. tıp ve eczacılık alanında antiseptik madde olarak kullanılmaktadır (Ezer 2008). Ayrıca torf yosunu olan *Sphagnum palustre* L.'nin yüksek oranda nem tutması ve toprak kalitesini arttırmasından dolayı günümüzde seracılık, saksı ve kesme çiçekçilik sektöründe hala kullanılmaktadır. Bryofitler içerisinde ekonomik açıdan en çok faydalanılmış bir tür olan *Sphagnum* geçmişte, ayakkabı tabanında, çizmelerdeki nem ve artan kokuyu emmede ayrıca Almanya'da ucuz giysiler hazırlamak için yünlerle birlikte karıştırılarak kullanılmıştır. I. Dünya savaşı sırasında yüksek su ve nem tutma kapasitesinden ve antiseptik özelliğinden dolayı sargı bezi yapımında da kullanılmıştır. Geçmişte *Sphagnum*'lardan üretilen sphagnol; egzema, sedef hastalığı, kaşıntı, hemoroid, uyuz, sivilce ve deri hastalıklarının tedavisinde ve ayrıca böcek ısırılmalarından doğan tahrişleri azaltmak için de kullanılmıştır (Şekil 1.2). Kendi ağırlığının 30 katına kadar su tutabilen *Sphagnum*'un ticari üretimi Amerika'da 150 yılı aşkın süredir devam etmektedir. Taze sebze ve çiçeklerin nakliyesinde, kök ve çiçek soğanlarının depolanmasında iyi bir materyaldir. *Sphagnum* turbaları özellikle kuzey ülkelerinde düşük sülfür içeriği ve yüksek ısı değeri nedeniyle yakıt olarak kullanılmaktadır (Abay 2006, Saxena and Harinder 2004). Ülkemizde bryofitlerden ekonomik olarak çok fazla faydalanılmamaktadır. Çiçekçilik sektöründe, süs eşyalarının yapımında ve mağazalardaki vitrinlerin düzenlenmesinde dekorasyon amaçlı kullanıldıkları bilinmektedir.



Şekil 1.2 *Sphagnum* sabunu (<http://www.sciencemuseum.org.uk>)

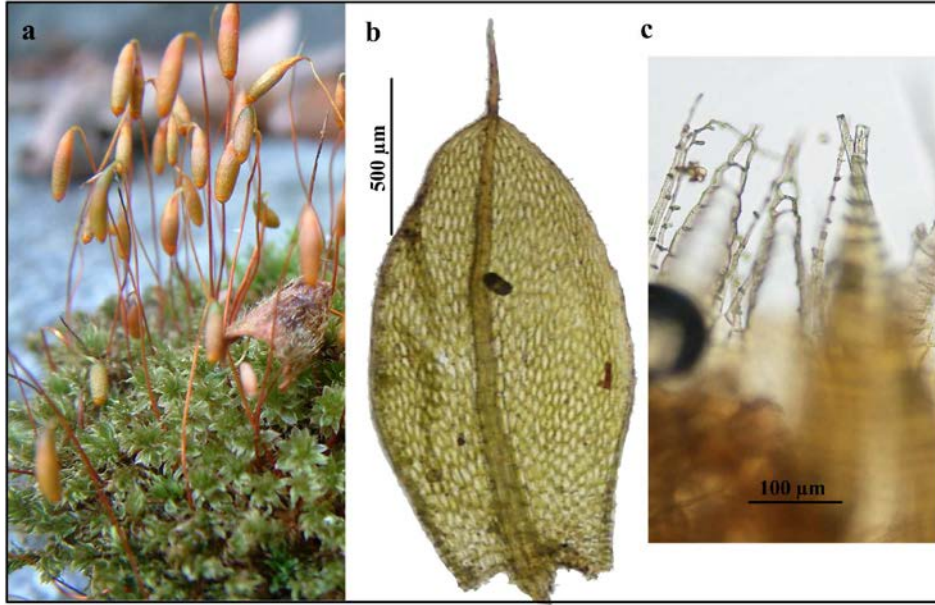
1.1 *Bryum capillare* Hedw. Hakkında Tanıtıcı Bilgiler

Bryaceae familyasında yapılan moleküler çalışmalar neticesinde *Bryum capillare* Hedw., Akdeniz ülkeleri karayosunu kontrol listesi (2013)'ne göre *Ptychostomum capillare* (Hedw.) Holyoak & N. Pedersen olarak adlandırılırken, Kuzey Amerika Flora Düzenleme Komitesi (2014)'ne göre *Rosulabryum capillare* (Hedw.) J. R. Spence olarak adlandırılmaktadır (Spence 1996, Holyoak and Pedersen 2007). Bu familyadan olan *B. capillare* gövdesi 1-3 cm uzunluğunda, küme ve yığınlar halinde büyüyen ülkemizde ve dünyada yaygın görülen bir türdür (Şekil 1.2). *B. capillare* dioik bir türdür, kesin teşhislerinde kolaylık sağlayan sarkık kapsülleri bahar ve yaz aylarında olgunlaşır ve 3-5,5 mm uzunluğundadır. Genelde kurduğunda sarmal kıvrımlı sürgünlere sahip ve yaprakları gövde etrafında spiral kıvrılır. Ancak bazı popülasyonlarda kurumuş sürgünleri düz veya hafif kıvrımlı yapraklara sahip olabilir. Karakteristik özelliklerine bakıldığında yaprakları genelde 2-5 mm uzunluğunda ve orta kısmında veya üzerinde genişlediği görülür, yaprak orta damarı uçtan uca görünür ve uzun solgun tüyleri vardır (Atherton et al. 2010).

Tipik habitatu hafifçe asidik toprak, çayırılık, ormanlık alanlar, toprak yığınlarıdır. Ancak ağaç, kütük, çitler, duvarlar, çatılar ve kayalar üzerinde de büyüyebilir. Türkiye'de neredeyse her bölgede yayılış gösteren bir karayosunu türüdür. Bilimsel sınıflandırması aşağıda verilmiştir (Çizelge 1.1). Türkiye haritası kareleme sistemine göre A1, A2, A3, A4, A5, B6, B7, B8, B9, B10, C11, C12, C13 karelerinde yayılış göstermektedir (Henderson 1961, Ören 2010).

Çizelge 1.1 *Bryum capillare* Hedw.'nin bilimsel sınıflandırması (<http://www.tropicos.org>)

-Alem: Plantae - Haeckel, 1866 - Bitkiler
--Altalem: Bryobiotina -Glime 2009 - Bryofitler
---Bölüm: Bryophyta - A. Braun, in P. Ascherson, 1864 - Karayosunlar
----Sınıf: Bryopsida - Gerçek Karayosunlar
-----Altsınıf: Bryidae - Engl., 1892
-----Süpertakım: Bryanae -
-----Takım: Bryales - Schimp.
-----Familya: Bryaceae - Schwägr.
-----Cins: <i>Bryum</i> - Hedw.
-----Tür epiteti: <i>capillare</i> - Hedw.
-----Botanikteki adı: <i>Bryum capillare</i> Hedw.



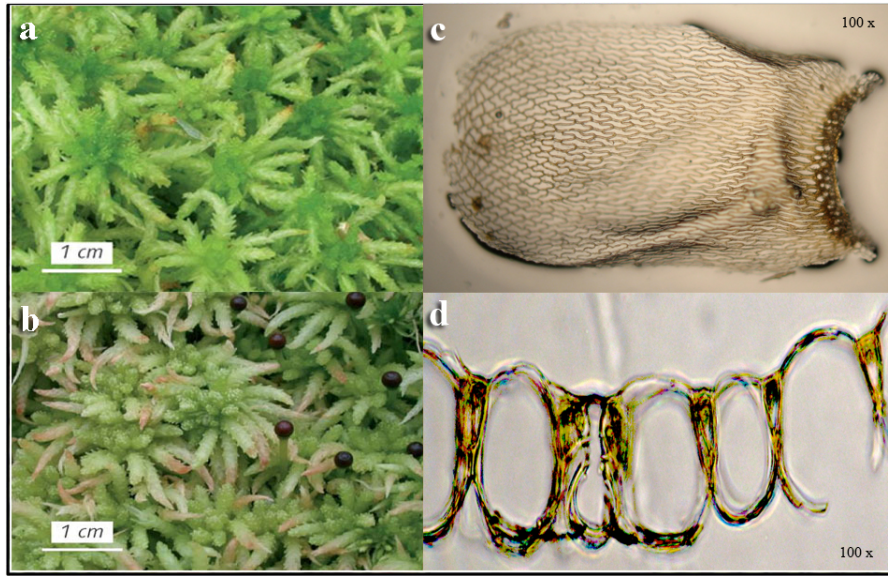
Şekil 1.2 *Bryum capillare*; a- genel görünüş, b- yaprak, c- peristom dişleri (Ören 2010).

1.2 *Sphagnum palustre* L. Hakkında Tanıtıcı Bilgiler

Sphagnum palustre L. formasyonu düzensiz yığınlar halindedir. Renkleri oldukça değişiklik gösteren bir karayosunun türüdür. Doğada genelde kahverengimsi sarıdan yeşile çalan görünüme sahiptir. Özellikle sonbahar ve kış aylarında dış kısımdan merkeze doğru uzanan koyu kahverengi veya kiremit kırmızısı renkli dallanmaları bulunan bu tür, aynı zamanda bir kapitulumda da sahiptir. Kapitulumun dış kısmından başlayan dallanmalar, genelde elongat tipte gittikçe incelen bir yapı gösterir. Demetleri 2-3 bazen 4'e kadar dallanma gösterebilir. Üst kısımları hemen hemen geriye doğru eğimli bir yayılış göstermesine rağmen, yan yaprakları genelde gövdeye 45 dereceden daha dar bir açıyla tutunmuştur. Kapsülleri nadiren görülür. Bu tür, gölgeye toleranslı olmakla beraber besince zengin ıslak ormanlık alan, su kanalı, nehir kenarlarında sıklıkla görülür (Atherton et al. 2010). Bilimsel sınıflandırması aşağıda verilmiştir (Çizelge 1.2). Türkiye'de sadece Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yayılış gösteren bir karayosunu türüdür (Şekil 1.3).

Çizelge 1.2 *Sphagnum palustre* L.'nin bilimsel sınıflandırması (<http://www.tropicos.org>)

- Alem: Plantae - Haeckel, 1866 - Bitkiler
-- Altalem: Bryobiotina -Glime 2009 - Bryofitler
---Bölüm: Bryophyta - A. Braun, in P. Ascherson, 1864 - Karayosunlar
----Sınıf: Sphagnopsida - Turba yosunları
-----Takım: Sphaginales -
-----Familya: Sphagnaceae - Dum.
-----Cins: <i>Sphagnum</i> - C. Linnaeus, 1753
-----Tür epiteti: <i>palustre</i> - L. 1753
-----Botanikteki adı: <i>Sphagnum palustre</i> L. 1753



Şekil 1.3 *Sphagnum palustre* L. a- genel görünüş b- kapsüllerin görünümü c- gövde yaprağı kesiti d- yaprak enine kesit (Atherton et al. 2010, <http://blogs.ubc.ca>)

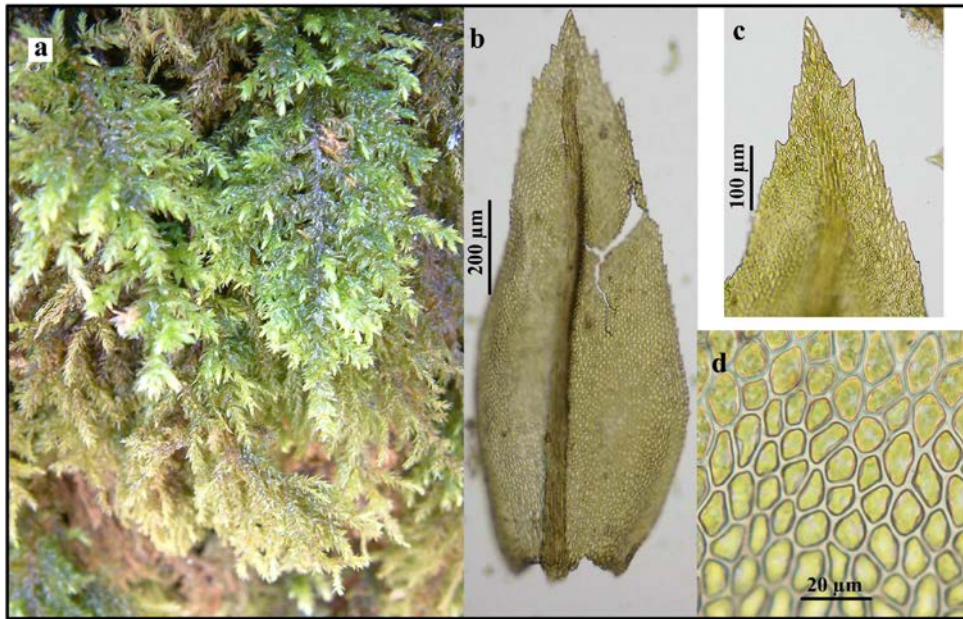
1.3 *Thamnobryum alopecurum* (Hedw.) Gangulee Hakkında Tanıtıcı Bilgiler

Thamnobryum alopecurum (Hedw.) Gangulee için 3-6 mm arasında uzunluğa sahip küçük minyatür bir ağaca benzeyen bir bitkidir. Dik gövdesi üzerinde küçük pula benzer üçgenimsi yapraklar taşır. Yan dallarda 1,5-2,5 mm uzunluğunda akut tipte yumurta şekilli koyu yeşil yaprakları vardır. Yaprak orta damarı belirgindir (Şekil 1.4). Yaprak uçlarındaki kalın dişler ve yaprağı çevreleyen hücreler bir büyüteç yardımıyla gün ışığında kolaylıkla görülebilir. Nadiren kapsül üretirler. *Thamnobryum alopecurum* (Hedw.) Gangulee dere kenarlarında kaya üzerinde veya sıklıkla denizden uzak, normal su seviyesinde gölgede büyür. Ayrıca besince az, bol ve sık ağaçlı orman tabanlarında ve çalılıklarda büyüyebilirler (Atherton et al. 2010) Bilimsel sınıflandırması aşağıda verilmiştir (Çizelge 1.3). Türkiye’de Henderson

Kareleme sistemine göre A1, A2, A3, A4, B7, C11, C12 karelerinde, dünyada ise Avrupa, Faroe Adaları, İzlanda, Kafkaslar, Asya, Makaronezya, K. Afrika’da yayılış göstermektedir (Henderson 1961, Ören 2010).

Çizelge 1.3 *Thamnobryum alopecurum* (Hedw.) Gangulee’nin bilimsel sınıflandırması (<http://www.tropicos.org>)

- Alem: Plantae - Haeckel, 1866 - Bitkiler
--Altalem: Bryobiotina -Glime 2009 - Bryofitler
---Bölüm: Bryophyta - A. Braun, in P. Ascherson, 1864 - Karayosunlar
----Sınıf: Bryopsida - Gerçek Karayosunlar
-----Altsınıf: Bryidae - Engl., 1892
-----Süpertakım: Hypnanae - W.R. Buck et al. 2005
-----Takım: Hypnales -
-----Familiya: Neckeraceae - Schimp.
-----Cins: <i>Thamnobryum</i> - Nieuwland, 1917, nom. nov.
-----Tür epiteti: <i>alopecurum</i> - Nieuwland ex Gangulee, 1976
-----Botanikteki adı: - <i>Thamnobryum alopecurum</i> (Hedw.) Gangulee, 1976



Şekil 1.4 *Thamnobryum alopecurum*; a- genel görünüş, b- dal yaprağı, c- yaprak ucu, d- yaprak ortası hücreleri (Ören 2010)

1.4 Bitki Doku Kültürü

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, hücre, doku veya organ gibi çeşitli bitki kısımlarından, kontrollü sıcaklık ve ışık şartlarında yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin eldesini amaçlamaktadır. Bitkinin kısa zamanda ve çok miktarda çoğaltılmasını “in

vitro çoğaltım” sağlayan yöntem, günümüzde, germplazma korunmasında, bitki neslinin devamlılığını sağlamada, fizyoloji çalışmalarında ve gen mühendisliğinde sıklıkla kullanılan büyük öneme sahip biyoteknolojik bir çalışmadır (Babaoğlu vd. 2001, Wang and Ha 2007).

In vitro çoğaltım yöntemlerinden olan organogenezden, kaybolmakta olan türlerin korunması ve geleneksel yöntemlerle üretilmesi zor olan türlerin çoğaltılması, yeni çeşitlerin geliştirilmesi, mevcut çeşitlerde genetik farklılıkların oluşturulmasında yararlanılır. Bitkinin gelişimi, çeşitli oksin ve sitokininler kullanılarak, yaprak veya kotiledon gibi meristematik tomurcuk içermeyen çeşitli bitki kısımlarından, doğrudan veya kallus oluşumuyla dolaylı olarak başlatılır. Bu yöntemlerle elde edilen bitkilerde, farklı konsantrasyonlarda hormonlar kullanılarak, hücre ve dokulara baskıyla gövde oluşturmak üzere tekrar organize olmaya zorlanarak, genetik değişiklikler oluşturulabilmektedir (Gürel 1997).

Mikroçoğaltım; gövde ucu, tomurcuk, embriyo, tohum, sürgün ve kök gibi tam bir bitki oluşturma potansiyeline sahip bitki kısımlarından meristematik büyüme bölgelerinde, bitki büyüme düzenleyicileriyle gövdelerin gelişimleri ve çoğalmaları teşvik edilmesiyle yapılır. Böylece elde edilen gövdelerde oluşabilecek genetik kararlılık yüksek oranda korunmuş olur. Laboratuvar ortamında belirli periyotlarla alt kültürleri alınarak, kısa sürede, çok sayıda klon bitki fidesi elde etmek mümkün olur (Hartman and Kester 1975, Gürel ve Uçar-Türker 2001).

Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar somatik embriyo olarak isimlendirilirler. Bitkilerde *in vitro* kültür koşullarını optimum düzeye getirerek, somatik hücre, doku veya organlarla bitki hücrelerinden embriyo elde etmek mümkündür. Somatik doku hücreleri farklı konsantrasyonlarda oksin içeren besin ortamlarında kültüre alınarak sonrasında oksin içermeyen farklı bir ortama aktarılarak embriyo üretme yeteneği kazanır (Monier 1990).

Pek çok uygulama alanı olan bitki doku kültüründe *in vitro* çoğaltım dışında kendi kendine döllen bitkilerde yapılan klasik bitki ıslahı melezleri sonrası hatların saflaştırılması uzun zaman almaktadır. Haploit bitki üretiminde polen ve ovül kültürü kullanılarak %100 homozigot bitkiler elde etmek mümkündür (Maheswari et al. 1995).

Embriyo kültürü ile türler arası *in vivo* melezlemelerde embriyo oluşumu veya oluşan embriyoların yaşamalarını engelleyebilmesi gibi ortaya çıkan uyumsuzluklar aşılabilmektedir. Herbisitler, patojenler gibi çeşitli biyotik ve abiyotik faktörlere karşı dayanıklı hücreler

seçilerek ve *in vitro* ortamda bu hücrelerden ilgili faktörlere karşı dirençli bitkiler *in vitro* seleksiyon yöntemiyle yetiştirilebilir. Totipotent hücrelerin *in vitro* kültürü, kallus veya süspansiyon şeklinde uzun süreli olarak veya belli aralıklarla yeniden oluşturularak saklanabilir ve ihtiyaç duyulduğunda bu hücrelerden yeni bitkiler elde edilebilir. Böylece *in vitro* germplazm korunması sağlanabilir (Babaoğlu vd. 2001).

Gen transfer tekniği, doku kültürünün bitkilerin iyileştirilmesinde en önemli ve yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. 1982 yılında bitkilerde yapılan ilk transformasyon çalışmaları ve transgenik bitkilerde aktarılan genin ifadesi, genlerin yapı ve fonksiyonlarının analizi, düzenlenme mekanizmalarının ortaya çıkması gibi, temel biyolojik konuların araştırılmasında gen transfer tekniği sağlam bir metod olarak kullanılmaktadır (Lamb and Beachy 1989). Bitkilerde gen aktarımı; fonksiyonel olarak belirlenmiş doğal ya da yapay nükleik asit dizilerinin bitki hücrelerine *Agrobacterium tumefaciens* ile transformasyonu, kimyasal metodlar ve elektroporasyon metoduyla transformasyonu ve mikroenjeksiyon ile aktarılmasıdır. Genetik transformasyon, nükleik asit molekülün hücreye girişi, entegrasyonu, gen ifadesi ve oğul döllere aktarılması aşamalarından oluşur (Hiei et al. 1994). Arı bitki elde edilmesinde meristem kültürleri, sentetik tohum üretimi, sekonder metabolit üretimi gibi farklı yöntemlerde yapılmaktadır (Brown and Thorpe 1995a).

Bugüne kadar pek çok bitki türünün, *in vitro* kültürü çalışmaları yapılmıştır. Bitki doku kültürünün tarihsel gelişiminde yapılmış önemli bilimsel çalışmalar aşağıda verilmiştir (Çizelge 1.4) (Kung and Wu 1993a, b, Pierik 1993, Endress 1994, Özgen 2005).

Çizelge 1.4 Bitki Doku Kültürünün Tarihsel Gelişimi

TARİH	ARAŞTIRICILAR	YAPILAN ÇALIŞMALAR
1902	Haberlandt	İlk izole edilmiş hücrelerin kültürü
1904	Hanning	Olgun embriyoların kültürü
1917	Karl Ereky	Biyoteknoloji teriminin ilk defa kullanımı
1920	Went et al.	Oksinin tanımlanması
1922	Kotte and Robins	Kök ve sürgün uçlarının laboratuvarda çoğaltımı
1924	Dieterich	İlk embriyo kurtarma tekniği (mısır)
1934	White	İlk sürekli kök kültürleri (domates)
1934	Gautheret	İlk kallus kültürleri
1942	Gautheret	İlk kallus kültürlerinden sekonder metabolit eldesi
1946	Ball	Sürgün uçlarından (apikal meristem) ilk bitki eldesi
1953	Watson and Crick	DNA'nın yapısının belirlenmesi
1954	Muir et al.	Hücre süspansyonlarından ilk bitki eldesi
1956	Miller	Kinetin'in keşfi
1957	Skoog and Miller	İlk sitokinin tanımlanması ve organ oluşumunda sitokinin/oksin oranının önemine ortaya konulması
1958	Steward et al.	İlk somatik embriyogenez (havuç)
1960	Cocking	Enzimler kullanılarak ilk canlı protoplast izolasyonu
1960	Maheswari	Anter kültürü
1962	Murashige and Skoog	MS besi ortamının geliştirilmesi
1965	Vasil and Hilderbrandt	Tek hücreden bitki rejenerasyonu
1967	Bourgin and Nitsch	İlk haploit bitkinin üretimi (anter polan kültürü)
1968	Gamborg et al.	B5 ortamının geliştirilmesi
1970	-	HEPA filtrelerinin kullanılmaya başlaması
1971	Nagata and Takabe	Protoplastlardan ilk bitki rejenerasyonu
1974	Nitsch	Mikrospor kültürü
1978	Melchers et al.	Cinsler arası ilk somatik melezleme
1983	Murai et al.	Transgenik ilk bitkinin elde edilmesi (tütün)
1995	Flavr Savr	İlk rekombinant insan gıdası (domates)
2000	Özgen vd.	Böcek ve virüslere dayanıklı transgenik pamuk, soya, şeker pancarı, patates ve domates çeşitlerinin onaylanarak üretilmesi
2001	Özgen vd.	A vitamini ve demir bakımından zenginleştirilmiş transgenik çeltik çeşitinin geliştirilmesi

1.4.1 Bitki Doku Kültüründe Organogenez

Bitkiyi oluşturan canlı hücrelerden herhangi birisi tekrar bölünerek ve farklılaşarak yeni bir bitkiyi meydana getirebilme kapasitesine sahiptir. Buna totipotensi denir. Bu kapasite kullanılarak protoplastların, hücrelerin, dokuların ve organların kültürleri yapılarak *in vitro* rejenerasyonu gerçekleştirilebilmektedir. Organogenez, dokulara ve kallusta hücrelere baskı uygulayarak değişikliklerin meydana gelmesi, sürgün veya kök primordiyumu olarak adlandırılan tek kutuplu yeni dokuların ve vasküler sistemin oluştuğu bir olaydır. *In vitro* olarak yetiştirilen bitki dokuları farklılaşabilmekte ve yeni organlar oluşabilmektedir. Bu tür

organlara örnek olarak kök, sürgün ve çiçekler verilebilir. *In vitro* kontrollü sürgün gelişimi ilk kez yapılmıştır (White 1939). Bu araştırmacı, sıvı besin ortamına gömülmüş *Nicotiana* melezlerinden elde edilen kallus üzerinde sürgünlerin oluştuğunu gözlemiştir. İlerleyen yıllarda, White'ın bulguları Skoog (1944) tarafından da doğrulanarak geliştirilmiştir. Skoog (1944)'te oksinin kök oluşumunu etkilediğini ve sürgün oluşumunun engellendiğini ayrıca oksinin sürgün oluşumundaki engelleyici etkisinin, ortamdaki sakkaroz ve inorganik fosfatların miktarını arttırarak kısmen de olsa ortadan kaldırdığını göstermiştir. Adenin sülfatın sürgün oluşumunu hızlandırdığı ve oksinin engelleyici etkisini yok etmekte aktif olduğunu belirtilmiştir (Skoog and Tsui 1948). Kinetin keşfedilmiştir (Miller et al. 1956). Bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileri ortaya konmuştur (Skoog and Miller 1957). Tütün kallusu ile yapılan çalışmalarda oksinin, sitokinine göre ortamda yüksek oranı kök oluşumunu, tam tersi ise sürgün oluşumunu ve dengeli oranlar ise kallus gelişimini desteklemekte olduğu gösterilmiştir. Bu yaklaşım sonucunda binlerce bitki türünde *in vitro* sürgünler ve/veya kökler elde edilmiştir (Babaoğlu vd. 2001).

Herhangi bir bitki parçası organogenez çalışmalarında eksplant olarak kullanılabilir. Gövde, kök, yaprak, çiçek durumu, fide organları ve tohum embriyosu yaygın olarak kullanılır. Bu tür eksplantlar doğrudan veya dolaylı olarak organ ve embriyo oluştururlar. Bazı türlerde kullanılacak diğer bir eksplant kaynağı da ince hücre katmanlarıdır. Bu hücre katmanlarından doğrudan çiçek tomurcuğu, vejetatif tomurcuk, kök ve kallus oluşturmak mümkündür (Babaoğlu vd. 2001).

Herhangi bir organizasyon göstermemiş hücreler yığına kallus denir. Kallus, aseptik şartlar altında düzenli zaman aralıkları ile alt kültür yapıp yeni ortamlara aktararak uzun süre korunabilir. Fakat dış görünüşüne rağmen değişmez bir doku değildir. Kallusun uzun süre alt kültüre alınması bazı yapısal değişikliklere yol açmaktadır. Bunlardan en sık karşılaşılan durumlar şunlardır:

1. Bitkinin gelişmesi için artık eksojen bitki büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç duymamaları ve neticede "hormon-otonom" bir kallusun meydana gelmesi.
2. Organik potansiyelin yani yeni adventif sürgün veya kök meydana getirme yeteneğinin azalması veya tamamen ortadan kalkması.

3. Kallus dokusunun yapısında bazı değişikliklerin kendiliğinden ortaya çıkması, örneğin nispeten küçük hücrelerden meydana gelmiş sık yapılı bir kallus veya daha büyük ve şeffaf hücrelerden meydana gelmiş gevşek yapılı bir kallusun meydana gelmesidir (Babaoğlu vd. 2001).

In vitro organ gelişiminin dolaylı organogenez ve direkt organogenez olmak üzere iki modeli vardır. Dolaylı organogenezde meristematik bir merkezin oluşumundan ve takip eden sürgün veya kök oluşumundan önce, alınan eksplant dokusu organize olmamış kallus kümesinin oluşturulması için uyarılır. Direkt organogenez de ise kallus gelişimi hiç görülmez (Babaoğlu vd. 2001).

Kallus dokusundan sürgün gelişimini özetlemek gerekirse, işlem eksplantın çevresinde hücre dizilerinin oluşması ile başlar, hücre dizileri ve eksplant arasındaki bölgelerde ise bazı iz elementleri ortaya çıkar. Kültürden bir hafta sonra iz elementlerinin yanında hücre bölünme bölgeleri gözlenmeye başlar. Bu bölgenin içinde özellikle kallusun alt yarısında takip eden günlerde meristematik merkezler oluşur. Bu merkezler daha sonraki günlerde gözle görülebilen sürgün taslağını oluştururlar. İlk olarak oluşan sürgünler ortama temas eden kallus yüzeylerinin geniş çıkıntıları üzerinde görülür. Tomurcuklar iki hafta sonra ortaya çıkar ve yapraklı vejetatif sürgünler 18-21 günlük dokularda gözlenebilir (Babaoğlu vd. 2001).

1.4.2 Bitki Doku Kültüründe Mikroçoğaltım

Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus ya da tek hücre yapay besi ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanabilir. Eğer bitkilerin uygun besin maddeleri ihtiyacı, hormon ve kültür istekleri yeterince biliniyorsa, *in vitro* çoğaltım tekniği kullanılarak tüm bitki türlerinin üretilmesi mümkündür (Hartman and Kester 1975, Gürel ve Uçar-Türker 2001).

Mikroçoğaltım alanında yapılan ilk çalışma Haberlandt (1902)'de, tek bir hücreden tam bir bitki oluşturulabileceğini kanıtlamaya çalışmıştır. Bu çalışmada yalnızca hacimce artışı sağlanmış fakat çoğaltım gerçekleşmemiştir. Fakat daha sonra yapılan çalışmalarda bunun sebebinin hücre bölünmesi, gelişmesi ve farklılaşması için gerekli olan bitki büyüme düzenleyicilerinin o yıllarda bilinmeyişine bağlı olduğu düşünölmüştür. White (1934)'te *in*

vitro koşullarda B vitaminlerini içeren maya özütü içerisinde domates köklerini geliştirmeyi başarmıştır. Nobecourt (1939) ve White (1939) birbirlerinden habersiz olarak kallus dokusunun kültür ortamında üretilbildiğini göstermişlerdir (Hartman and Kester 1975, Gürel ve Uçar-Türker 2001).

Mikroçoğaltım yöntemi, hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal eldesi, kitlesel olarak çoğaltılan bitkilerde fenotipik ve genotipik kararlılık, kısa sürede üretim, zor ve problemlili türlerin daha kolay retilbilmesi gibi pek çok avantaj sağlayabilmektedir. Bunun yanında, uzman ve özel laboratuvar koşullarına gereksinim duyulması gibi ekonomik yönden bazı sınırlamaları da beraberinde getirmektedir (Babaoğlu vd. 2001).

Mikroçoğaltım; a) hazırlık, b) kültür başlangıcı, c) sürgün çoğaltımı, d) sürgün gelişimi ve köklendirilmesi ve e) iklimlendirme olmak üzere beş aşamada gerçekleştirilir. Hazırlık aşamasında, sağlıklı bir *in vitro* oğaltım için, ana bitkinin genotipi, sağlık durumu, beslenme, ışık, sıcaklık, bitki büyüme düzenleyicilerin uygulanması ve mevsimi dikkate alınmalıdır. Ayrıca bitkinin, kontaminasyon riskini minimuma indirmek için hijyenik koşullar altında yetiştirilmesi, oluşabilecek fungus ve bakteri kontaminasyonunu önlemede etkilidir (Debergh et al. 1993).

İkinci aşama kültür aşamasıdır. Kullanılacak eksplantı seçerken dikkat edilmesi gereken hususlar; a) bitki içi dokular dışındakilere göre daha az kontamine içerir, b) eksplant ne kadar küçükse o kadar az kontamine riski taşır, c) eksplantın rejenerasyon yeteneği büyüklüğüne ve yaşına bağlı olarak değişir, d) eksplantlar gelişme döneminin başlangıcında aktif büyüyen sürgünlerden alındığında başarılı sonuçlar elde edilmektedir, e) ana bitkinin yetişme ortamındaki ışık ve sıcaklık koşulları, beslenme durumu ve yaşı eksplantın büyüme ve gelişmesine etki etmektedir (Werbrouck and Debergh 1994).

Son aşama, sürgün çoğaltım aşamasıdır. İlk aşamada besin ortamına alınan eksplantlar, uygun Şartlarda, yapılan çalışma ve eksplantın türüne bağlı olarak kallus, adventif veya aksiller tomurcuk oluşturarak gelişmelerini sürdürürler. Sonraki aşama sürgün gelişimi ve köklendirme aşamasıdır. *In vitro* oğaltılan bitki gövdeleri köklenmeyi teşvik edici bitki büyüme düzenleyicileri IBA (indol butirik asit), IAA (indol asetik asit), NAA (naftalen asetik asit) içeren farklı bir besin ortamına alınırlar. Köklenme sağlandıktan sonra iklimlendirme aşamasına geçilir. Steril koşullarda, düşük ışık yoğunluğunda, yüksek nem içeren ve tüm

besin maddelerinin bulunduğu bir ortamda geliştirilen bitkilerin, daha düşük nem, daha yüksek ışık düzeyi ve steril olmayan koşullara sahip dış ortama alıştırılması dikkat gerektiren bir işlem olup, bunun aşamalı olarak yapılması gerekmektedir (Preece and Sutter 1993).

1.4.3 Bitki Hücre Süspansiyon Kültürleri

Hücre süspansiyon kültürleri; sekonder metabolit üretimi gibi hücre metabolizması çalışmalarında, ayrıca hücre bölünmesi, strese karşı dokuların duyarlılığı ve hücre farklılaşması gibi fizyolojik çalışmalarda da sıklıkla kullanılır (Muir et al. 1958, Hildebrandt 1958, Steward et al. 1958, Kurz and Constabel 1979).

Hücre süspansiyon kültürleri, çalkalanmakta olan sıvı bir ortamda dağılmış ve büyümekte olan hücreler ile hücre kümelerinden meydana gelmektedir. İnkübasyonda hücre materyali belli bir süre artarak maksimum seviyeye ulaşır ve sonrasında alt kültüre alınarak aynı şekilde büyümeye devam eder ardından aynı miktarda hücre materyalini meydana getirir. Kültürlerin bu özelliği *in vitro* şartlarda bitkisel ürünleri kararlı bir şekilde üretmek için büyük bir avantaj olarak algılanmaktadır (Street 1977).

Hücre süspansiyon kültürlerinin eldesi için bitkisel materyalden alınan hipokotil veya kotiledon gibi bir eksplant kaynağı olabileceği gibi, herhangi bir doku kitlesi olan kallustan alınan bir parçada kullanılabilir (Butcher and Ingram 1976). Farklılaşmış doku parçasından hücre süspansiyonuna başlamak uzun zaman aldığından hücre süspansiyon kültürlerinde genelde kalluslar tercih edilmektedir (Dodds and Roberts 1985).

1.4.4 Bitki Doku Kültüründe Sekonder Metabolit Üretimi

Sekonder metabolitler; bitkilerden elde edilen, onların yaşamsal fonksiyonları üzerinde birincil metabolitler gibi etkileri bulunmayan, fakat başta ilaç sanayisi olmak üzere, gıda, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan çok önemli ve yeri doldurulamaz kimyasallar olarak belirtilmektedir (Babaoğlu vd. 2001).

Sekonder metabolitlerin bitkilerdeki önemine bakıldığında; a) kuraklık, tuzluluk, UV ışınları gibi değişik çevresel etkenlerin oluşturduğu stres ortamına karşı koyma, b) Herbivorlara karşı savunma, c) mikroorganizmalara karşı savunma, d) ekolojik ve metabolik gibi işlevleri vardır.

Yaklaşık dünya nüfusunun %64'ü bitkileri tedavi amaçlı kullanmaktadır (Farnsworth and Soejarto 1985). Gelişmiş ülkelerde reçete ile satılan ilaçların yaklaşık %25'i bitkisel kökenli kimyasallardır (Principe 1989).

Bitki doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolit üretiminin avantajları şunlardır: a) üretim basit, tahmin edilebilir ve güvenilir, b) ana bitkide bulunmayan bileşiklerinde üretilebilmesine imkan sağlar, c) coğrafik ve mevsimsel engellerden bağımsız üretim yapılabilir, d) fitokimyasalların izolasyonu daha çabuk ve etkili yapılabilir, e) *in vitro* olarak üretilen bileşikler tüm bitkideki bileşikler ile doğrudan paraleldir, f) tarlada yetişen bitkide istenmeyen bileşikler hücre kültüründe giderilebilir, g) bitkinin kendisinden elde edilen fitokimyasalların miktarı hücre kültürleriyle karşılaştırıldığında hücre kültürlerinden çok daha fazla miktarda ürün elde edilebilir hatta üretim endüstriyel boyuta taşınabilir (Ramachandra and Ravishankar 2002, Razdan 2003, Lila 2005, Yağcı vd. 2008). Hücre kültürleri deney kurmak için mükemmel bir model olmakla beraber genetik uygulamalara yönelik işaretlemeler ve değişimlerde yapılabilir. Sekonder metabolizmanın stres koşullarında meydana gelmesi bitkiler açısından olumsuzluk gibi görünse de sekonder metabolit üretimini teşvik etmesi bilimadamları ve insanlık için pozitif etki olarak algılanmaktadır (Di Cosmo and Towers 1984).

1.4.5 Besin Ortamında Bulunan Maddeler

1.4.5.1 Makro Elementler

Temel besin ortamı içindeki en önemli bileşenlerden birisi azottur. Bazı besin ortamlarında yüksek oranda, değişik formlarda (NH^{4+} , NO^{3-}), bazı ortamlarda çok düşük oranda azot bulunur veya hiç bulunmaz. Genelde azotlu besin ortamlarında NO^{3-} formu daha fazla kullanılır. Bitki kültürleri ilk önce ortamdan genellikle NH^{4+} formunda azotu alırlar ve daha sonra pH düşüncü NO^{3-} formunda kullanmaya başlarlar. Besin ortamlarında kullanılan diğer önemli makro elementler arasında ise fosfor, sodyum, magnezyum, kükürt ve kalsiyum sayılabilir.

1.4.5.2 Mikro Elementler

En çok kullanılan mikro elementler sırasıyla demir, manganez, çinko, bor, bakır, molibden, kobalt ve iyottur. Bunun yanı sıra demirin bitki hücreleri tarafından daha kolay alınabilmesi için Fe-EDTA formu da kullanılabilir.

1.4.5.3 Vitaminler

Vitaminler enzim reaksiyonlarında katalitik etkiye sahiptirler. Bitki kültürleri için en gerekli vitaminler tiamin (B1) ve daha sonra sırasıyla nikotinik asit (B3) ve pridoksindir (B6). Myo-inositol ve d-biotin (H)'de öncelikle gerekli vitaminler içerisinde değerlendirilmektedir. Diğer vitaminler arasında ise d-pantotenik asit (B5), askorbik asit (C), α -tokoferol (E), folik asit (M), retinol (A), riboflavin (B2) ve kolekalsiferol (D3)'dür. Bu vitaminler bazen farklı uygulamalarda da besin ortamlarına ilave edilmektedir.

1.4.5.4 Şekerler

Kültüre alınan bitki hücre ve dokuları yeterli miktarda karbohidrat sentezi yapamadıklarından enerji kaynağı olarak çeşitli şekerler kullanılmaktadır. Bunlar arasında en çok kullanılanı sakkarozdur. Besin ortamlarında sıklıkla kullanılan diğer şekerler, glikoz, maltoz ve früktozdur.

1.4.5.5 Jel Yapıcı Maddeler

Jel yapıcı maddeler besin ortamını yarı-katı hale getirmek için kullanılan komponentler arasındadır. Bunlar genellikle kırmızı deniz alglerinden elde edilen çeşitli polisakkarit bileşimidir. En çok kullanılanlar; agar, agaroz, sea-krem agaroz, aljinat, jelatin ve nişastadır. Agar ve agaroz gibi maddeler 100°C civarında su ile jel oluştururlar ve 45°C civarında katılaşmaya başlarlar.

1.4.5.6 Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Bitki büyüme düzenleyicileri, besin ortamının çoğu durumlarda vazgeçilmez bileşenleri arasındadır. Organik veya yapay yollarla üretilirler. Temel olarak; oksinler, sitokinler,

giberellinler, absisik asit, etilen, aminoasitler, yapısı tam olarak açıklanamayan hindistan cevizi sütü, maya özü, kazein hidrolizat gibi maddeler, organik asitler, antibiyotikler, biyositler ve toksik madde tutucular olarak sınıflandırılabilir. Uygun olmayan konsantrasyonlarda besin ortamlarına ilave edildiklerinde genellikle hiçbir etki göstermez.

Oksinler; fotoperiyodizm, köklendirme, apikal dominansi, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi ve hücre gelişiminde etkilidirler. Oksinler, doku kültürlerinde tek başına kullanıldıklarında kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve somatik embriyo oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu (organogenez) ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını sağlayabilirler. Ayrıca elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde oldukça faydalıdır. Temel hormon formu IAA (indol asetik asit)'tir.

Sentetik oksinler arasında NAA (naftalen asetik asit), IBA (indol butirik asit) ve 2,4-D (2,4-diklorofenoksi asetik asit) sayılabilir. Sentetik oksinler ticari uygulamalarda meyve dökmesinin engellenmesi ve çeliklerin köklendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Sitokininler, çoğunlukla kök ucu meristeminde ve genç yapraklarda üretilir. Hücre bölünmesinde, yeniden farklılaşmada, bitki rejenerasyonunda ve sürgün çoğaltımında etkilidir. Antioksidan etki göstererek yaşlanmayı da geciktirir. Sürgünlerde köklenmeyi ve embriyogenesi engellerler. En çok kullanılan sitokininler adenin türevleridir. Bunlar içinde BAP (6-Benzilaminopürin) en çok kullanılanıdır. Bitki büyüme düzenleyicileri Çizelge 1.5'te özetlenmiştir.

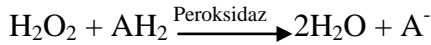
Çizelge 1.5 Bitki büyüme düzenleyicilerinin gruplandırılması (Gaspar et al. 1996, Babaoğlu 2001, Haberer and Kieber 2002)

Bitki Büyüme Düzenleyicisi	Fonksiyonu	En Yaygın Kullanılanlar
Oksinler	<ul style="list-style-type: none"> - Hücre gelişimi - Kallus oluşumu, organogenez ve somatik embriyo oluşumu (sitokininlerle) - Yan sürgün gelişiminin baskılanması - Fotoperiyodizm, köklendirme, apikal dominans - Hücre süspansyonlarının eldesi ve somatik embriyo oluşumu - Işığa yönelme 	<ul style="list-style-type: none"> - IBA (indol butirik asit) - IAA (indol asetik asit) - 2,4-D (2,4-diklorofenoksi asetik asit) - NAA (naftalen asetik asit) - Pikloram (4-amino-3,5,6-trikloropikolinik asit)
Sitokininler	<ul style="list-style-type: none"> - Sürgünlerde köklenme ve embriyogenezin engellenmesi - Çiçeklenmenin geciktirilmesi - Köklenmenin teşvik edilmesi - Hücre bölünmesi, yeniden farklılaşmada, sürgün çoğaltımı ve reheneryonda - Antioksidan etki göstererek yaşlanmanın geciktirilmesi - Yaprak dökülmesinin engellenmesi - Çimlenmenin artırılması 	<ul style="list-style-type: none"> - BAP (Benzilaminopürin) - BA (Benziladenin) - KIN (Kinetin) - Adenin Sülfat - 2iP (izo pentil adenin) - TDZ (thidiazuron) - Zeatin
Gibberellinler	<ul style="list-style-type: none"> - Kallus gelişimini, organogenez ve adventif kök oluşumunun engellenmesi - Bitkilerde gövdenin uzaması ve çiçeklenmenin artırılması - Sürgün boyunun uzaması - Meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılması 	<ul style="list-style-type: none"> - GA3 (Gibberellik asit)
Absisik Asit	<ul style="list-style-type: none"> - Somatik embriyoların olgunlaşması - Yaprak ve meyve dökülmesi (absisyon), Dormansi - Stomaların kapanması 	<ul style="list-style-type: none"> - ABA (Absisik asit)
Etilen	<ul style="list-style-type: none"> - Meyve olgunlaşması ve yaprak absisyonunun teşvik edilmesi - Yüksek derişimlerde, mikrotübül ve mikrofibrillerin yerleşimlerini etkileyerek, hücre uzamasının azaltılıp, hücre genişlemesinin artırılması - <i>In vitro</i> kültürlerde, alt kültür sonrasında zamana bağlı olarak, büyüme ve organogenezin inhibe edilmesi - Kallus ve süspansiyon kültürlerinde büyümede, gövde ve kök uzaması, aksillar ve adventif tomurcuk oluşumu, embriyogenez 	
Diğer	<ul style="list-style-type: none"> - Poliaminler (polen olgunlaşması, vejetatif sürgün formasyonu, köklenme ve somatik embriyogenez). - Oligosakkarinler (oksin varlığında kallus oluşumunun uyarılması, oksin yokluğunda yan köklerin sayısında artış) - Salisilatlar (çiçeklenme ve tuber oluşumunun uyarılması, bazı patojenlere karşı hastalık direncinin olusturulması için sistemik sinyaldir, çimlenmenin inhibe edilmesi) - Jazmonatlar (Meristem kültürlerinde tomurcuk formasyonunun uyarılması, rizogenezin uyarılması ve kallus oluşumunun geciktirilmesi) 	

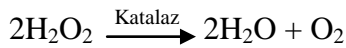
1.5 Serbest Radikaller

Serbest radikaller iyonların veya uyarılmış moleküllerinin ayrılmaları sonucunda oluşan, dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektrona sahip ve genellikle elektriksel açıdan yüksüz atom ya da moleküllerdir. Reaktif ve kısa ömürlü (yaklaşık 10^{-5} sn) olan bu reaktif oksijen türleri organizmada lipidler, nükleik asitler, proteinler ve karbonhidratlar gibi biyolojik moleküllerle kolayca reaksiyona girebilirler. Bu nedenle yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları, katarakt, diyabet, böbrek ve karaciğer hastalıkları gibi pek çok hastalıktan sorumlu tutulurlar (Halliwell and Gutteridge 1990).

Hidroperoksidazlar, hidrojen peroksit veya bir organik peroksiti substrat olarak kullanırlar. Hidroperoksidazlar vücudu tehlikeli peroksidlerden korurlar. Peroksitlerin birikmesi membranları bozan ve hatta kansere sebep olan serbest radikallerin oluşmasına sebep olur. Peroksidaz tarafından katalizlenen reaksiyon karmaşık olsa da genel sonuç aşağıdaki gibidir (Geçkil 2012a, b).

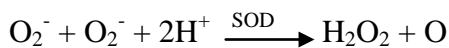


Katalaz hidrojen peroksidi elektron alıcısı veya vericisi olarak kullanır:



Peroksizomlar karaciğer dahil birçok dokudaki hücrelerde bulunan organellerdir ve özellikle oksidazlar ve katalaz bakımından zengindirler (Geçkil 2012a, b).

Süperoksit dismutaz (SOD) aerobik organizmaları oksijenin toksik etkisinden korur. O_2 'ye tek bir elektron transferi ile süperoksit anyon serbest radikali (O_2^\cdot) oluşur ve bu da zincirleme bir seri serbest radikal olayı başlatır. Bu süperoksit radikali SOD tarafından aşağıdaki gibi dismüte edilir:



Yaşlı hücrelerin mitokondrilerinde oksidatif olarak modifiye edilmiş protein lipid ve nükleik asitlerin yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir. ETZ (elektron taşıma zinciri)'de mitokondriyal DNA (mtDNA) elektron kaçağının bulunduğu yerlere yakın olduğundan ROT

(reaktif oksijen türleri) saldırısına yüksek oranda maruz kalır. DNA hasarının bir ürünü olan 8-hidroksil 2-deoksiguanozin (8-OHdG)'in yaşlı hücrelerde artığı görülmüştür. Diğer taraftan son araştırmalar mitokondrinin stres altındaki hücrenin yaşamasında önemli roller üstlendiği ileri sürülmektedir. Bu durum düşük kalorinin uzun ömürle bağlantısını da açıklayabilir. Bazı çalışmalar hücrel ölüm, organizmanın yaşamı ve NAD⁺ arasında bir bağlantı olduğunu ortaya koymuştur. Aşırı bir genotoksik stres NAD⁺ kaybına, bu da hücre ölümüne sebep olur. Kalori sınırlaması dahi normal bir strese hücrenin verdiği cevap NAD⁺ sentezini artırmasıdır (Geçkil 2012a, b).

6 karbonlu bir molekül olan glukozu oldukça benzeyen C vitamininin (askorbik asit) en önemli biyolojik fonksiyonu vücuttaki bazı önemli hidroksilasyon reaksiyonlarında redükleyici ajan olarak hareket etmesidir. C vitamini normal bağ dokusunun oluşması ve yaralanmaların iyileşmesi için gerekli bir etkidir. Kollajen oluşumundaki rolünden dolayı, C vitamini eksikliği, kemik oluşumu bozukluğundan kılcal damar kırılabilirliğine kadar birçok vücut fonksiyonunun bozulmasına sebep olur. Ayrıca bu vitamin en iyi bilinen iyi bir antioksidan ve antionkojenik (antikanser) maddedir (Geçkil 2012a, b).

Serbest radikallerin başlıca sigara, alkol ve lipid metabolizması ürünleri, virüsler, güneş ışınları, x-ışınları ve kozmik ışınlar, sanayi atıkları, otomobil egzoz gazları, ozon, ağır metaller, kirli su ve kirli hava kaynaklı oluşabildiği bilinmektedir (Sies 1991).

Serbest radikaller üç yolla meydana gelirler:

- 1- Kovalent bağlı bir molekülün homolitik parçalanması: Bağı oluşturan elektron çiftinden her biri birer atom tarafından alınır ve yüksüz atom ya da atom grupları oluşur,
- 2- Bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya heterolitik bölünme,
- 3- Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi,

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijen radikalleridir. Bunların büyük kısmı aerobik solunum sırasında mitokondrilerde indirgenmiş karbon birimlerinden alınan elektronların çeşitli elektron taşıyıcılardan geçerek en son elektron alıcısı olan moleküler oksijene transferi esnasında meydana gelir. Oksijenin tam olarak indirgenmediği reaksiyonlarda

son ürün daima sudur. Oksijenin kısmi indirgenmesi sonucu serbest oksijen radikalleri oluşur. Moleküler oksijenin bir elektron almasıyla süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), iki elektron almasıyla hidrojen peroksit (H_2O_2), üç elektron almasıyla ise hidroksil (OH^{\bullet}) radikali oluşmaktadır (Winston 1991). Oksijen merkezli radikaller; süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali (OH^{\bullet}) ve lipit peroksil radikalidir (LOO^{\bullet}). Oksijen merkezli radikal olmayanlar ise; hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit ($HOCl$) ve singlet oksijendir (1O_2). Nitrik oksit (NO^{\bullet}), nitrik dioksit (NO_2^{\bullet}) ve peroksinitrit gibi nitrojen türleri ise diğer reaktif nitrojen/oksijen türleri arasında yer almaktadır (Çizelge 1.6) (Günaydın ve Çelebi 2003, Lee et al. 2004).

Çizelge 1.6 Bazı radikaller ve reaktifler

Reaktif Oksijenler			
Radikaller	Formülü	Radikal olmayanlar	Formülü
Süperoksit	$O_2^{\bullet-}$	Hidrojenperoksit	H_2O_2
Hidroksi	OH^{\bullet}	Hipoklorikasit	$HOCl$
Peroksi	ROO^{\bullet}	Hipobromikasit	$HOBr$
Alkoksi	RO^{\bullet}	Ozon	O_3
Hidroperoksi	HOO^{\bullet}	Singlet oksijen	ΔO_2
Reaktif Azotlar			
Radikaller	Formülü	Radikal olmayanlar	Formülü
Nitrikoksit	NO^{\bullet}	Nitröz asit	HNO_2
Nitrojen dioksit	NOO^{\bullet}	Nitrozil kasyonu	NO^+
		Nitroksil anyonu	NO^-
		Dinitrojen tetraoksit	N_2O_4
		Peroksinitrit	$ONOO^-$
		Peroksinitroz asit	$ONOOH$
		Nitronyum kasyonu	NO_2^+
		Alkilperoksi nitritler	$ROONO$

Poliansatüre (çoklu) yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu (yükseltgenmesi sonucu bozulması) olarak bilinir. Lipit peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipit serbest radikalleri (L^{\bullet}) ve lipit peroksit radikallerinin (LOO^{\bullet}) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir.

1.6 Antioksidanlar

Antioksidanlar radikallerle hızlı şekilde reaksiyona girerek oto-oksidasyon veya peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddeler olarak bilinir. Hücre ve dokular, radikal ürünleri ve reaksiyonları inhibe eden bir sisteme sahiptir. Antioksidanlar vücutta

sentezlenebildiği gibi gıda diyetleriyle dışarıdan da alınabilirler. Örneğin süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) beyin ve sinir sisteminde meydana geldiği bilinmektedir. İnsan beyinde bazı bölgeler demir bakımından zengindir, bu durumda serbest radikal reaksiyonları kolayca uyarılabilen bir formda değişim görülür. Antioksidan savunma mekanizması, süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) ve hidrojen peroksiti (H_2O_2) giderebilir. Süperoksit dismutaz hızlı bir şekilde $O_2^{\bullet-}$ 'i H_2O_2 'e çevirebilir. Peroksizomlarda ise katalaz H_2O_2 'i su ve oksijene kolayca çevirebilmektedir. Bu organellerde sınırlandırılmış halde bulunan oksidaz enzimleri, oksidasyon sonucu meydana gelen H_2O_2 'in atılmasına yardım eder. İnsan hücrelerinde diğer önemli H_2O_2 giderici enzimler ise glutasyon peroksidazlardır. Reaktif oksijen türleri ihtiyaçtan fazla üretildiğinde dokulara hasar verebilir (Ak 2006).

Antioksidan savunma mekanizması farklı şekillerde etkilerini gösterir. Bunlar;

- a) Radikal metabolit üretiminin önlenmesi (temizleme etki): SOD (süperoksit dismutaz) ve glutasyon peroksidaz enzimleri oluşmuş serbest radikalleri tutar veya oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler ve yeni radikal oluşumunu engellerler.
- b) Üretilmiş radikallerin temizlenmesi (giderici etki): C vitamini, A vitamini, β -karoten, vitamin E, α -tokoferol, flavonoidler ve antosiyanidinler serbest radikallerle birleşip, onlara bir hidrojen vererek aktivitelerini söndüren bileşiklerdir.
- c) Hücre deformasyonunun onarılması (tamir edici etki): Bu grupta DNA tamir enzimleri, metiyonin sülfoksit redüktaz verilebilir.
- d) İkincil radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması (zincir kırıcı etki): Zincirleme olarak devam eden tepkimeleri kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Vitaminler, ürik asit, bilirubin, albumin, hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler (Hossain and Asad 1985).

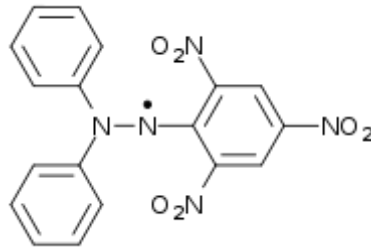
Antioksidanlar doğal ve yapay antioksidanlar olarak ikiye ayrılırken doğal antioksidanlar enzimatik etki gösteren ve enzimatik etki göstermeyen antioksidanlar olarak ikiye ayrılır. Enzimatik etki göstermeyen antioksidanlar ise endojen ve eksojen antioksidanlar olarak ikiye ayrılabilir. Endojen antioksidanlar buldukları ve etkinliklerini yerine getirdikleri yerlere göre de hücre içi, membranal ve hücre dışı antioksidanlar olarak üç sınıf altında toplanabilir (Çizelge 1.7).

Çizelge 1.7 Antioksidanların sınıflandırması

Antioksidanlar			Yapay antioksidanlar
Doğal antioksidanlar			
Enzimatik	Enzimatik olmayan		BHT
SOD	Endojen	Eksojen	BHA
Katalaz	Glutasyon	E Vitamini	Trolox
Glutasyon peroksidaz	Serüloplazmin	β -Karoten	SOD mimikler
Glutasyon redüktaz	Bilirubin	Askorbik Asit	
Sitokrom oksidaz	Ferritin		
Glutasyon S transferaz	Laktoferin		
	Ürik asit		
	Haptoglobinler		
	Albumin		

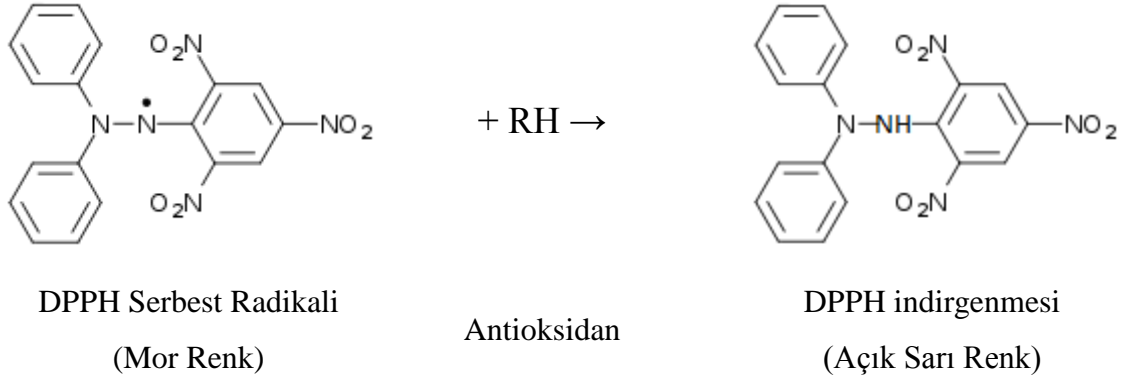
1.6.1 DPPH Serbest Radikali Temizleme Aktivitesi

DPPH serbest radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir serbest radikal olup bu radikal 517 nm dalga boyunda maksimum absorbands oluşturmaktadır ve koyu mor menekşe renklidir (Şekil 1.5) (Cuendet et al. 1997).



Şekil 1.5 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü

DPPH serbest radikali, antioksidan madde ile reaksiyona girdiği zaman indirgenme sonucu mor rengin şiddeti azalarak absorbandsın düşmesine sebep olacaktır (Şekil 1.6). Farklı numune konsantrasyonlarıyla muamele edilen DPPH serbest radikalinin absorbandsındaki değişim ölçülerek absorbandslara karşılık gelen konsantrasyonlarla grafik çizilerek $y=ax+b$ denkleminde DPPH konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı $\mu\text{g/mL}$ veya mg/mL cinsinden belirlenmekte ve IC_{50} değeri olarak ifade edilmektedir.

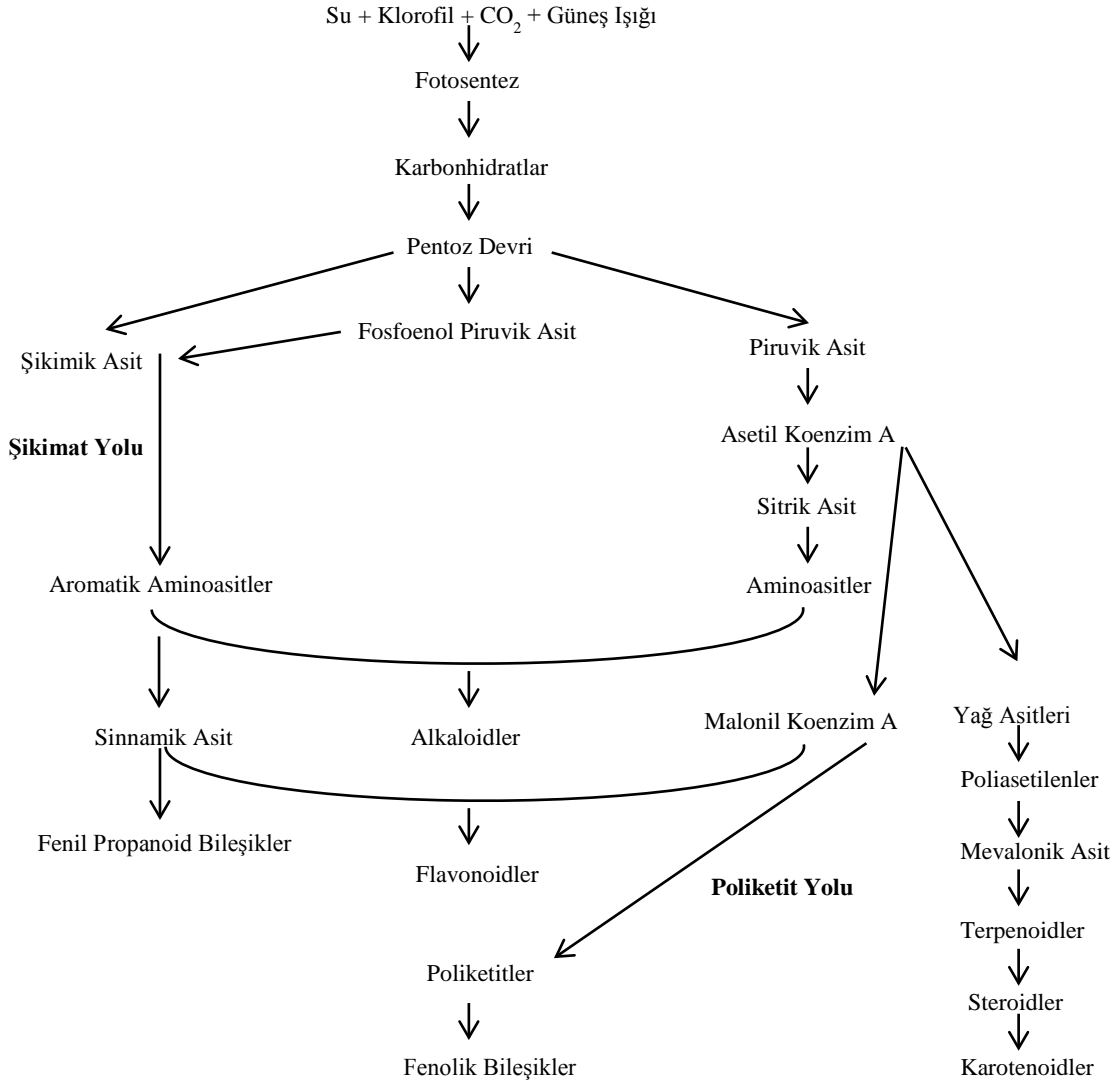


Şekil 1.6 DPPH radikalinin bir antioksidanla reaksiyonu sonucu indirgenmesi

Bu yöntemin dezavantajı büyük antioksidan moleküllerin sterik (hacimsel etkileşme) engellenmeye maruz kalmaları nedeniyle inaktif olarak test edilmeleridir. Bu metotta, antioksidan molekülün yapısı ve boyutu test sonucunu etkilemektedir. Bu metot radikal temizleme aktivitesi tayinlerinde kolaylığı ve kısa sürmesi nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır (Prior et al. 2005).

1.7 Fenolik Bileşikler

Son yüzyılda sentetik ilaçların kullanımıyla meydana gelebilen ciddi rahatsızlıklar insanoğlunu doğal tedavi yöntemlerine ve bitkisel tedaviye yönlendirdi. Fitoterapi olarak adlandırılan bitkisel tedavi yöntemlerindeki etken maddelerin bitkiler tarafından üretilen ikincil metabolizma ürünleridir. Bu etken maddeler sinyal olarak, mikroorganizmalara karşı, insektisit, herbisit ve serbest radikallere karşı koruyucu olarak rol oynarlar. Bu nedenle karbohidratlar, proteinler ve yağların sentezinden sonra bileşikler fitokimyasallar olarak adlandırılırlar. Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler şikimat ve poliketit yolu reaksiyonlarıyla meydana gelirler (Şekil 1.7). Başlıca polifenolik bileşikler basit fenoller, benzokinonlar, fenolik asitler, asetofenonlar, fenilasetil asitler, hidroksisinnamik asitler, fenilpropenler, kumarinler, naftakinonlar, kromonenler, ksantonlar, stilbenler, antrakınonlar, flavonoidler ve ligninlerdir (Ulusoy 2010).



Şekil 1.7 Fenolik bileşiklerin oluşum yolu (Dey and Harborne 1989).

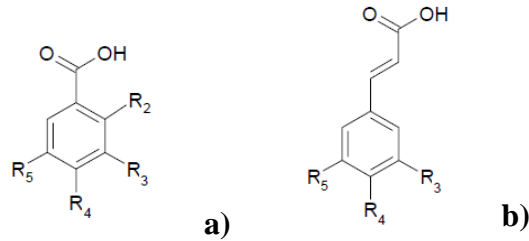
Fenolik bileşikler yapısal olarak, bir aromatik halka ve buna bağlı olarak fonksiyonel türevleri de dahil bir veya daha fazla hidroksil gruplarını içeren maddelerdir. Bu yapısal çeşitliliğe sahip bu grup bileşikler çoğunlukla polifenoller olarak adlandırılırlar. Fenolik bileşikler yaygın ismiyle polifenoller, benzen halkası içeren maddelerdir. Hidroksibenzen çoğunlukla fenol adı ile anılır. Buna göre en basit fenolik bileşik, bir tane hidroksil grubu içeren benzen, yani fenoldür. Fenolik bileşikler bitkilerin temel bileşenlerindedir. Bitkilerin ve bitkilerden farklı yapılara türetilen bileşiklerin besinsel ve duyuşal özelliklerinde önemli rol oynarlar (Fabre et al. 2001, Borbalán et al. 2003, Fang et al. 2007).

Bu bileşiklerin bazıları terpenoidler gibi olup bitkiye koku ve tat verirken bazıları kinonlar ve tanenler gibi bitki pigmentlerini oluştururlar. Pek çok bileşik, bitkinin tadından sorumlu olup bunlardan bazıları gıda ve bazıları ise tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır. Fenolik bileşikler

veya polifenoller bitkilerde en fazla bulunan yapılardan biri olup bitki aleminde 8000'den fazla fenolik yapının bulunduğu belirtilmektedir (Pietta and Gardana 2003).

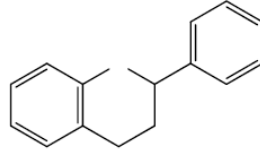
Doğal olarak oluşan fenolik maddelerin en yaygın grubu flavonoidlerdir. Flavonoidlerin dışında bitki fenolleri; basit fenolleri, fenolik asitleri (benzoik ve sinnamik asitler), kumarinleri, stilbenleri, hidrolize ve kondense tanenleri, lignan ve ligninleri içermektedir (Naczk and Shahidi 2004).

Fenolik asitler antioksidan etkiye sahiptir. Fenolik asitler; sinnamik ve benzoik asitler olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. Fenol karbon asitleri ile de anılan fenolik asitlerden sinnamik asitlerin yapısı C6-C3 iskeletine dayanmaktadır. Ferulik asit, kafeik asit ve kumarik asit örnekleridir. Benzoik asitler ise C6-C1 iskeletine dayalı bileşiklerdir ve yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Bunlardan birkaç tanesi; gallik asit (3-4-5-trihidroksibenzoik asit), vanillik asit (3-metoksi-4-hidroksibenzoik asit), şiringik asit, salisilik asit (2-hidroksibenzoik asit), *p*-hidroksibenzoik asit (4-hidroksibenzoik asit) ve protokatekuik asit (3,4-dihidroksibenzoik asit)'tir. Benzoik asit ve sinnamik asit iskelet yapısı gösteren fenolik maddelerin temel kimyasal yapısı gösterilmiştir (Şekil 1.8) (Harborne and Simmonds 1964, Hulme 1971, Naczk and Shahidi 2004).



Şekil 1.8 Fenolik asitlerin Temel Kimyasal Yapısı a) Benzoik asit b) Sinnamik asit

Flavonoidler çeşitli besin ve tıbbi bitkilerde bulunan ikincil metabolitlerin en yaygın grupları arasında olan fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler renk, tat ve koku gibi duyuşal özelliklerden sorumlu oldukları için, analizlerini önemli derecede ilginç yapan bu türürünlerin kalitesiyle yakından ilgilidirler (Fabre et al. 2001, Borbalán et al. 2003). Genelde tüm flavonoidler; üç fenolik halkaya sahip ve hidroksil ile metil grubuna göre değişen 2-fenilkromanın türevleridirler. Kimyasal yapıları (C6-C3-C6) iskelet yapısına dayanır (Şekil 1.9) (Madhavi et al. 1996, Tsimogiannis et al. 2006, Plochmann et al. 2007).



Şekil 1.9 Flavonoidlerin C6-C3-C6 iskelet yapısı

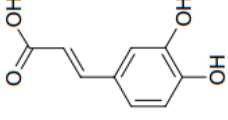
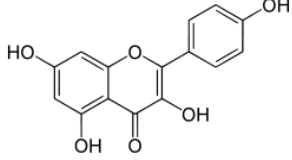
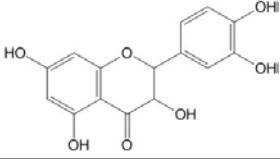
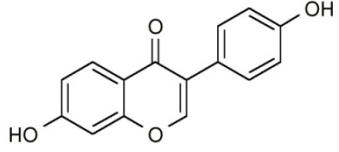
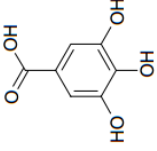
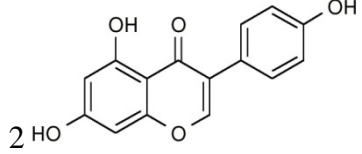
Yapılan çalışmalar polifenoller bakımından zengin besinlerin tüketimi; antioksidan özellikleri sayesinde kalp hastalıkları, belli başlı kanser çeşitleri ve yaşlanmayla ilgili hastalıklardan korunmada önemli olduğu belirtilmiştir (Rice-Evans and Packer 1998, Chang and Kinghorn 2001, Fabre et al. 2001, Borbalán et al. 2003). Flavonoidlerin antioksidan olarak davranma kapasiteleri onların molekül yapılarına bağlıdır. Hidroksil gruplarının pozisyonu, sayısı ve flavonoidlerin kimyasal yapılarındaki diğer özellikler onların antioksidan aktiviteleri için önemlidir (Suschetet et al. 1998). Örneğin kullandığımız standartlar arasında bulunan kuersetin diyetlerde en bol bulunan flavonol olup serbest radikal giderme aktivitesi açısından tüm doğru yapısal özelliklere sahip olduğu için potansiyel bir antioksidandır. Flavonoidler insan vücudu tarafından üretilemezler ve bundan dolayı da başlıca günlük diyetlerden alınmalıdırlar (Pietta 2000, Erkoç vd. 2003).

Çalışmamızda karbon yapısına bağlı olarak farklı sınıflara ayrılan 12 farklı fenolik bileşik HPLC-UV analizinde kullanılmıştır (Çizelge 1.8).

Çizelge 1.8 HPLC-UV analizlerinde kullanılan fenolik bileşikler ve formülleri

Fenolik Bileşiğin Adı	Formülü	Fenolik Bileşiğin Adı	Formülü
Rosmarinik asit		Kuersetin	
Şikimik asit		Formononetin	
<i>p</i> -Kumarik asit		Biokanin A	

Çizelge 1.8 (devam ediyor)

Fenolik Bileşimin Adı	Formülü	Fenolik Bileşimin Adı	Formülü
Kafeik asit		Kaempferol	
Taksifolin		Daidzein	
Gallik asit		Genistein	

1.7.1 Toplam Fenolik Madde Tayini

Folin Ciocalteu metodu doğal ürünlerde toplam fenolik madde ölçümü için kullanılmaktadır. Gıdalarda bulunan toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi, antioksidan aktiviteyi sağlayan hidroksil grupları hakkında fikir vermesi açısından önemlidir. Bu metotla, suda ve organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifiyle alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor menekşe renkli kompleks 765 nm'de maksimum absorbanans oluşturur. Bu yöntem Singleton ve arkadaşları tarafından antioksidanların toplam fenolik içeriğini ölçmek için geliştirilmiştir (Singleton and Rossi 1965, Singleton et al. 1999).

Folin-Ciocalteu yöntemi basit, duyarlı ve kesinliği yüksek bir metottur. Ancak reaksiyon asidik pH'ta yavaştır ve spesifikliğini kaybeder. Metodun en önemli dezavantajı, ortamda bulunan ekstrakte edilebilir proteinleri de ekstrakte etmesidir. Bu nedenle spesifik bir metot olarak kabul edilmemektedir. Ayrıca metodun diğer bir dezavantajı da analiz sırasında ortamda bulunan askorbik asit gibi indirgen maddelerle etkileşime uğramasıdır (Huang et al. 2005, Prior et al. 2005).

1.8 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

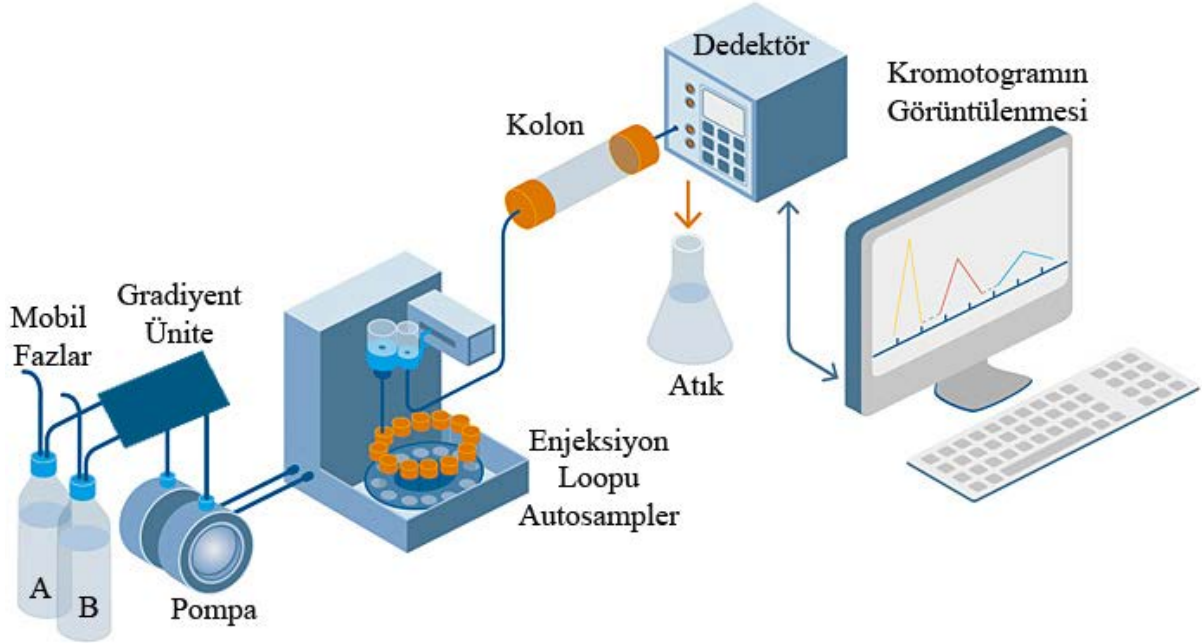
Yüksek performanslı sıvı kromatografisine HPLC (High Performance Liquid Chromatography) denilmektedir. Günümüzde özellikle biyolojik, farmakolojik, besinsel, çevresel ve endüstriyel vb. numunelerde organik ve anorganik bileşiklerin ayrılma ve belirlenmesi gibi bir çok alanda kullanılmaktadır.

Sıvı kromatografisiyle ilgili ilk çalışmalar cam bir kolona doldurulan tanecik boyutları 100-250 µm olan sabit fazlarla yapılmaktaydı. Hareketli faz bu taneciklerin arasından numuneyi sürüklemesi yer çekimi kuvvetiyle olduğundan analiz uzun sürmekte dolayısıyla bileşenlerin bantları geniş olmaktadır. Cam kolona basınç ya da vakum uygulandığında taneciklerin büyük olması nedeniyle maddeler sabit fazla etkileşememekte ve ayırım mümkün olmamaktaydı. Sabit faz taneciklerinin gelişen teknoloji ile 3-5 µm indirilmesi ve bu taneciklerin arasından hareketli fazı geçirebilecek basınçta pompalar geliştirilmesiyle yüksek performanslı sıvı kromatografisi oluşmuştur (Ulusoy 2010).

HPLC analiz sonuçlarının tekrar edilebilirliğinin yüksek olduğu bir cihazdır. Uygun kolonlar kullanıldığında tüm kromatografik tekniklerin uygulanabildiği bir cihazdır. Sıvı ortamda çözünebilir hemen hemen tüm bileşenlerin ayrımı için kullanılabilir. Uçucu olmayan ve sıcaklıkla kolayca bozulabilen maddelerin ayrılmasına uygundur. Amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbohidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler ve steroidler gibi birçok biyoteknolojik ürüne uygulanabilir. Farklı prensiplerle çalışan çok sayıda dedektöre uygundur. Analiz için kullanılan örnek hacmi 10-100 µL arasında değişir. HPLC kolonları rejenerasyon gerekmeksizin bir çok kez kullanılabilir. Duyarlık çok yüksek olduğundan 10 µg'lık bir örnek numunede bile, floresans veya elektron yakalama dedektörleri kullanılarak tayin yapılabilir. Dezavantajlarına baktığımızda hareketli faz sarfiyatı oldukça fazladır ve HPLC'de hareketli faz olarak kullanılan çözücülerin maliyeti yüksektir.

HPLC ekipmanları bir hareketli faz deposu, pompa, enjektör, ayırma kolonu, dedektör, bilgisayara verilerin aktarma portu (USB), bilgisayar programı ve bazen ihtiyaç duyulduğunda kolon ısıtıcısı içerirler. Kromatografik analiz süreci, çözücüde çözülmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Bu sistemin en önemli kısım ayırmanın yapıldığı kolondur. Hareketli faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör

tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamı kromatogram olarak adlandırılır (Şekil 1.10).



Şekil 1.10 Bir HPLC cihazının şematik gösterimi

1.8.1 Hareketli Faz Deposu ve Hareketli Faz

Modern bir HPLC cihazı, birden fazla 200-1000 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hazne içermektedir. Çözücülerin bulunduğu hareketli faz depoları kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların giderilmesi içinde ayrı bir cihaza sahiptir (Skoog et al. 1998). Çoğunlukla bu sistemler, çözücü içinde bulunabilecek toz ve partikül halindeki maddelerin pompaya ve enjeksiyon sistemine zarar vermemesi veya kolonu tıkamaması için, toz ve partikül maddeleri süzmeye yarayan bir guard kolonda içerirler. Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan bir ayırma izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Sıklıkla, ayırma etkinliği gradyent elüsyonu ile büyük ölçüde artırılır.

İzokratik Elüsyon: Kolona sabit bileşimdeki hareketli faz pompalanır. Hareketli fazın polaritesi sabit olduğu için kolona çok fazla ilgi duyan bileşenleri kolondan atmak zorlaşır ve elüsyon süresi uzar. Maddelerin molekül büyüklüğüne göre tayini de bu elüsyon türü ile gerçekleşir.

Gradient Elüsyonu: Hareketli faz bileşimi analiz boyunca doğrusal olarak değişir. Analiz örneğinin kolon dolgu materyali yüzeyine afinitesi önemlidir. Ortamdaki elüyenin polaritesi zamanla değiştirilerek örneklerin partikül yüzeyine afinitesi değiştirilir ve ayırma sağlanır. Gradyent elüsyonda çözücünün bileşimi programlanarak ya devamlı ya da kademeli olarak arttırılabilir. Gradyent elüsyonu da düşük basınçlı ve yüksek basınçlı gradient elüsyon olmak üzere iki kısma ayrılır. Düşük basınçlı gradient sistemde tek pompa, maksimum 4 farklı mobil faz kullanılır ve hareketli fazlar pompadan önce karıştırılır. Yüksek basınçlı gradient sistemde ise 2 ya da 3 pompa, 2 ya da 3 farklı mobil faz kullanılır ve mobil faz pompadan sonra karıştırılır. Maddeleri kolonda sürükleyen çözücü sistemidir ve içeriği analize göre belirlenmelidir. Hareketli faz maddelerin kolona tutulmasına izin vermeli fakat aynı zamanda tutunan maddeleri sürükleyebilmelidir. Eğer hareketli faz maddelerin kolondan tutulmasına izin vermez ise maddeler birbirinden ayıramaz, kolonda tutunan bileşikler sürükleyemez ise de kolondan çıkartıp dedektöre ulaştırılmaz ve bileşenler dedekte edilemezler (Ulusoy 2010).

Hareketli faz olarak kullanılan çözücüler çok saf olmalıdırlar ve kesinlikle partikül ve hava kabarcığı içermemelidirler. Analiz esnasında sistemde oluşabilecek bir hava kabarcığı, dedektörün önünden geçerek istenmeyen sinyaller verebilir ve kolondaki partiküllerin homojen dağılımını bozabilmektedir. Fakat çoğu çözücünün içerisinde çözünmüş gazlar bulunduğundan, hareketli fazlar hazırlandıktan sonra bu çözünmüş gazlardan arındırılmalıdırlar. Bu işleme gazdan arındırma denir. Hareketli faz olarak kullanılacak çözücüler istenen kromatografik ayırma mekanizmasına göre belirlenir. Normal faz sıvı kromatografisinde maddeler polar kolonda adsorpsiyon prensibiyle ayrılacaksa, pentan, kloroform, ksilen veya karışımları gibi hareketli faz çözücüleri apolar olmalıdır. Ayırım ters faz yöntemi ile yapılacaksa su, metanol, asetonitril, etanol ya da etanol karışımları gibi hareketli faz çözücüleri polara yakın olmalıdırlar (Snyder et al. 2010).

1.8.2 Pompa

Kolon dolgu materyali olarak üretilen partiküllerin kolon içerisine doldurulması işlemi ve hareketli fazın hareketlendirilmesinde kullanılan parçadır. Bir HPLC pompası 6000 psi (≈ 410 atm) basınca kadar çıkabilmektedir (Skoog et al. 1998, Ulusoy 2010). Kullanılan partiküllerin boyutu küçüldükçe uygulanan basıncın da arttırılması gerekmektedir. Ancak küçük partiküller yüksek çözünürlük, hızlı analiz ve yüksek örnek yükleme kapasitesi gibi bir takım avantajlara da sahiptir. Modern pompalar 400 atm'e kadar basınç üretimi, puls içermeyen basınç çıkışı,

çok sayıda çözücünün korozyon etkisine dayanıklı (paslanmaz çelik veya teflondan yapılmış sızdırmazlık), akış hızı hassas ayarlanabilmeli ve kararlı akış hızında çalışabilme (0,01–10 mL/dk arasında akış hızı ve %0,5 veya bağlı tekrarlanabilirlikte akış kontrolü) gibi özelliklere sahiptir (Skoog et al. 1998, Ulusoy 2010).

Ticari olarak mevcut pompalama sistemlerinin farklı tipleri vardır. Bunlar, pistonlu pompalar, şırınga tipi pompalar, doğrudan gaz basınç pompalar ve pnömatik hızlandırıcı pompalardır (Skoog et al. 1998, Ulusoy 2010).

Pistonlu pompalar en yaygın kullanılan HPLC pompalarıdır. Çalışma mekanizması tulumba gibidir. Genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Pistonlu pompalar pulslu bir akış ürettiklerinden dolayı sakıncalıdır. Pistonlu pompaların üstünlüğü, küçük iç hacimleri (35-400 µL), yüksek basınç çıkışı (700 atm'ye kadar), gradiyent elüsyona uyarlanmaya hazır oluşları ve kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız olan sabit akış hızlarıdır (Ulusoy 2010).

Modern HPLC donanım pompaları bilgi işlemci kontrollü olup, çok çeşitli firma tarafından değişik modellerde üretilmektedir. Pompaların aynı zamanda çözücü oranlarında değiştirebilecek şekilde programlanabilmesi, çözücü programlaması adı verilen ve çok daha etkin bir ayırmayı sağlayan tekniğin uygulanmasına olanak verir. Çözücüler, ayırma kolonuna girmeden önce karıştırılırlar. Bu sistem gerekli ayırmayı sağlamakta kullanılan iki hareketli faz için, iki yüksek basınç pompasına ya da gradiyent valfe sahiptir. Bu amaçla kullanılacak iki hareketli fazın tamamen karışabilir olması gerekir. Pompalar yoluyla çözücüler, ya difüzyon ya da mekanik olarak çalışan küçük hacimdeki karıştırma gözlerinde karıştırılırlar (Ulusoy 2010).

1.8.3 Enjeksiyon Loopu

Analiz edilecek karışımın sisteme enjektör vasıtasıyla aktarıldığı parçadır. HPLC cihazlarında manuel ve bilgisayar kumandalı oto-enjektörler (auto sampler) olmak üzere 2 çeşit loop bulunmaktadır (Ulusoy 2010).

Manuel enjektörlerde örneğin enjekte edilebilmesi için enjektör önce doldurma pozisyonuna getirilerek örnek, isteğe göre seçilebilen sabit hacimli, loop içerisine doldurulur. Loop'a doldurulan örnek hacmi loop sabit hacmini geçerse, fazla olan kısım dışarıya otomatik olarak atılır. Daha sonra enjektörün kolu enjeksiyon pozisyonuna getirilerek örnek mobil faz içerisine enjekte edilmiş olur. Kullanılan loop hacimleri çok değişken olup genellikle 5 µL-5 mL aralığında değişir. Loop hacmi küçüldükçe tekrarlanabilirlik adına yapılan hata oranı da büyümektedir. Oto enjektörler xy tipi ve carousel tipi olmak üzere iki tiptir, xy tipinde enjektör hareketli olup belirtilen koordinatlara giderek örneği şişesinden çekmekte ve loop vasıtasıyla mobil faza enjekte etmektedir. Bunun için seçilen örneklere ait bilgilerin, gerekli yazılım kullanılarak, önceden bilgi işlemciye girilmesi gerekmektedir. Carousel tipinde ise örnekler dönen, dairesel şekilli bir taşıyıcı vasıtasıyla sabit bir enjektörün altına taşınmaktadır. Otomatik enjektörler ile istenen hacimlerde numuneyi sisteme vermek mümkündür.

Numune enjeksiyonu yüksek basınçta yapılır. Enjekte edilen numune, yüksek basınçta pompalanmakta olan hareketli fazın arasına verilir ve numune kolona doğru hareketli faz tarafından sürüklenir (Gündüz 2001). Ulaşma çok küçük bir hacim içinde olur (numune dağılmaz). Çünkü hareketli faz, sıvısının büyük bir kısmı yan geçişten yoluna devam ederken, çok az bir kısmı numuneyle karışıp ana hareketli fazla birleşir. Böylece numune fazla seyrelmeden kolona ulaşır. Numune seyrelirse dedektörden yayvan pikler elde edilir (Ulusoy 2010).

1.8.4 Kolonlar

Modern HPLC donanımının 4 temel yapı taşından birisi olan kolon, karmaşık örneklerde bileşenlerin birbirinden iyi çözünürlükle ayırımından sorumlu sabit fazdır. Kolon imalatında yapı materyali olarak 316 paslanmaz çelik, teflon, cam en sık tercih edilenlerdir.

Bir kromatografik sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani, kolon dolgu maddesinin seçilmesi ve kullanılmasıyla tayin edilir. İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır. Geniş yüzey alanına, düzgün olarak dağılmış ve hareketli faza kolay erişebilir açık yapısal yüzeye sahip olmalıdır. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir. Kolon verimi; kolon dolgu maddesi, ortalama parçacık çapı, kolonu doldurmak için kullanılan teknikler, kolonun iç çapı ve kolonun iç yüzeyinin geometrisi gibi pek çok faktör tarafından

tayin edilir. Paslanmaz çelik kolonların, malzeme özellikleri açısından en uygun kolonlar olduğu ortaya çıkmıştır. Analitik uygulamalarda, 2,1 mm, 3,2 mm ve 4,5 mm iç çapa sahip kolonlar 10-30 cm arasındaki uzunluklarda kullanılırlar (Ulusoy 2010).

Kolon dolgu maddesi olarak genel de boncuk şeklinde iki tip madde kullanılır. Birinci tip maddeler gözenekli olmayan cam veya bir polimerden yapılır. Çapları genellikle 30-40 µm'dir. Yüzeylerine gözenekli yapıda silika, alümina veya iyon değiştirme reçinesi kaplanır. Bazı uygulamalarda bu şekilde kaplanmış olan boncukların üstüne bir kaplama daha yapılır, bu adsorpsiyonla kaplanmış veya yayılmış bir sıvıdır. Boncuk şeklindeki parçacıklar duruma göre doğrudan bir organik maddeyle de kaplanabilir. Bunlar halen sadece koruyucu kolon dolgu maddesi olarak kullanılır. Boncuk şeklinde olan ikinci tip maddeler gözeneklidir. Bunlar çapları 3-10 µm olan mikro parçacıklardır. Bunlar da silika, alümina ve iyon değiştirme reçinelerinden yapılır. Ancak en çok silikadan yapılanlar kullanılır. Gözenekli madde neyle yapılmış olursa olsun, yüzeyi film şeklinde organik maddeyle kimyasal veya fiziksel olarak kaplanır (Gündüz 2001).

Kolonun, hareketli fazın girdiği ve çıktığı uçlarında sürüklenmemesi için iki tıkaç (frit) bulunur. Tıkaçlar porlu yapıda olup sıvının geçişine izin vermekte fakat sabit fazın geçişine izin vermemektedir (Ulusoy 2010).

Kolonun ayırım gücü ve performansı yapıldığı materyalden çok, iç yüzeyine yapılan kaplamada kullanılan malzemenin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden etkilenmektedir. Kullanılan bu tür kaplama malzemeleri çok çeşitli olup, kullanılacak mobil fazın ve uygulanacak HPLC metodunun özelliklerine ve analizi yapılacak örneğin bilinen kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre seçilmelidir. Seçilecek kolonun HPLC uygulamasında kullanılacak akış hızı ve dolayısıyla oluşacak basınca dayanıklı olmasına dikkat edilmelidir. Birçok analitik kolonun iç çapı 2-5 mm aralığında değişmektedir. Kolon iç çapı arttıkça akış hızı ve iç doldurma hacmi artmakta ama oluşacak piklerin çözünürlüğü dolayısıyla duyarlılık azalmaktadır. Kolonların boyları (uzunluğu) çok çeşitli olup genellikle 30-300 mm aralığında değişmektedir. Kolon uzunluğu arttıkça örnek bileşenlerinin ayırımı daha iyi olmakta fakat analiz süresi uzadığı için daha fazla mobil faz harcanmaktadır. Kolon boyutlarının tanımlanmasına uluslararası standartlar getirilmiştir. Buna göre önce mm cinsinden uzunluk ve çap yazılmakta, bunu firma adı, sabit faz türü, Å türünden poroz yüzey çapı ve µm cinsinden partikül büyüklüğü izlemektedir. Örneğin, 250/4,6 Thermo C18 100-5 yazıldığında,

kolonun 250 mm uzunluk ve 4,6 mm iç çapa sahip olduğu anlaşılmaktadır. Kolonun firması (markası) Thermo olup, sabit faz türü normal fazda kullanılan bir tür olan C18'dir. Por yüzey çapı 100 Å olup, dolgu materyaline ait partikül büyüklüğü 5 µm'dir (Ulusoy 2010).

1.8.5 Dedektörler

Kolonda ayırımı yapılan analizlenecek maddeye ait bileşenlerin alıkonma zamanlarına göre sırayla içerisinde geçerken miktar tayinlerinin yapıldığı HPLC donanımıdır. Örnek, hareketli faz ile birlikte kolon boyunca sürüklenerek dedektöre taşınır. HPLC cihazlarında kullanılan dedektörler, diğer sıvı kromatografisi cihazlarında kullanılan dedektörlerle aynıdır. Analizin amacına göre farklı dedektörler kullanılır (Gündüz 2001).

Kullanılacak dedektörün türü analiz edilecek maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre seçilmelidir. Dedektörler, örnek bileşenlerini tayin ederken ölçtükleri fiziksel özelliklere göre, 8 çeşittir. Bunlar;

Ultraviyole/görünür bölge dedektörü (Ultraviolet/Visible dedector-UV/VIS): Absorbans dedektörleri kromatografi kolonundan gelen elüyenin absorbansını ölçen cihazlardır. Birçok absorbans dedektörleri çift ışın demetlidir. Işın demetlerinden birisi elüye edilmiş çözüldüden, diğer demet ise, şiddetin azaltılması için bir filtreden geçirilir. Bu demetleri ölçmek için birbiriyle uyumlu çalışan iki fotoelektrik dedektör kullanılır. Işın yolu kesicili bir sistem de kullanılabilir. Bu durumda tek fototüp yeterli olur. Her iki durumda da kromatogram, dönüştürülmüş iki sinyalin oranının logaritmasının zamana karşı çizilen grafiğinden meydana gelmiştir. Spektrum taraması yapmak, farklı dalga boyunda çalışmak veya dalga boyunu zamana karşı programlamak mümkündür (Gündüz 2001).

Fotodiyot dizisi dedektörü (Photodiode array dedector-DAD): UV/VIS dedektörden farkı, 512 elementten oluşan bir yüzeyde, her elementin ayrı bir dalga boyundaki absorbansı eş zamanlı olarak ölçebilmesidir. Bu sayede 3 boyutlu kromatogramlar almak ve istenilen her pikin çok hızlı spektrum taramasını görebilmek olasıdır. Ayrıca istenilen dalga boyu aralığında çalışabilmesi bu dedektörün sağladığı bir diğer önemli avantajdır. Kullanılan ışık kaynağı döteryum veya tungsten lambadır (Skoog et al. 1998).

Floresans dedektörü (Fluorescence dedector-FLD): Organik maddelerin yaklaşık %15'i floresans oluşturma yeteneğine sahiptir. Oluşan floresans ölçülmektedir. En basit floresans dedektörlerinde, uyarıcı kaynak olarak civa lambası, ışınları süzmek için de bir veya birkaç filtre kullanılır. Daha iyi cihazlarda kullanılan ışık kaynağı ksenon lamba olup floresans ışımalarını izole etmek için ise optik ağ monokromatör kullanılır. Duyarlılığı UV/VIS dedektöre göre en az 10 kat fazladır (Skoog et al. 1998).

İletkenlik dedektörü (Conductivity dedector-CDD): İletkenlik ölçülür. Daha çok anyon ve kation analizlerinde kullanılır. Sıcaklık kontrolü çok önemlidir bu sebeple kolon fırını içerisinde çalışmalıdır. Kullanılan mobil fazın iletkenliği ne denli düşük olursa oluşan gürültü de o denli düşük olur.

Refraktif indeks dedektörü (Refractive index dedector-RID): Kırılma indisi ölçülür. Örnek bileşenlerinin bulunduğu ortamda yoğunluk artacağından gelen ışık kırılarak hücreyi terk eder. Işığın ölçülen kırılma oranından (kırılma indisi) kantitatif tayin yapılır (Skoog et al. 1998).

Elektrokimyasal dedektör (Electrochemical dedector-ECD): Elektroaktif maddeler analizlenebilir. Yani bileşenler, belirli potansiyel değerlerinde yükseltgenbilir veya indirgenbilir olmalıdır (Skoog et al. 1998).

Kütle spektrometrik dedektör (Mass dedector-MS): Örnek bileşenlerine ait çok özgün kromatogramlar elde edilir, dolayısıyla özellikle kalitatif tayinlerde teşhis amaçlı kullanımlarda çok önemli bir dedektördür. Bu tür bir dedektörle hem ayrılan bileşenlerin miktar tayinleri hem de yapı tayinleri yapılabilmektedir. Sıvı kromatografisi ile kütle spektrometriyi birbirine bağlamadaki temel problem birincisinin bağıl olarak çok çözücü hacimleri ile diğerinin ise eser oranda maddeyle çalışmasıdır. Bu problemi çözmek amacıyla çeşitli ara bağlantılar geliştirilmiştir. Bunlardan bir tanesinde kolondan çıkan elüent iki kısma ayrılır ve çok az bir kısmı kütle spektrometreye gönderilir. Bir diğerinde ise numune bir buharlaştırma hücresine alınır. Burada çözücüsü uçurulduktan sonra, kalıntı (analizi yapılacak madde) iyonlaştırma odacığında iyonlaştırılır. Termosprey olarak adlandırılan yeni metotta ise kolondan çıkan ve akış hızı 2 ml/dak.'ya kadar olan elüent paslanmaz çelikten yapılmış ısıtılan kapiler bir boru içinden bir aerosol jeti halinde geçirilerek sıvı buharlaştırılır. Sprey içinde, elüent içine katılmış amonyum asetat gibi bir tuz yardımıyla, yük aktarma

sonucu, analit iyonlaştırılır. Sonuçta elde edilen spektrum sadedir ve mol kütlesi hakkında bilgi verir. Fakat, termosprey bağlantı, sadece amonyum asetat gibi tuzları çözebilecek polar hareketli fazlarda yani polar analitlerde kullanılabilir (Skoog et al. 1998, Gündüz 2001).

Evaporatif ışık dağıtıcı dedektör (Evaporative light scattering dedector-EL): Bu dedektörlerde kolondan gelen çözelti bir nebulizöre aktarılır. Çözelti azot veya hava akımıyla ince bir sis haline getirilir. Sis sıcaklığı kontrol edilen bir tüpten geçirilir ve çözücü buharlaştırılır. Geriye analiz edilen maddenin mikrokürecikleri kalır. Bu parçacıklar bir lazer demetinden geçirilir. Etrafa yayılan ışıklardan parçacık akımına dik yöndeki ışın demeti bir silikon fotodiyotla ölçülür. Bu ölçme metodunun avantajı uçucu olamayan tüm maddelere uygulanabilmesi ve tekrarlanabilme özelliğinin yüksek olmasıdır (Skoog et al. 1998, Gündüz 2001).

UV (Ultraviyole) ya da MS (kütle spektroskopisi) dedeksiyonuyla birlikte RP-HPLC bitki, gıda vb. ekstraktlarının fenolik bileşimlerinin tayini için kullanılan bir metottur. Fenollerin ayrılması genellikle metanol (MeOH) veya asetonitril (CH₃CN, ACN) ve modifiye edici olarak az miktarda asit içeren su hareketli fazlarıyla çalışan C18 kolonlarından gerçekleştirilir. Mobil fazda fenolik asitlerin protonlaşmalarını garantilemek için formik asit (HCOOH), asetik asit (AcOH), trifloroasetik asit (TFA) ve fosforik asit (H₃PO₄) gibi asitler asidik modifiye ediciler olarak kullanılırlar ve böylece pik şekli ve çözünürlüğün gelişmesi sağlanır. TFA pek çok elektrofilik flor grupları içerdiği için bunun eklenmesi durumunda da bir proton verici olarak hizmet eder ve iyon baskısına sebep olur (Wu et al. 2004).

1.8.6 HPLC ile Miktar Tayini

HPLC ile miktar tayini yaparken pik yükseklikleri veya pik alanlarından yararlanılır. Kullanılan ekstraktın pik yüksekliğinin veya alanının bir veya birden fazla kullanılan standard çözeltinin pik yüksekliği veya pik alanı ile kalibrasyon eğrisi çizilerek karşılaştırılması esasına dayanır. Kromatogramlardan doğru sonuç alınması, standartların ve örneklerin kromatogramlarının alınması sırasında kolon şartlarının pik genişliğinin değişmesine engel olacak şekilde kontrolüyle sağlanır. Bunlar; kolon sıcaklığı, elüent akış hızı ve örnek enjeksiyon hızıdır. Pik alanları pik genişlemelerinden bağımsız olduğu için pik yüksekliğine göre daha uygun bir parametredir. Modern kromatografik cihazlarda dijital elektronik integratörlerin kullanımıyla pik alanları çabuk ve daha doğru hesaplanabilmektedir (Skoog et al. 1992, Brown and Grushka1995b, Cazes 2004).

BÖLÜM 2

LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Bryofitlerde Yapılan *in vitro* Doku Kültürü, Antioksidan Aktivite, Total Fenol Tayini ve Biyolojik Aktivite Çalışmalarının Özetleri

Bryofitlerde *in vitro* doku kültürü çalışmaları tehlike kategorisinde yer alan türlerin korunmasında, biyolojik aktif bileşiklerin tespiti ve yeni bileşiklerin varolabileceği düşünülerek, yapılan bilimsel çalışmalar son zamanlarda hızla artmaktadır (González et al. 2006).

Bryofitlerle ilk *in vitro* doku kültür çalışmaları Servettaz (1913)'te başlamış fakat sonraki yıllarda yüksek bitkiler kadar önemsenmemiştir. Son 20 yılda artarak, yaklaşık 300 karayosunu, 50 ciğerotu ve birkaç boynuzotunda yapılmıştır. Ayrıca bryofitlerin %95'inden fazlasının kültür çalışmalarının yapılmadığından bahsedilmiştir (Duckett et al. 2004).

Marchantia polymorpha L.'nin kültür çalışmasında anatomik, fotoperiyodizm ve en iyi besin ortamı farklılıkları incelenerek başarıyla rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir (Voth and Hammer 1940, Voth 1941, 1943, 1945).

Funaria hygrometrica Hedw.'nin protonema farklılaşmasını düzenleyen ardışık bir etkileşim gösteren dış kaynaklı oksinlerin Johri and Desai (1973) ve sitokininlerin Hahn and Bopp (1968) karayosunlarının normal gelişimlerini engelleyebileceğinden bahsedilmektedir (Lehnert et al. 1983). Hatanaka-Ernst (1966)'da *Funaria*'nin oksin gereksiniminden bahsetmiş fakat detaylı bilgi vermemiştir. Fakat Ashton (1979a, b) tarafından *F. hygrometrica*'nin hormonlara bağlı gelişimi araştırılarak protonema farklılaşmasıyla oluşan kloronema ve kaulonema gösterilmiştir (Bopp 1983). *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. kültürlerinin oksin ve sitokininlere verilen cevabının daha farklı olduğu gösterilmiş

ve kaulonema oluşumu için düşük miktarda oksinin etkili olabileceği önerisi kabul görmüştür (Cove and Ashton 1984).

Oksinlerin (1-10 μ M konsantrasyonlarda NAA (naftalen asetik asit)) karayosunları rejenerasyonu için kullanışlı olduğu belirtilmiştir (Goode et al. 1992a, b). Sitokinlerinse (10 μ M konsantrasyonda kinetin) sürgün oluşumunu etkilediğinden bahsedilmiştir (Bopp 1983). Ayrıca 1-10 μ M konsantrasyonlarda ABA (absisik asit), protonemal gelişimi indüklediği gösterilmiştir (Goode et al. 1993a, b, c).¹

Splachnaceae familyasına ait birkaç karayosunu türünde absisik asitin kaulonema farklılaşmasına sebep olduğu ve fenolik bileşiklerin ortaya çıktığı ayrıca aktif karbonun kültür ömrünü uzattığı belirtilmiştir (Bopp 1983).¹ Yüksek bitkilerdeki gibi, bryofitlerde de kallus oluşumu şeker, bitki büyüme düzenleyicisi ve hindistan cevizi sütü içeren besin ortamlarında indüklenebildiğinden bahsedilmiştir (Kowalczyk et al. 1997).¹

Bryofitlerin yüzey sterilizasyonu denemelerinde NaOCl (sodyum hipoklorit) ve NaDCC (sodyum dikloroizosiyanürat) kullanarak yapraksı gametofit dokularında %0,5 konsantrasyonda 2-5 dk., sporofitlerde %1 konsantrasyonda 3-6 dk., gemmalarda %0,1-0,5 konsantrasyonda 2-8 dk., talluslu dokularda %0,05-0,1 konsantrasyonda 10-20 sn başarılı olduğundan bahsedilmiştir (Duckett et al. 2004).

Çin’de nadir yayılış gösteren medikal bir karayosunu türü olan *Rhodobryum giganteum* (Schwägr.) Paris çalışmasında modifiye Knop, White ve MS ortamlarını denemiş ve en iyi gelişme gösterdiği ortamın MS olduğunu belirtmiştir. *Anomobryum filiforme* var. *concinatum* (Spruce) Aman. (Bryaceae) 4 farklı besin ortamı deneyerek en başarılı ortamın ½Knop’s olduğunu bildirmiştir. *Bryum coronatum* Schwägr.’un *in vitro* kültürü ve fitokimyasal analizleriyle ilgili yaptığı çalışmada şekerli ¼MS ortamında en başarılı rejenerasyonu gerçekleştirmiştir (Chen et al. 2009, Sahu and Asthana 2013, Pandey et al. 2014).

Bryum capillare Hedw.’nin *in vitro* kültür çalışması Sabovljević (2002) tarafından yapılmış fakat farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi ve fenolik bileşiklerinin tespiti konusunda çalışmaya rastlanmamıştır. Sabovljević’in bu çalışmasında 1 mg/l 2,4 D ve 2 mg/l kinetin kullanarak ilk 10-14 gün içerisinde protonema oluşumunu gözlemlediğinden

bahsetmiş sonrasında 6 aylık periyot içerisinde kültürlerin protonemal formda kaldığından söz etmiştir. Ayrıca *in vitro* kültürlerin büyümesiyle ilgili bir ölçüm verilmemiştir (Sabovljević et al. 2002).

Sphagnum palustre L. için hazırlanan MS, ½MS ve şekersiz hormonsuz MS besin ortamlarında pH:6, 25±2°C sıcaklık, 16/8 gün uzunluğu ve 47 µmol/m²/s fotoperiyodunda başarıyla *in vitro* kültürü gerçekleştirilmiş ve talluslu protonema oluşumu gösterilmiştir. Fakat çalışma hakkında büyüme verileriyle ilgili detaylı bilgiler verilmemiştir (Sabovljević et al. 2009).

Thamnobryum alopecurum Nieuwland Ex Gangulee'un *in vitro* kültür çalışması Sabovljević (2012)'de 10 farklı besin ortamında (MS1, MS2, MS3, MS4, MS5, MS6, MS7, BCD1, BCD2, BCD3), 16/8 ve 8/16 ışık periyodunda, 18, 20, 25±2 C° sıcaklıklarda ve yüzey sterilizasyonu için 6 farklı NaOCl (3%, 5%, 7%, 10%, 13% ve 15%) konsantrasyonlarında denemeler yapmıştır. Yüzey sterilizasyonu için en iyi %10'luk konsantrasyonda, en iyi MS ortamları arasında MS7'de (MS mineral tuzları, 0.1µM IBA ve 0.03µM BAP), 16/8 gündüz/karanlık ışık periyodunda ve 20±2 C° elde etmiştir. Ayrıca ortamlara şeker eklendiğinde spor çimlenmesini teşvik ettiği fakat gametofit gelişimini durduğunu gözlemlemiştir (Sabovljević et al. 2012).

Bryofitlerdeki aromatik bileşikler sekonder metabolitlerin 4 sınıfından meydana gelir. Bunlar benzeoidler, flavonoidler, fenilpropanoidler ve bibenzil türevleridir. Sıklıkla dimer veya polimer formlarıyla karşılaşılır. Örnek olarak ciğerotlarında bibenzil veya bibenzil türevleri, karayosunlarında ise biflavonlar veya triflavonlardır. Bununla beraber bryofitler hemde yağ asidi türevleri ve s- ve n- formlarında bileşikler üretir. Bu bakış açısıyla organizmalar, farklı çevresel faktörlerin etkisiyle hayatta kalmak için bu sekonder metabolitler üretilir. Bryofitlerin fitotoksik aktivitesine bakıldığında, bryofit habitatları çevresinde yüksek bitkiler gelişemezler. Bu olgu farklı bryofitlerin diğer bitkilerle rekabeti sırasında toksik bileşikler olarak sekonder metabolitlerin sentezi olabildiğidir. Maalesef bugüne kadar birkaç araştırmacı bryofitlerin diğer bitkilerle ilişkilerini çalışmış ve bryofitlerden tanımlanan sadece birkaç sekonder metabolitin diğer bitkilerle rekabetinde potansiyel etki gösterebilecek kapasiteye sahip olduğundan bahsetmiştir. *Plagiomnium affine* (Blandow ex Funck) T. J. Kop.'den viteksin ve apigenin, *Dicranum scoparium* Hedw.'dan apigenin-7-O-triglikosid ve luteolin-7-O-neohesperidosid, *Plagiomnium cuspidatum* (Hedw.) T. J. Kop.'dan saponarin, *Hedwigia*

ciliata (Hedw.) P. Beauv.'dan lusenin-2 ve *Bartramia pomiformis* Hedw.'den bartramiaflavon, *Tortula muralis* Hedw.'in protonemal gelişimi ve spor çimlenmesini inhibe ettiği gibi *Raphanus sativus* L.'unda kök gelişimini inhibe etmiştir. Saponarinin aktif bileşik madde olduğu belirtilmiştir. Bryofitlerin antimikrobiyal etkisine bakıldığında patojen saldırılara karşı ana bitkide savunma geliştirmede yararlı olan birkaç antimikrobiyal madde izole edilmiştir. Bunlara örnek *Balantiopsis cancellata* (Nees) Stephani'nın diklorometan ekstraktlarından 2-feniletıl benzoat (5), izotaşın B (6), and (R)-2-hidroksi-2-feniletıl benzoat elde edilmiştir. Bu bileşikler *Artemia salina* eklem bacaklısını zehir etkisi göstermiş *Spodoptera littoralis* (Pamuk yaprak kurdu)'in beslenmesine inhibe edici etki göstermiştir. *Brachythecium rutabulum* (Hedw.) Schimp. and *Mnium hornum* Hedw.'da protokatekuik asit ve gallik asit sümüklü böceklerin beslenmesinde inhibe edici etki göstermiştir. Ayrıca karayosunu sürgünlerinde bol bulunan ferulik asit ve *p*-kumarik asit benzer etki göstermiştir (Xie and Lou 2009).

Bryofitlerin kimyasal içeriklerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bugüne kadar karayosunlarının %2'den daha azı, Ciğerotlarınınsa yaklaşık %6'sının kimyasal olarak incelendiği düşünölmektedir (Asakawa 1994). Bryofitler; mikroorganizmalar, böcekler, salyangozlar ve memeli hayvanlar tarafından zarar görmemesine rağmen yıllardır kimyasal içeriklerinin belirlenmesi ihmal edilmiştir. Son yüzyılda yüzlerce yeni bileşik izole edilmekle beraber ve 40'tan fazla yeni fenolik bileşik, terpenoid ve asetogenin karbon iskeleti bulunmuştur. Ciğerotlarından izole edilen bazı terpenoidlerin anti influenza, anti-hiv inhibisyonu, kas gevşetici ve anti obezite etkisi olduğunu derlemiştir. Ciğerotları sekonder metabolitlerin yeni bir kaynağı olmasına rağmen, bugüne kadar sadece %10'unun kimyasal içeriğı belirlenmiştir (Asakawa 2012). *Bryum argenteum* Hedw.'un panzehir, ateş düşürücü, anti-burun iltihabı aktiviteye sahip olması, bryofitlerin gelecekte önemli sekonder metabolit kaynağı olabileceğini belirtmiştir (Sabovljević et al. 2006).

Bryofitlerde sekonder metabolitlerin varlığı, ilk kez Paul'ün (1908) birkaç *Sphagnum* cinsinde antosiyanin gibi pigmentleri fark etmesiyle ortaya çıkarıldı. Molisch (1911)'in *Porella platyphylla* (L.) Pfeiff. türünde ve *Mnium* cinsinde saponarin ve flavonoid-C-glikozid varlığını tespit etmiştir (Kozłowski 1921). Nadir bulunan üç flavonoid olan 3-deoxyanthocyanin, luteolinidin 5-O-glikozid, 5-O-diglucoside *Bryum cryophilum* Mårtensson türünün hücre öz suyundan izole edilmiştir (Benz et al. 1962).

Bryum capillare Hedw.'de bir flavon olan apigenin, luteolin ve izoflavon olan orobol, orobol türevleri, pratensein ve pratensein türevlerinin varlığından bahsedilmiştir (Anhut et al. 1984). Ayrıca başka bir çalışmada *B. capillare*'de bir flavon olan diosmetin, 6-hydroxyluteolin ayrıca antosiyanin pigmentleri içerisinde açillenmiş asit olan malonik asit bulunduğunu belirtmiştir (Stein et al. 1985).

Markham (1969) yılında *Hymenophyton flabellatum* (Labill.) Dumort. ciğerotundan iki apigenin di-C-glikoziti izole ederek flavonoidlerin varlığından bahsetmiştir (Chopra and Kumar 1988).

Sphagnum magellanicum Brid., *Plagiomnium* cinsinin HPLC analizi yapılarak vanilik, klorogenik, şiringik, kafeik, gallik, 3-4 hidrobenzoik, *p*-kumarik ve salisilik asitler, luteolin, chrysoeriol, apigenin, saponarin, orientin ve rhoifolin varlığını göstermiştir (Montenegro et al. 2009, Harris 2009).

Ciğerotu *Lunularia cruciata* (L.) Dumort. ex Lindb. ve karayosunu *Brachythecium velutinum* (Hedw.) Schimp.'un metanol ekstraksiyonlarının HPLC analizleri yapılarak *L. cruciata*'da luteolin-7-o-glukozid, kuersetin ve *B. velutinum*'da ise 4-o-kafeoilkuinik, 5-o-kafeoilkuinik, kafeik asit, apigenin-7-o-glucoside, elagikasit, flavonoid aglukon luteolin ve apigenin varlığı kromatogramlarda gösterilmiştir (Sabovljević et al. 2009).

Litvanya'da yayılış gösteren bryofit türlerinin kimyasal yapılarını daha iyi anlamak amacıyla elementel analiz yöntemleri kullanılarak temel yapısal elementlerinin miktarı belirlenmiştir (Kļaviņa et al. 2012).

Pellia endiviifolia (Dicks.) Dumort. ve *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. & Lindenb. ciğerotlarında protein içeriği, süper oksit dismutaz antioksidan enzim aktivitesinin yüksek bitkilerdeki gibi hemen hemen yakın olduğunu ortaya koymuştur (Sharma et al. 2014).

Marchantia diptera Nees & Mont. (Marchantiaceae), *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. (Ditrichaceae), *Dicranum polysetum* Sw., *Dicranum scoparium* Hedw. (Dicranaceae), *Leucobryum glaucum* (Hedw.) Ångstr. (Leucobryaceae), *Mnium marginatum* (With.) P. Beauv. (Mniaceae), *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv., *Polytrichum formosum* Hedw. (Polytrichaceae), *Pleurozium schreberi* (Willd. ex Brid.) Mitt. (Entodontaceae), *Thuidium*

tamariscinum (Hedw.) Schimp. (Thuidiaceae), *Brachythecium rutabulum* (Hedw.) Schimp. (Brachytheciaceae), *Calliergonella cuspidata* (Hedw.) Loeske (Hypnaceae), *Hypnum mammillatum* (Brid.) Loeske (Hypnaceae), *Polytrichastrum alpinum* (Hedw.) G. L. Sm., *Bryum moravicum* Podp. ve medikal bir karayosunu olan *Rhodobryum ontariense* (Kindb.) Kindb. türlerinde total fenol miktarı ve aktioksidan aktivitesi çalışılmış, yüksek fenol içeriğe ve antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirtilerek gelecekte antioksidan ajan kaynağı olarak ilaç eldesinde yeni bir yön ortaya koyacağından bahsedilmiştir (Hsiao et al. 1996, Chobot et al. 2006, 2008, Bhattarai et al. 2009, Cvetić et al. 2009, Pejin et al. 2012, Pejin 2013, Pejin et al. 2014).

Sphagnum cuspidatum subsp. *subrecurvum* (Warnst.) A. Eddy, *Sphagnum cuspidatum* Müll. Hal., *Sphagnum junghuhnianum* Dozy & Molk., *Pogonatum cirratum* subsp. *fuscatum* (Mitt.) Hyvönen ve *Pogonatum cirratum* subsp. *macrophyllum* (Dozy & Molk.) Hyvönen türlerinin fitokimyasal içerikleri, antioksidan içeriği ve antiproliferatif (tümör hücrelerinin büyüme inhibisyonu) çalışması yaparak *P. cirratum* subsp. *fuscatum* ve *S. cuspidatum* türlerinin metanol ekstraktlarının potansiyel bir antikanser ajanı olarak daha fazla araştırmalarının yapılması gerektiğinden bahsetmiştir (Karim et al. 2014).

Gelişmiş birçok ülkede yaklaşık %80 oranında terapötik (iyileştirici) maddeler şifalı bitkilerden elde edilmiştir. Bulaşıcı hastalıkların büyük çoğunluğunun mikrobiyolojik kaynaklı olduğu ve bakteri direncinin ortaya çıkmasıyla beraber, doğal antimikrobiyal terapötik bitkilerin evrensel talebinde bir artış gözlenmektedir (İlhan vd. 2006).

Bryofitlerin bilinen antifungal bileşikleri terpenlere, bibenzillere, bisbibenzillere, yağ asiti türevlerine ve asetofenonlara bağlıken basit toprak bitkisi olan karayosunların ekstratlarında bulunan isoflavonoid, flavanoid ve bioflavanoid mikroorganizmalara karşı kimyasal bariyer olarak kaydedilmiştir (Scher et al. 2004).

Richardson (1981)'de birçok karayosunu türünün çürütmesinde bakterilerin önemli bir rol oynamadığı bilindiğinden bunun nedeni olarakta karayosunlarının üretmiş olduğu antibiyotikten kaynaklanabileceği belirtilmiştir.

Yapılan araştırmalarda bazı bryofit türlerinin yüksek antibiyotik aktiviteye sahip olduğu görülürken, bazılarının ise örneğin *Funaria hygrometrica* Hedw.'nin, ise test edilen bakteri ve

mantar türlerine karşı aktivite göstermediği görülmüştür. Bu durumun, türün yaşadığı habitatla ilgili olduğu düşünülmektedir. *F. hygrometrica* Hedw. türü, yangın sonrasında gelişmeye açık alanlara yerleşir ve alanlarda rekabet edeceği çok az sayıda canlı olduğu için antibiyotik madde sentezleme özelliğinin bulunmadığı düşünülmektedir (Altuner 2008).

Conocephalum conicum (L.) Dumort., *Plagionium undulatum* (Hedw.) T. J. Kop. ve *Leptodictyum riparium* (Hedw.) Warnst. türlerinin özütlerinin patojenik bakteri türlerine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca, *Atrichum*, *Dicranum*, *Mnium*, *Polytrichum* ve *Sphagnum* cinslerinde bulunan aktif antibiyotik maddelerin polifenolik bileşik olduğu tespit edilmiştir. Bryofitlerden elden edilen marchantin A, siklopentanol, yağ asitleri ve bazı öncü maddelerin antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Cody et al. 1988, Basile et al. 1998c, Ichikawa et al.1984).

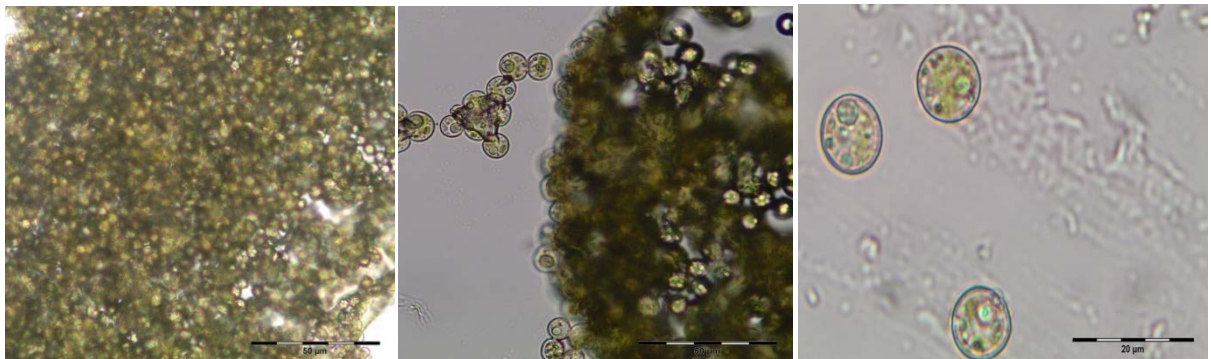
Geçmişte çok az sayıda karayosununun *in vitro* kültürlerinde fitohormonların gelişimine etkisi araştırılmıştır (Sabovljević et al. 2010c). Bu nedenle bu üç türün *in vitro* kültür çalışması ve doğadan toplanan örneklerle kültürden elden edilecek bitkilerin fenolik bileşik içeriği bakımından karşılaştırılmaları da önem kazanmaktadır.

Çalışmada *B. capillare* ve *T. alopecurum* türlerinin *in vitro* doku kültürü gametofitin uç sürgünleri ve olgun kapsüllerin sporları kullanılarak, *S. palustre* L.'nin sporofit evresine rastlanmadığından yalnızca gametofitin kapitulum kısımları kullanılarak *in vitro* kültürü yapıldı. Sporofit ve gametofit kısımları ince uçlu pens yardımıyla dikkatlice ayrılarak çeşme suyunda 30 dak. bol suyla yıkandı. Laboratuvarda yıkanan dokular bir damla tween 20 damlatılmış %5'lik sodyum hipoklorid çözeltisinde 5 dak. steril edildi. Daha sonra laminar flow kabin içerisinde kapsüller ve gametofit sürgünleri 4 kez distile steril su ile durulandı. 8 farklı modifiye MS (Murashige and Skoog 1962) ortamında B5 gamborg vitamin kullanılarak (Gamborg et al. 1968), farklı konsantrasyonlarda 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4 D) ve Kinetin, 30 g/l sükroz veya sükrozsuz, 6 g/l agar içeren ortam kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

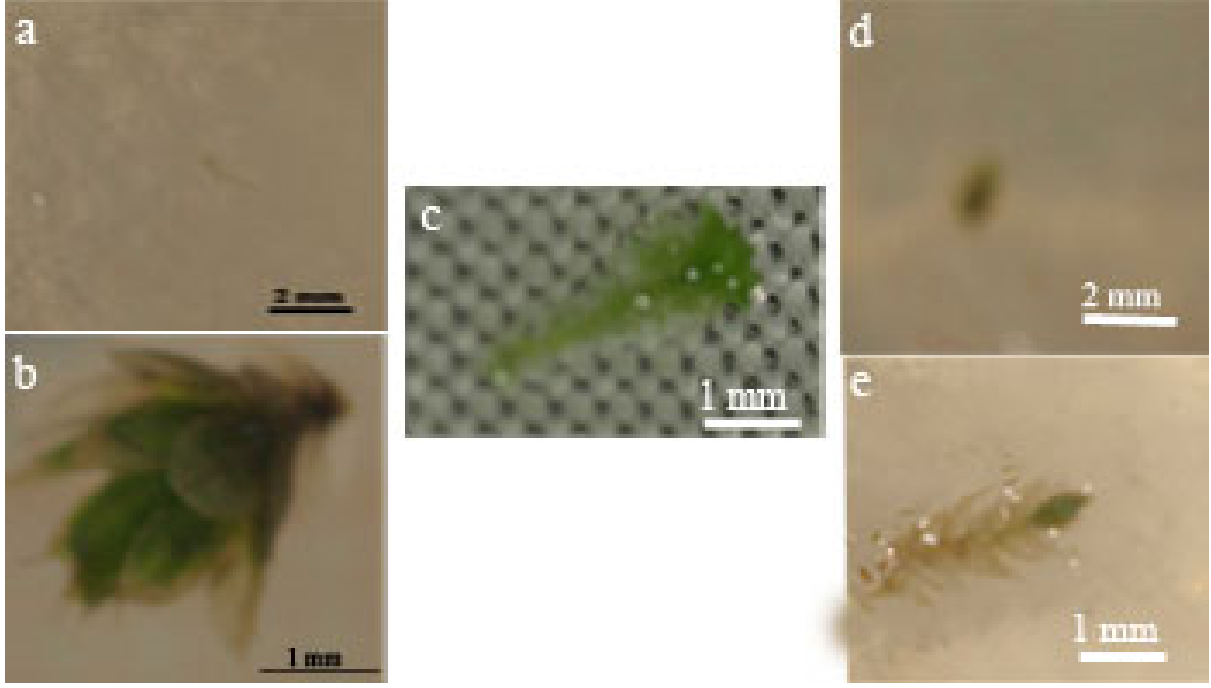
Gametofit sürgün uçları 2-5 mm boyunda her petriye 5'er eksplant olacak şekilde ekildi. Sporlar ise her petriye 5 farklı noktaya serpilerek ekimleri yapıldı (Şekil 3.2, 3.3). 4-5 haftalık periyotlarla altkültüre alındı. Büyüme odasının ışığı 27,5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (yaklaşık 2200 lüks) ışık yoğunluğunda olacak şekilde cool floresans lambalarla (Serin beyaz ışık), 24 \pm 2 °C'de, 16/8 fotoperiyodunda sağlanmıştır.

Çizelge 3.1 *In vitro* doku kültüründe kullanılan 8 farklı MS ortam içeriği

Ortam	Şeker (g/l)	2,4 D (mg/l)	Kinetin (mg/l)
<i>MS₁</i> :	-	-	-
<i>MS₂</i>	30	-	-
<i>MS₃</i>	30	0,5	0,5
<i>MS₄</i>	-	0,5	0,5
<i>MS₅</i>	30	0,5	1
<i>MS₆</i>	-	0,5	1
<i>MS₇</i>	30	0,5	1,5
<i>MS₈</i>	-	0,5	1,5



Şekil 3.2 *Bryum capillare* kapsüllerinden ortamları aktarılan sporların görüntüleri



Şekil 3.3 Türlerin ilk ekimlerine ait görseller a) *B. capillare* spor kültürü b) *B. capillare* gametofit apikal uç kültürü c) *S. palustre* gametofit kapitulum uç kültürü d) *T. alopecurum* spor kültürü e) *T. alopecurum* gametofit apikal uç kültürü

3.2 Metod

3.2.1 Besin Ortamlarının Hazırlanması

3.2.1.1 Stok Çözeltiler

Besin ortamları hazırlanırken ortamların içerdiği kimyasal maddeler hassas terazi kullanılarak tartıldı. Düşük miktarların tartılmasının zorluğu nedeniyle ortamda kullanılan makro elementlerin, mikro elementlerin, vitaminlerin ve demir tuzlarının belirli oranlarda seyreltilmiş stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltiler amber renkli cam şişelere koyularak +4°C'de saklandı. 1 litre besin ortamı için %3 (30 g/l) sakkaroz ve %0.6 (6 g/l) agar ilave edildi.

3.2.1.1.1 Major Tuz Stok Çözeltisi (10x), (g/l)

1 litre balon joje içine bir miktar distile su koyuldu ve çizelge 3.2'de miktarları belirtilen maddeler hassas terazide tek tek tartılarak manyetik karıştırıcı üzerindeki balon jojeye

eklendi. Maddelerin kolay çözünmesi ve homojen olarak dağılması için çözelti manyetik karıştırıcı üzerinde devamlı karıştırıldı. Daha sonra karışım distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan major tuz stoğu, renkli cam şişe içerisinde +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi ve her besiyeri hazırlanışında bu stoktan 100 ml alınarak ortama ilave edildi.

Çizelge 3.2 MS ortamlarında kullanılan majör tuzlar.

Majör Stok	Miktar (g/l)
Potasyum nitrat (KNO ₃)	19
Amonyum nitrat (NH ₄ NO ₃)	16,5
Kalsiyum klorür (CaCl ₂ . 2H ₂ O)	3,3
Magnezyum sülfat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	3,7
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	1,7

Major tuz stokları içerisinde bulunan kimyasal maddeler çökelti oluşturma eğiliminde olduklarından ortam hazırlanırken çökelti oluşturup oluşturmadığı kontrol edilmeli ve az miktarlarda sık sık hazırlanmalıdır.

3.2.1.1.2 Minör Tuz Stok Çözeltisi (100x), (mg/l)

Minör stok tuzu da majör tuz stoğuna benzer şekilde 1000 ml'lik balon jöjelerde hazırlandı. Çözeltide kobalt klorür ve bakır sülfat eser miktarlarda bulunduğundan ayrı bir stok olarak hazırlandıktan sonra minör stok çözeltisine ilave edildi. Bunun için 25 mg kobalt klorür ve 25 mg bakır sülfat tartılıp tartılarak 100 ml distile suda çözdürüldü. Bu çözeltiden 10 ml alınarak önceden hazırlanan minör stok çözeltisine ilave edildi ve çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 1 litrelik besin ortamı için önceden hazırlanan bu minör tuz stoğundan 10 ml alındı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 MS ortamlarında kullanılan minör tuzlar.

Minör Stok	Miktar (mg/l)
Borik asit (H_3BO_3)	620
Potasyum iyodür (KI)	83
Mangan sülfat ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	1680
Sodyum molibdat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	25
Çinko sülfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	860
Kobalt klorür ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	2,5
Bakır sülfat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	2,5

3.2.1.1.3 Demir Stok Çözeltisi (100x), (g/l)

1 litrelik balon jöjeye bir miktar distile su koyuldu ve yukarıda miktarları belirtilen maddeler hassas terazide tek tek tartılarak manyetik karıştırıcı üzerindeki balon jöjeye eklendi. Daha sonra çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan demir stoğu renkli şişe içerisinde $+4^{\circ}C$ 'de buzdolabında saklandı. 1 litrelik besiyeri hazırlanırken bu demir stoğundan 10 ml kullanıldı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 MS ortamlarında kullanılacak demir stoğu.

Demir Stok	g/l
Demir sülfat ($Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$)	2,78
Sodyum EDTA (Na_2EDTA)	3,72

3.2.1.1.4 B5 Gamborg Vitamin Stok Çözeltisi (100x),(g/l)

1000 ml'lik balon jöje içerisine bir miktar distile su koyuldu ve balon jöje manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi. Maddeler çizelge 3.4'de belirtilen miktarlarda tek tek tartılarak balon jöjeye eklendi ve karışım distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 1 litrelik besin ortamı hazırlanırken bu vitamin stoğundan 20 ml alındı (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 MS ortamlarında kullanılacak B5 Gamborg vitamin stoğu.

B5 Gamborg Vitamin Stok	mg/l
Myo-İnositol	100
Tiyamin HCl	10
Nikotinic asit	1
Piridoksin HCl	1

3.2.1.1.5 Bitki Büyüme Düzenleyicileri

3.2.1.1.5.1 2,4 Diklorofenoksi Asetik Asit Stok Çözeltisi (mg/ml)

250 mg 2,4 D tartılıp 500 ml'lik ölçülü bir beher içerisine koyuldu. Beherde 100 ml distile su çözülünceye kadar karıştırıldı. Maddenin tamamı çözüldükten sonra çözelti distile su ile 250 ml'ye tamamlandı. Amber renkli cam şişeye koyularak +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi. 1 litrelik besiyeri ortamına 1 mg/l 2,4 D ilave etmek için stok çözeltisinden 1 ml alındı.

3.2.1.1.5.2 Kinetin Stok Çözeltisi (mg/ml)

250 mg Kinetin tartılıp 500 ml'lik ölçülü bir beher içerisine koyuldu. Beherde 5 ml distile su ile ezilerek, çözülünceye kadar damla damla 1M HCl ilave edildi. Maddenin tamamı çözüldükten sonra çözelti distile su ile 250 ml'ye tamamlandı. Amber renkli cam şişeye koyularak +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi. 1 litrelik besiyeri ortamına 1mg/l, 2 mg/l, 3 mg/l kinetinin ilave etmek için sırasıyla stok çözeltisinden 1 ml, 2 ml ve 3 ml alındı.

3.2.1.1.6 pH Ayarlanması

Kültür için hazırlanan ortamların agarları ilave edilmeden önce pH ayarlanması yapılmıştır. 1M HCl ve 1M NaOH çözeltileri kullanılarak, ortam pH' sı doku kültürü için en uygun olan 5.8'e ayarlanmıştır. pH ayarı ortam manetik karıştırıcı üzerinde sürekli karıştırılırken 1M HCl ve 1M NaOH damla damla ilave edilerek yapılmıştır.

3.2.1.1.7 Besin Ortamının Sterilizasyonu

Hazırlanan besin ortamları otoklavda 121 °C' de 20 dakika sterilize edildi ve sterilizasyonu yapılan ortamlar 10 cm çap ve 1,5 cm yükseklikteki petrilere ve 12 cm yükseklik ve 6 cm çapında kavanozlara döküldü.

3.2.1.1.8 Laboratuvar Temizliği ve Sterilizasyonu

Steril şartlar altında ekimin yapıldığı yer, laminar flow kabininin içerisidir. Kabin içi ve steril oda kullanılmadan önce %70'lik etanolle silindi. Kabinin UV-C lambası açılarak ekim işlemine kadar kabinin steril kalması sağlandı. Zemin ve kabin çevresi %10'luk ticari sodyum hipoklorit ile temizlendi.

3.2.1.1.9 Kullanılan Malzemenin Sterilizasyonu

Ekimde kullanılan kavanozlar ve filtre kağıtları otoklavda (121 °C'de 15 dakika) steril edildi. Petriler, tüm cam ve metal malzemeler 190 °C' lik etüvde 2 saatte veya otoklav (121 °C'de 15 dakika) kullanarak steril edildi.

3.2.1.1.10 Saf Su Sterilizasyonu

Dokuları yıkamada kullanılan saf su otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi.

3.2.1.1.11 Eksplant Sterilizasyonu

Doğadan toplanan taze örnekler sıvı sabunla bir süre yıkandıktan sonra 30 dk. bol suyla durulandı. Laboratuvarda yıkanan dokular bir damla tween 20 damlatılmış %5'luk sodyum hipoklorid ile 5 dakika steril edildi. Daha sonra steril kabin içine aktarılan eksplantlar 4 kere steril saf su ile durulandı. Sonra sterilize edilmiş filtre kağıtları üzerinde uç kısımları kesilerek klorofilli kısımları *in vitro* kültürde kullanıldı.

3.2.1.1.12 Ekim Aşaması

Yüzey sterilizasyonu yapılmış olan türlerin gametofit apikal uç eksplantları ve kapsülleri steril pens yardımıyla bek alev yakınında hazırlanmış besin ortamlarına ekimi yapıldı. Ekim yapılırken her petriye ortalama 5 gametofit apikal uç eksplantı ve kapsüllerde petri yüzeyinde 5 farklı noktaya sporların serpilmesi sağlanacak şekilde ekim işlemi yapıldı.

3.2.1.1.13 Ekimi Yapılan *In Vitro* Kültürlerde Karşılaşılan Kontaminasyon Problemi

Zonguldak bölgesinde kömür tozu partiküllerinin havadaki bakteriyel kontaminasyonlara neden olan ajanları taşıması nedeniyle kültür ortamları olumsuz yönde etkilendi. BEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Fonu tarafından finanse edilen 2012-10-06-12 numaralı projemiz aracılığıyla alınan 3 adet UFO UV filtreli O₂ Temizleyici yardımıyla mantar sporları ve mikroorganizmaların kültür ortamında oluşturduğu olumsuz kontaminasyonların asgari düzeye indirgenmesi sağlanmıştır. Bitki Doku Kültür Laboratuvarı haftalık periyotlarla ozonla temizlenerek sterilizasyonu yapılmaktadır. Bugüne kadar *in vitro* kültürü yapılan bütün örneklerde kontaminasyon yüzdesi %95'leri bulduğundan kontaminasyon sayımı yapılmamıştır.

3.2.1.1.14 İnkübasyon ve Alt Kültür İşlemi

İnkübasyon odasında ışık şiddeti 2000-3000 lüks arasında değişmektedir. Örneklerin ekildiği petriler 22-24°C'de 16/8 saat fotoperiyot uygulamasında, 2200 lüks ışık altında 4 hafta inkübe edildi. 8 farklı modifiye MS ortamına ekilen eksplantlardan elde edilen kültürler 4-5 haftalık periyotlarla steril kabinde petrilerden alınarak hazırlanan yeni ortamlarda alt kültüre alındı.

3.2.1.1.15 İstatistik Analiz

Alt kültüre alınan türlerin 3 veya 4 haftalık periyotlarla uzama miktarlarını tespit etmek amacıyla Olympus E-410, Fujitsu Finepix fotoğraf makineleri ve Leica Marka stereo mikroskop ile fotoğraf çekimleri yapıldı.

Kültürlerdeki kontaminasyon sayımları haftalık olarak yapıldı. Kontamine olan kültürlerde istenmeyen mikroorganizmalar tüm petriye yayılmadıysa, kurtarılması mümkün olan türler yeniden steril ortamlara aktarılarak canlı kalması sağlandı.

In vitro kültürlerin büyümeleri dairesel olmasından dolayı çap ölçümleri yapıldı. Bu ölçümler üzerinde ortalama değerler hesaplanarak standart hata değerleriyle grafikleri oluşturuldu.

Kültüre alınan bitkilerin büyümeleri, antioksidan aktiviteleri ve içerdiği fenolik bileşiklerin standart sapma, standart hata hesaplamalarında Microsoft Office 2013 Excel programı ve IBM SPSS 22'den yararlanıldı.

3.3 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi

3.3.1 *B. capillare*, *S. palustre* ve *T. alopecurum* Ekstraksiyon Çözeltilerinin Hazırlanması

İlk olarak *B. capillare*, *S. palustre* ve *T. alopecurum*'un doğadan toplanan taze örnekleri çeşme suyunda temizlendi. Temizlenen örnekler liyofilizatör yardımıyla kuruması sağlandı ve örnekler havanda dövülerek toz haline getirildi. Her tür için hassas terazide 1'er gr tartıldı. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi tayini her tür için 2 adet 1'er gr toz örnek kullanıldı. Deneye başlamadan önce kullanılacak cam malzemeler sıvı sabunla yıkanarak kurutuldu ve %99,9'luk MeOH'ten geçirildi. Ekstrakt işlemlerinde kullanılmak üzere 500 ml %80'lik MeOH hazırlandı. Kullanılacak 6 adet Erlenmayer etiketlendi. *B. capillare*, *S. palustre* ve *T. alopecurum* 1'er g toz örnekleri erlenmayerlere boşaltıldı. Erlenmayerlere 10 ml %80'lik MeOH eklendi ve 26 °C 180 rpm'de çalkalayıcıda 1 saat çalkalamaya bırakıldı. Bu sırada süzme işlemlerinin yapılacağı 6 adet 25 ml'lik balon joje hazırlandı ve erlenmayerlerdeki isim sırasına göre etiketlendi. Filtre kurutma kâğıtlarından 6 adet süzme kâğıdı huni şeklinde hazırlandı ve balon jøjelerin üzerine yerleştirilen cam hunilerin içine konuldu. 1 saatlik çalkalama işleminin tamamlanmasıyla ekstraksiyon çözeltisi balon jøjelere dökülerek süzme işlemi yapıldı. Süzme işleminin ardından filtre kâğıtları üzerinde süzüntüden kalan kısımlar tekrar erlenmayerlere döküldü ve üzerlerine %80'lik 15 ml MeOH eklendi ve 26 °C 180 rpm'de 24 saat çalkalanmak üzere çalkalayıcı yerleştirildi. Bu işlemin ardından erlenmayerdeki ekstraksiyon çözeltisi tekrar balon jøjelere süzme işlemleri yapıldı. %80'lik MeOH uçurmak için 6 adet şilifli balon ve adaptör kullanıldı. Şilifli balonlar %99,9'luk MeOH ile temizlenerek kurutuldu. Bu işlemden sonra şilifli balonlar etiketlenerek boş daraları

hassas terazide tartıldı. Süzme işlemi yapılan 6 adet balon joje içerisindeki %80'lik MeOH+ekstraksiyon karışımı şilifli balonlara döküldü. Uçurma işlemi için BÜCHI marka rotaevaporatör kullanıldı. 45 °C banyoda %80'lik MeOH'lü uçurma işlemi yapıldı. Uçurma işleminin ardından balonlardakalan ekstraktların kuru ağırlığını belirlemek için hassas terazide brüt ağırlıkları tartıldı. Balon dibine çökelen ekstraktı çözmek için 2 ml %99,9'luk MeOH dökülerek ultrasonic banyoda çözümleri sağlandı. Çözünen 2 ml'lik ekstraktlar, %99,9'luk MeOH ile durulanıp kurutulan ve etiketlenen flakonlarda 4 °C'de buzdolabında saklandı. Deneyde üç türün 2 ml'lik ekstraksiyon çözeltilerinden 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml olmak üzere 4 farklı dilüsyonda konsantrasyon değerlerine göre etiketlenen 24 adet flakona koyuldu. Aynı işlem antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu bilinen yapay antioksidanlar BHT (Bütildihidroksi toluen) ve BHA (Bütildihidroksianisol) doğal antioksidan olduğu bilinen Askorbik asit yine 4 farklı konsantrasyonda (1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml) olacak şekilde hazırlandı.

3.3.2 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) çözeltisinin hazırlanması: DPPH serbest radikali ışıktan etkilendiğinden dolayı 100 ml'lik erlenmayerin etrafı alümiyum folyo ile ışık almayacak şekilde sarıldı. Hassas terazide darası alınarak Sigma-Aldrich'den temin edilen DPPH 2,4 gr tartıldı. Daha önce hazırlanmış 100 ml %70'lik MeOH ile çözüldü.

BHA (Bütildihidroksi anisol) çözeltisinin hazırlanması: 1 gr BHA hassas terazide tartılarak 10 ml %99,9'luk MeOH ile erlenmayerde çözüldü. 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml çözeltileri hazırlandı.

BHT (Bütildihidroksi toluen) çözeltisinin hazırlanması: 1 gr BHT hassas terazide tartılarak 10 ml %99,9'luk MeOH ile erlenmayerde çözüldü. 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml çözeltileri hazırlandı.

Askorbik Asit çözeltisinin hazırlanması: 1 gr askorbik asit hassas terazide tartılır ve %80'luk 10 ml MeOH ile erlenmayerde çözüldü. 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml çözeltileri hazırlandı.

Ekstraksiyon çözeltilerinin hazırlanması: Şilifli balonlardan uçurulan %80'lik MeOH sonrası kalan total ekstrakt miktarları hesaplandı ve *B. capillare*, *S. palustre* ve *T. alopecurum*'a ait ekstraksiyonların 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml çözeltileri hazırlandı.

3.3.3 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesinde Kullanılacak Cihaz

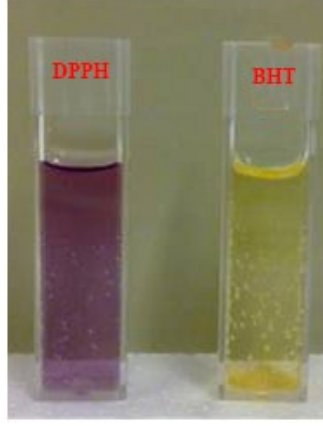
DPPH serbest radikali giderim aktivitesinin belirlenmesi işlemi için 8 küvet gözlü Tetra Marka T80+ UV/VIS Spectrometer PG Instruments Modeli kullanıldı.

3.3.4 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesinin UV-Spektrofotometre Okunması

İlk olarak UV-Spektrofotometre'de kullanılacak disposable küvetler kullanılmadan önce %99,9 MeOH ile yıkanarak kurutuldu. Çalışmada disposable küvetler ile cam küvetlerin absorbans değerleri karşılaştırılarak aralarında 30 nm absorbansı farkı olduğu gözlemlendi. Cam küvet sayısı azlığından disposable küvetler tercih edildi.

Flakonlarda bulunan 2000µg/2ml, 1000 µg/2ml, 500 µg/2ml, 250 µg/2ml hazırlanan bitki ekstraksiyon çözeltileri, BHT, BHA, askorbik asit çözeltilerinin üzerine otomatik pipetle 2 ml DPPH eklenerek 30 dk karanlık dolapta oda sıcaklığında bekletildi (Şekil 3.4).

UV-Spektrofotometre'de ilk olarak blank zero gözüne 4 ml %99,9'luk MeOH disposable küvet koyularak autozero işlemi yapıldı. DPPH radikali ile reaksiyona giren 4 farklı dilüsyondaki çözeltiler ilk göze 1000 µg/ml, 2. göze 500 µg/ml, 3. göze 250 µg/ml, 4. göze 125 µg/ml ve 5 göze kontrol olarak çözelti eklenmemiş DPPH olacak şekilde yerleştirildi. UV-Spektrofotometre yazılımı programlanarak her gözde bulunan çözelti 517 nm absorbansta 1 dakika aralıklarla 3 tekrarlı okuma işlemi yapıldı.



Şekil 3.4 BHT çözeltisinin DPPH ile reaksiyona girdikten sonra aldığı renk

3.3.5 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesinin Hesaplanması

Bryofit örneklerinin serbest radikali giderim aktivitesi tayin yöntemi DPPH radikali kullanılarak ölçülmüştür. Ekstrelerin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali giderim aktiviteleri Sanchez-Moreno metoduna göre yapılmıştır (Wang and Lee 1996). Örneklerin absorbansındaki değişimler Tetra UV spektrofotometredekor olarak kullanılan metanole 517nm’de okundu. Radikal yok etme aktivitesi DPPH serbest radikali giderim aktivitesinin yüzde inhibisyonu (%) olarak ifade edildi ve aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Yen and Duh 1994, Ellnain et al. 2003, Abdille et al. 2005).

$$\text{İnhibisyon (\%)} = \frac{\text{Ab}_{\text{control}} - \text{Ab}_{\text{örnek}}}{\text{Ab}_{\text{control}}} \times 100$$

3.4 Toplam Fenol Miktar Tayini

3.4.1 Toplam Fenol Miktar Tayini için *B. capillare*, *S. palustre* ve *T. alopecurum* Ekstraksiyon Çözeltilerinin Hazırlanması

İlk olarak *B. capillare*, *S. palustre* ve *T. alopecurum*’un doğadan toplanan taze örnekleri çeşme suyunda temizlendi. Temizlenen örnekler liyofilizatör yardımıyla kuruması sağlandı ve örnekler havanda dövülerek toz haline getirildi. Her tür için hassas terazide 1’er gr tartıldı. Deneye başlamadan önce kullanılacak cam malzemeler sıvı sabunla yıkanarak kurutuldu ve %99,9’luk MeOH’ten geçirildi. Ekstrakt işlemlerinde kullanılmak üzere 500 ml %80’lik

MeOH hazırlandı. Kullanılacak 6 adet erlenmayer etiketlendi. *B. capillare*, *S. palustre* ve *T. alopecurum* 1'er g toz örnekleri erlenmayerlere boşaltıldı. Erlenmayerlere 10 ml %80'lik MeOH eklendi ve 26°C, 180 rpm'de çalkalayıcıda 1 saat çalkalamaya bırakıldı. Bu sırada süzme işlemlerinin yapılacağı 6 adet 25 ml'lik balon joje hazırlandı ve erlenmayerlerdeki isim sırasına göre etiketlendi. Filtre kurutma kâğıtlarından 6 adet süzme kâğıdı huni şeklinde hazırlandı ve balon joculararın üzerine yerleştirilen cam hunilerin içine konuldu. 1 saatlik çalkalama işleminin tamamlanmasıyla ekstraksiyon çözeltisi balon jocularara dökülerek süzme işlemi yapıldı. Süzme işleminin ardından filtre kâğıtları üzerinde süzüntüden kalan kısımlar tekrar erlenmayerlere döküldü ve üzerlerine %80'lik 15 ml MeOH eklendi ve 26 °C 180 rpm'de 24 saat çalkalanmak üzere çalkalayıcı yerleştirildi. Bu işlemin ardından erlenmayerdeki ekstraksiyon çözeltisi tekrar balon jocularara süzme işlemleri yapıldı. %80'lik MeOH uçurmak için şilifli balon ve adaptörler kullanıldı. Şilifli balonlar %99,9'luk MeOH ile temizlenerek kurutuldu. Bu işlemden sonra şilifli balonlar etiketlenerek boş daraları hassas terazide tartıldı. Süzme işlemi yapılan 6 adet balon joje içerisindeki %80'lik MeOH+ekstraksiyon karışımı şilifli balonlara döküldü. Uçurma işlemi için BÜCHI marka rotaevaporatör kullanıldı. 45 °C banyoda %80'lik MeOH'lü uçurma işlemi yapıldı. Uçurma işleminin ardından balonlarda kalan ekstraktların kuru ağırlığını belirlemek için hassas terazide brüt ağırlıkları tartılarak hesaplandı.

3.4.2 Toplam Fenol Miktar Tayininde Kullanılacak Cihaz

Bu işlem için Tetra Marka T80+ UV/VIS Spektrofotometre Modeli kullanılmıştır.

3.4.3 Toplam Fenol Miktar Tayini Çözeltilerinin Hazırlanması

Ekstreler içerisindeki toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteu yöntemine göre yapılmıştır (Singleton and Rossi 1965). Hazırlanmış bitki ekstreleri, konsantrasyonları 2 mg/ml olacak şekilde %75'lik EtOH ile çözüldü. Daha sonra örnekten 20 µl alınıp, üzerine sırasıyla 1580 µl distile su, 100 µl Folin-Ciocalteu reaktifi ve 300 µl % 20'lik sodyum karbonat çözeltisi eklendi. Kalibrasyon eğrisini oluşturabilmek için 15.62 mg/l, 31.25 mg/l, 62.5 mg/l, 125 mg/l, 250 mg/l, 500 mg/l konsantrasyonlarda gallik asit dilüsyonları hazırlandı ve örnek yerine gallik asit dilüsyonları konularak diğer çözeltiler aynı miktarda ilave edildi. Tüm örnekler 40°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda absorbanlar 765 nm dalga boyunda kör olarak kullanılan etanole karşı spektrofotometrede okundu. Gallik asit çözeltileri

yardımla hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre, örneğin absorbanı kullanılarak toplam fenol konsantrasyonu gallik asit eşdeğeri olarak hesaplandı.

3.5 HPLC-UV Analizleri

3.5.1 HPLC-UV Analizleri İçin Farklı Tarihlerde Toplanan *B. capillare*, *S. palustre* ve *T. alopecurum*'un Herbaryum Örnekleri, Doğadan Toplanan Taze Örnekleri ve 8 Farklı MS Ortamında Yetiştirilen *in vitro* Kültürlerin Ekstraksiyon Çözeltilerinin Hazırlanması

İlk olarak üç türün doğadan toplanan taze örnekleri ve farklı tarihlerde toplanmış *B. capillare* ve *T. alopecurum*'un herbaryum örnekleri çeşme suyunda temizlendi. *In vitro* kültür örnekleri ve çeşme suyunda temizlenen örnekler liyofilizatör yardımcıyla kuruması sağlandı ve örnekler havanda dövülerek toz haline getirildi ve hassas terazide 1'er gr olarak tartıldı. Deneye başlamadan önce kullanılacak cam malzemeler sıvı sabunla yıkanarak kurutuldu ve %99,9'luk MeOH'ten geçirildi. Ekstrakt işlemlerinde kullanılmak üzere 1000 ml %80'lik MeOH hazırlandı. Kullanılacak erlenmayerler etiketlendi. Tüm 1 g'lık toz örnekler erlenmayerlere döküldü. Erlenmayerlere 10 ml %80'lik MeOH eklendi ve 26 °C 180 rpm'de çalkalayıcıda 1 saat çalkalamaya bırakıldı. Bu sırada süzme işlemlerinin yapılacağı 25 ml'lik balon jodeler hazırlanarak etiketlendi. Filtre kurutma kâğıtlarından kağıt huniler hazırlandı ve balon jodelerin üzerine yerleştirilen cam hunilerin içerisine konuldu. Çalkalama işleminin (1 saat) tamamlanmasıyla ekstraksiyon çözeltisi balon jodelere dökülerek süzme işlemi yapıldı. Süzme işleminin ardından filtre kâğıtları üzerinde süzüntüden kalan kısımlar tekrar erlenmayerlere döküldü ve üzerlerine %80'lik 15 ml MeOH eklendi ve 26 °C 180 rpm'de 24 saat çalkalanmak üzere çalkalayıcıya yerleştirildi. Bu işlemin ardından erlenmayerdeki ekstraksiyon çözeltisi tekrar balon jodelere süzme işlemleri yapıldı. %80'lik MeOH uçurmak için şilifli balon ve adaptörler kullanıldı. Şilifli balonlar %99,9'luk MeOH ile temizlenerek kurutuldu. Bu işlemden sonra şilifli balonlar etiketlenerek boş daraları hassas terazide tartıldı. Süzme işlemi yapılan balon jodeler içerisindeki %80'lik MeOH+ekstraksiyon karışımları şilifli balonlara döküldü. BÜCHI marka rotaevaporatör kullanılarak 45°C banyoda %80'lik MeOH'ün uçurma işlemi yapıldı. Uçurma işleminin ardından balonlarda kalan ekstraktların kuru ağırlığını belirlemek için hassas terazide brüt ağırlıkları tartıldı. Balon dibine çökelen ekstraktı çözmek için 2 ml %99,9'luk MeOH dökülerek ultrasonic banyoda çözülmeleri

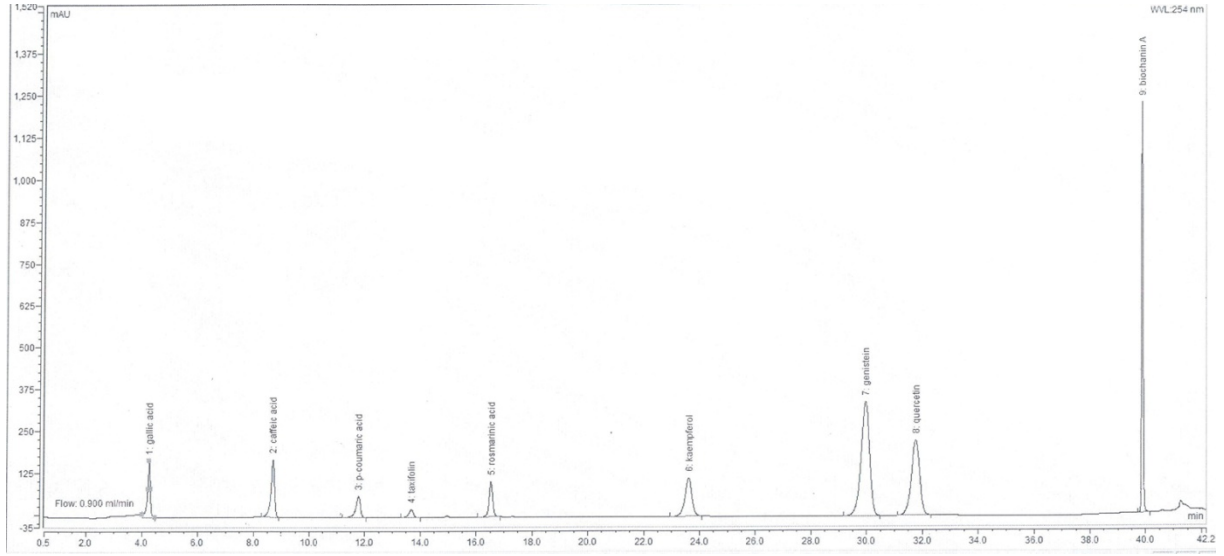
sağlandı. Çözünen 2 ml'lik ekstraktlar amber renkli viallere koyularak 4 °C'de buzdolabında saklandı.

3.5.2 HPLC-UV Analizi için Standartların Kromatogramı

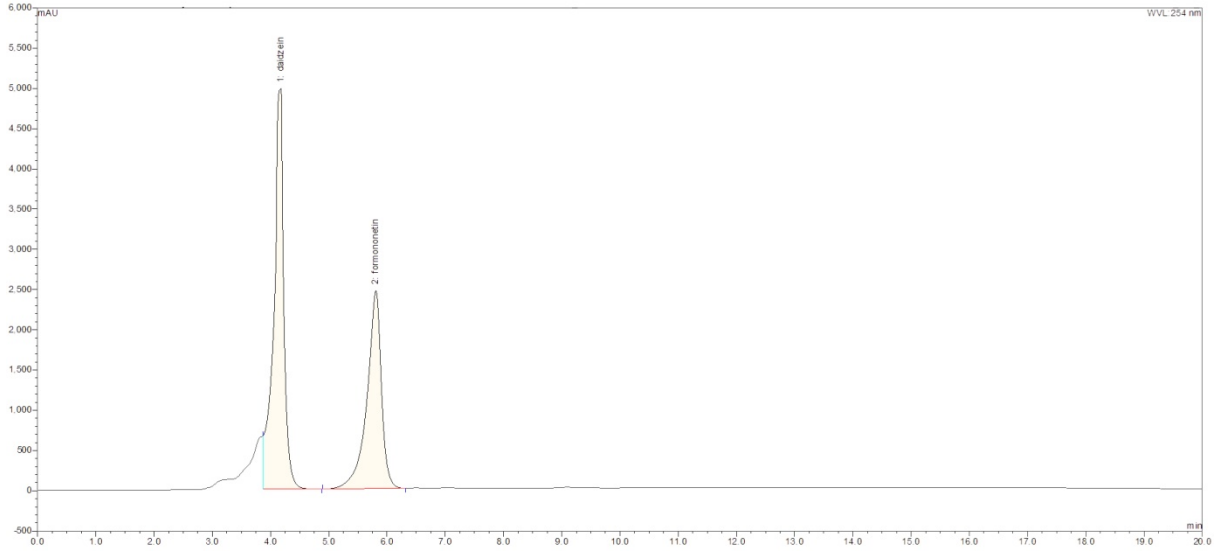
HPLC analizlerinde gerek hareketli fazın hazırlanmasında ve gerekse de fenolik bileşik standartlarının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar HPLC saflığında Sigma Aldrich'ten temin edildi. Sigma Aldrich'ten temin edilen 12 farklı standardın kalibrasyon eğrisini oluşturmak için HPLC saflığında %100'lük MeOH kullanılarak 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 20 ppm, 10 ppm, 5 ppm ve 2,5 ppm olarak hazırlandı ve kromatogramları çizildi (Şekil 3.5, 3.6, 3.7). Ayrıca tüm standartlar için lineer cevapları ($R^2 > 0,97-0,99$ aralığında) elde edildi. Kullanılan 12 farklı fenolik bileşik standartlarının analizlerdeki alıkonma zamanları aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 12 farklı standart fenolik bileşiğin alıkonma zamanları

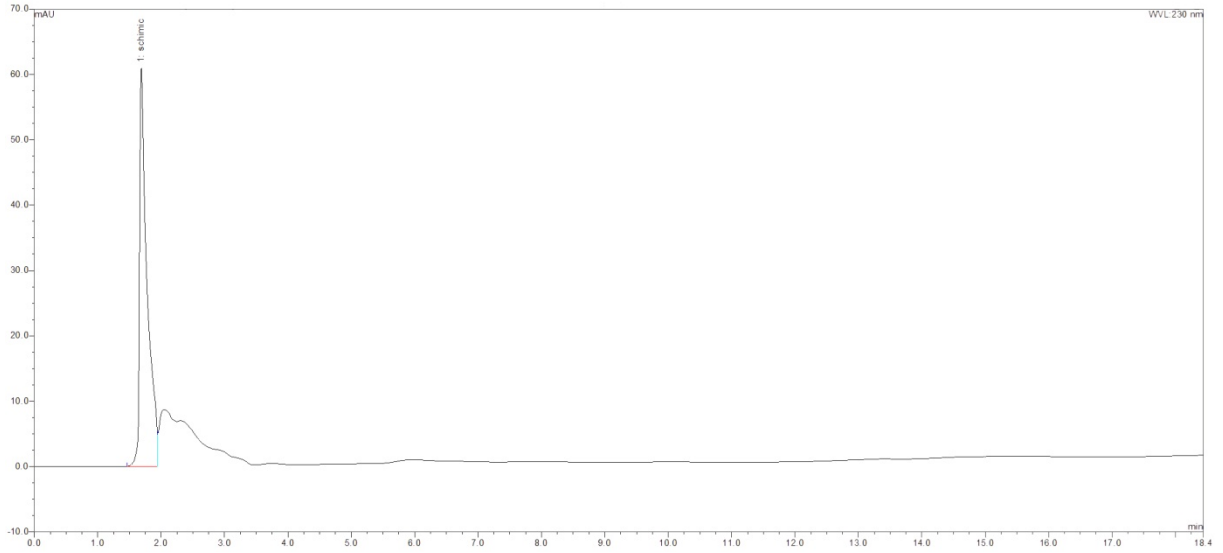
Standart Bileşik	Alıkonma Zamanı
Şikimik Asit	1,21
Gallik Asit	2,54
Daidzein	4,16
Formononetin	5,49
Kafeik Asit	8,23
<i>p</i> -kumarik asit	11,95
Taksifolin	13,63
Rosmarinik Asit	16,43
Kaempferol	23,73
Genistein	30,15
Kuersetin	31,37
Biokanin A	39,90



Şekil 3.5 Standartların HPLC-UV kromatogramları (100ppm) (254 nm): (1) gallik asit, (2) kafeik asit, (3) p-kumarik asit, (4) taksifolin, (5) rosmarinik asit, (6) kaemferol, (7) genistein, (8) kuersetin, (9) biokanin A.



Şekil 3.6 Standartların HPLC-UV kromatogramları (250ppm) (254 nm): (1) daidzein (2) formononetin



Şekil 3.7 Standartların HPLC-UV kromatogramları (100 ppm) (230 nm): (1) Şikimik Asit

3.5.3 HPLC Analizlerinde Kullanılan Cihaz ve Kolon Bilgileri

HPLC cihazı Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 variable Waveleght Detector, WPS-3000SL Analytical Autosampler marka ve modelidir. Analizlerde kullanılan kolon Thermo Scientific Acclaim TM 120 C18 3µl 120 Å 4,6x150 mm'dir.

3.5.4 HPLC-UV Analizi Gradyent Elüsyon Programları

HPLC-UV analizlerinde 3 farklı gradyent elüsyon programı uygulanmıştır. 9 standart (gallik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, taksifolin, rosmarinik aist, kaempferol, genistein, kuersetin ve biokanin A) karışımı hazırlanarak Çizelge 3.7'de belirtilen gradyent elüsyon programında 0,9 ml/dk akış hızında 20 µl enjekte edilerek maksimum absorbands 254 nm'de kromatogramları çizilmiştir. Daidzein ve formononetin standartları için Çizelge 3.8'de belirtilen gradyent elüsyon programında 0,5 ml/dk akış hızında 20 µl enjekte edilerek maksimum absorbands 254 nm'de kromatogramları çizilmiştir. Şikimik Asit standardı için Çizelge 3.9'da belirtilen gradyent elüsyon programında 0,9 ml/dkakış hızında 20 µl enjekte edilerek maksimum absorbands 230 nm'de kromatogramları çizilmiştir.

Çizelge 3.7 Farklı 9 standardın (gallik asit, kefeik asit, *p*-kumarik asit, taksifolin, rosmarinik asit, kaempferol, genistein, kuersetin ve biokanin A) HPLC-UV gradiyent elüsyon programı

Akış Hızı ml/dk	Zaman (dk)	%A (Asetonitril)	%B (Ultra Saf Su) + %1 Formik Asit (V/V)
0,9	0	95	5
0,9	3	85	15
0,9	13	75	25
0,9	25	70	30
0,9	35	65	35
0,9	39	60	40
0,9	42	55	45
0,9	44	50	50
0,9	47	45	55
0,9	50	30	70
0,9	56	25	75
0,9	60	20	80
0,9	70	10	90

Çizelge 3.8 Daidzein + Formononetin standartlarının HPLC-UV gradiyent elüsyon programı

Akış Hızı ml/dk	Zaman (dk)	%A (Metanol)	%B (Ultra Saf Su)
0,5	0	20	5
0,5	0	20	15
0,5	20	20	25

Çizelge 3.9 Şikimik asit standardının HPLC-UV gradiyent elüsyon programı

Akış Hızı ml/dk	Zaman (dk)	%A (Asetonitril)	%B (Ultra Saf Su)
0,9	0	95	5
0,9	0	95	5
0,9	3	85	15
0,9	13	75	25
0,9	25	70	30

BÖLÜM 4

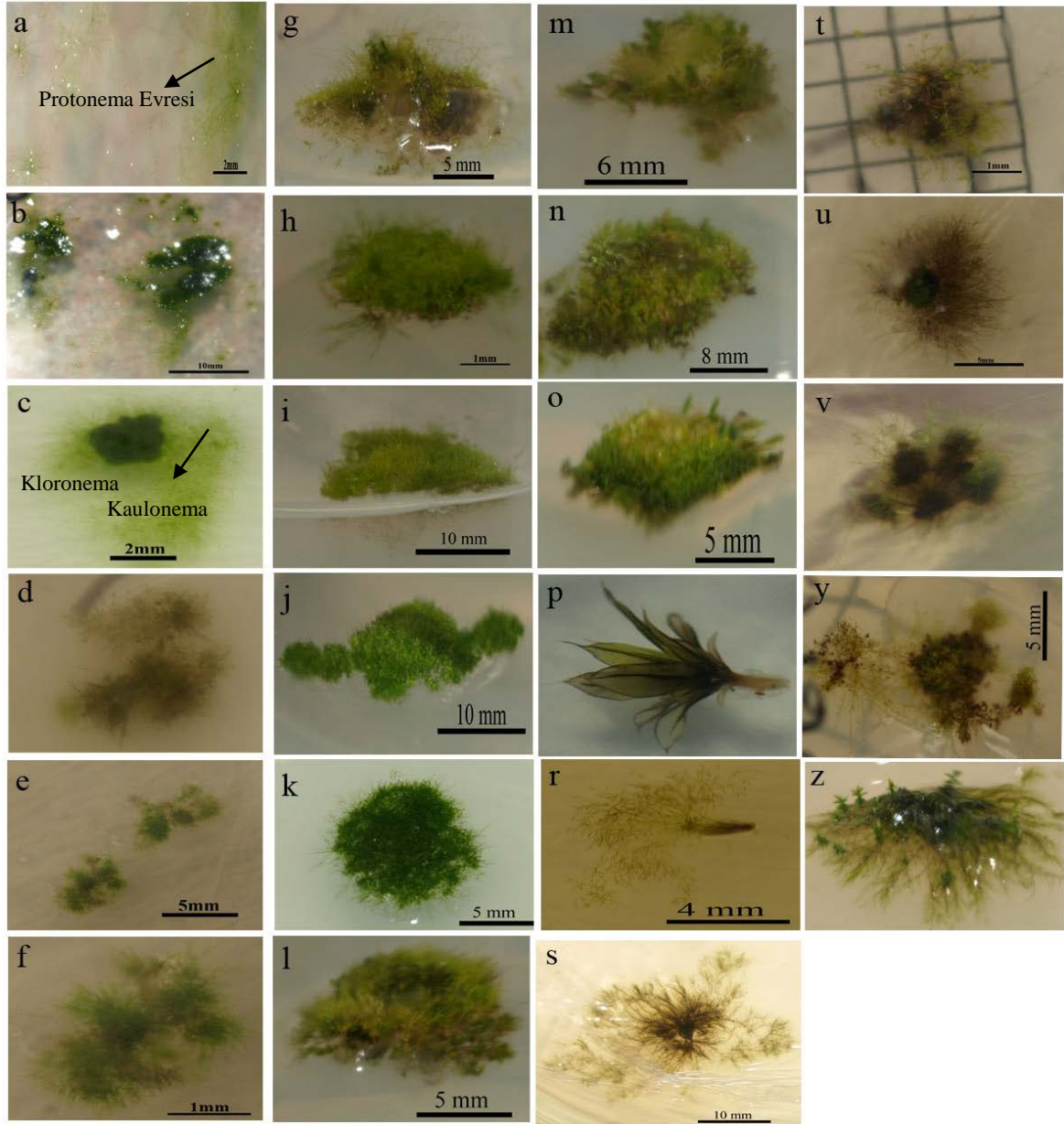
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *Bryum capillare*, *Sphagnum palustre* ve *Thamnobryum alopecurum*'un *In Vitro* Kültürlerinin 8 Farklı MS Ortamında Büyüme Miktarlarının İstatistiksel İncelenmesi

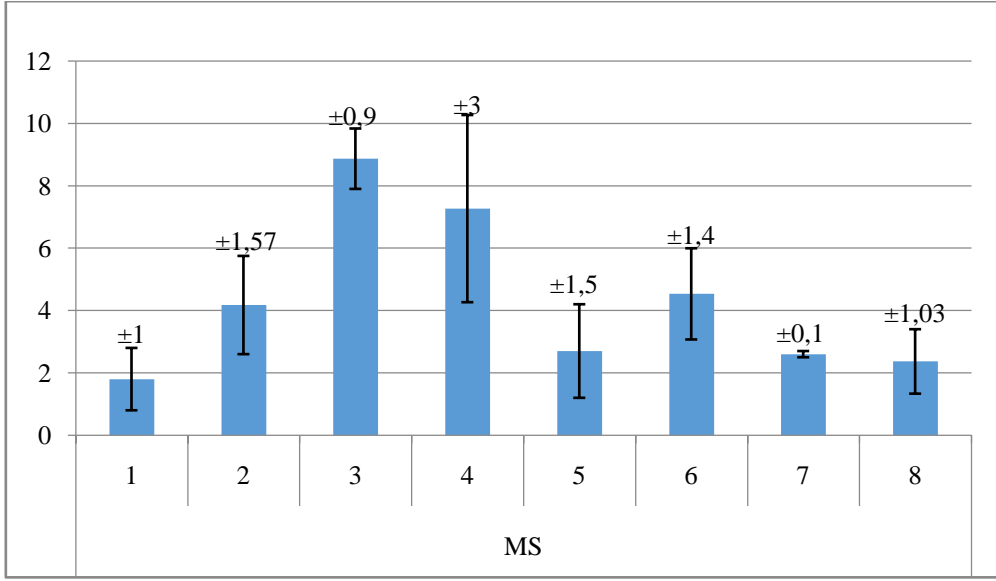
Çalışmanın ilk aylarında *in vitro* kültürü yapılan türler arasında *B. capillare*'nin spor ve gametofit apikal uç kültürlerinde başarılı büyüme gözlenirken, *S. palustre* ve *T. alopecurum* türlerinde yaşanan kontaminasyondan dolayı başarılı bir rejenerasyon sağlanamadı. Sonraki aylarda MS ortamlarında yapılan yeni modifikasyonlarla oluşturulan 8 farklı modifiye MS ortamında *S. palustre* ve *T. alopecurum* türlerinde de başarılı şekilde rejenerasyon sağlandı.

4.1.1 *B. capillare*'nin *in vitro* Spor ve Gametofit Kültür Sonuçları

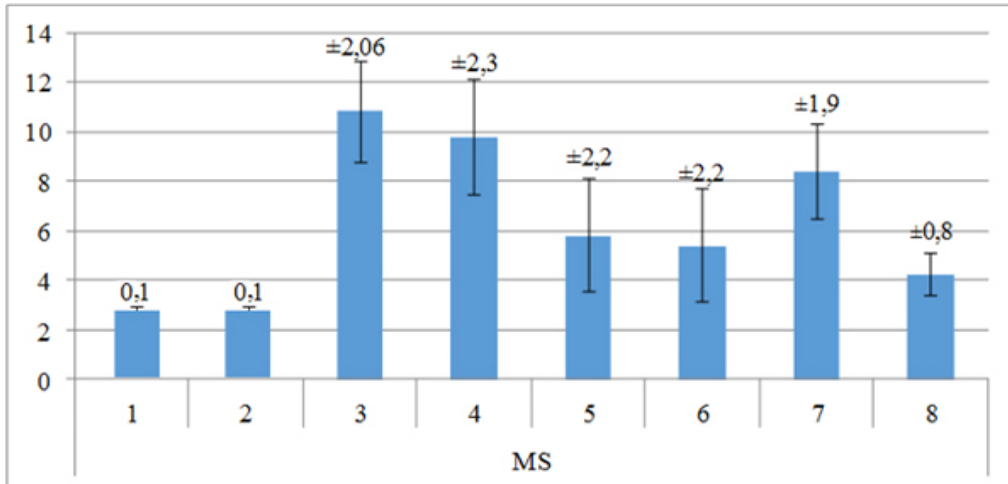
B. capillare olgun kapsüllerin yüzey sterilizasyonu sonrası spor kültürlerinde %100'e yakın başarı sağlandı. Gametofitlerin apikal uçlarının yüzey sterilizasyonu sonrası *in vitro* kültürlerinde %90-95 civarında mantar, alg ve bakteri kontaminasyonu ile karşılaşıldı. Kontaminasyon başlayan petrilerde, temiz dokular kurtararak yeniden aynı MS ortamı petrilere aktarıldı. *B. capillare* spor ve gametofit apikal uç kültürleri her 4-5 haftalık periyotlarla alt kültüre alınarak 6 aylık süreyle büyüme verileri elde edildi (Şekil 4.1, 4.2, 4.3). Ekimleri yapılan örneklerin kültür başlangıcından 10-14 gün sonrasında protonemal evrenin başlangıcıyla kloronema ve kaulonema oluşumları, 1-2 ay sonrasında yeni protonemalar gelişme gösterdi ve daha ileri ki aylarda gametofit oluşumları gözlenmiştir. Büyüme sırasında kültürlerin 4-5 haftalık çap ölçümleri yapılmıştır. *B. capillare*'nin spor ve gametofit kültürlerinde en iyi büyümenin MS₃ ortamı olduğu belirlendi. Ayrıca en iyi gelişim görülen bu ortamdaki aylık ortalama çap büyüme miktarları aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4).



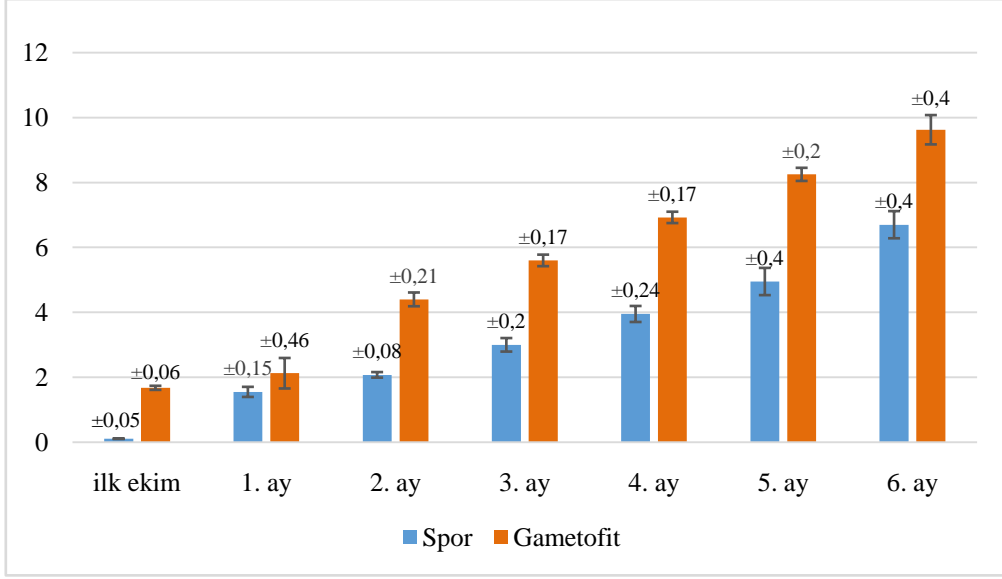
Şekil 4.1 *B. capillare* *in vitro* spor kültürü gelişiminin gösterilmesi a, b) 1-2 haftalık; c, d) 3-4 haftalık; e, f) 6-8 haftalık; g, h,) 10-12 haftalık; j, k) 14-16 haftalık; l) 18 haftalık; m, n, o) 20-24 haftalık spor kültürleri; ve *in vitro* gametofit kültürünün gelişiminin gösterilmesi p) ilk ekim; r, s) 2-4 haftalık; t) 8 haftalık; u, v) 12-16 haftalık; y) 20 haftalık; z) 24 haftalık gametofit kültürleri



Şekil 4.2 *B. capillare* sporlarının farklı MS ortamlarındaki *in vitro* kültürlerinin 6 aylık ortalama çap büyüme miktarlarının (mm) karşılaştırılması



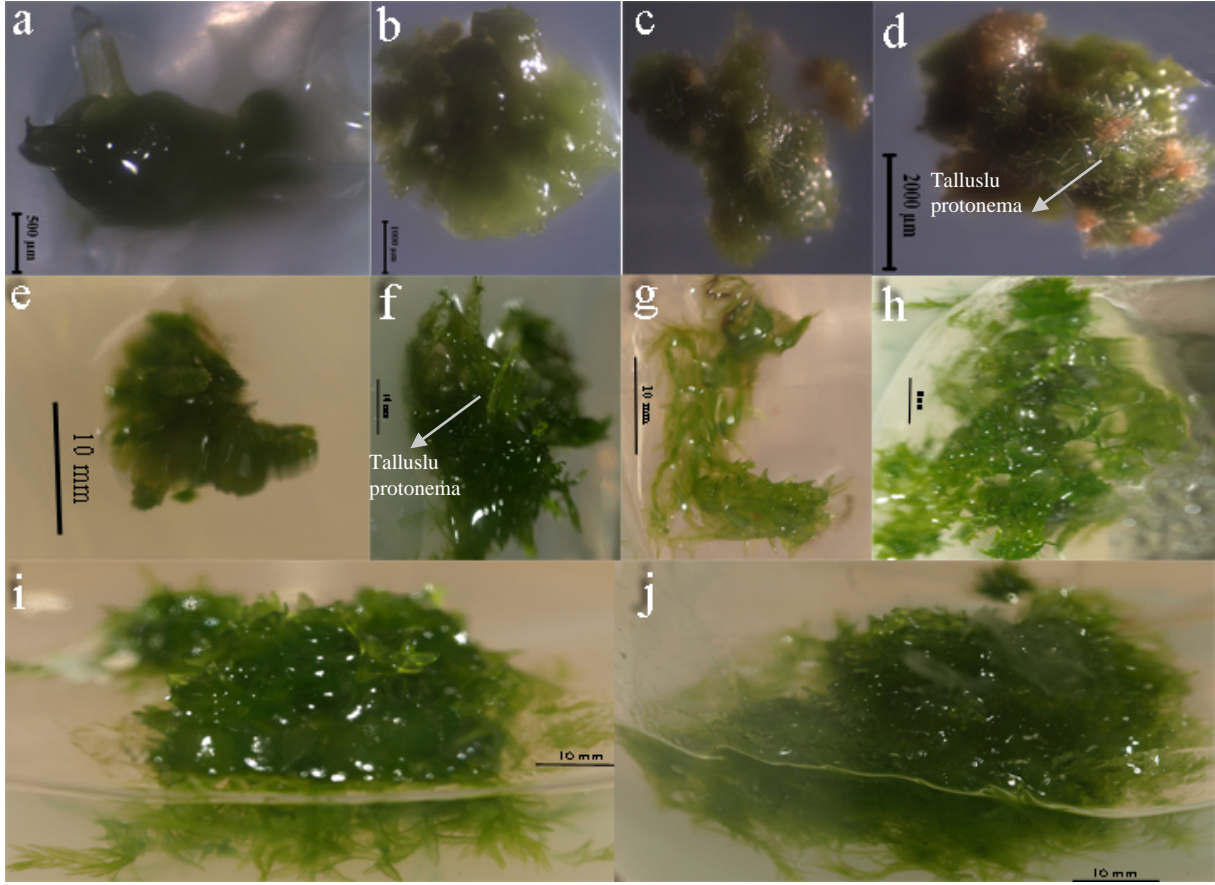
Şekil 4.3 *B. capillare* gametofit apikal uç *in vitro* kültürlerinin farklı MS ortamlarındaki 6 aylık ortalama çap büyüme miktarlarının (mm) karşılaştırılması



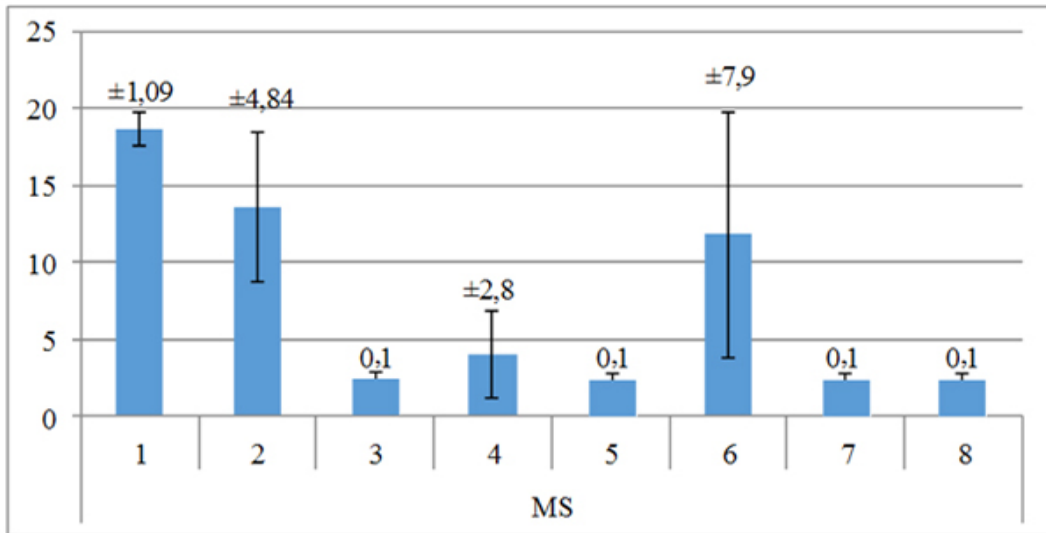
Şekil 4.4 *B. capillare* spor ve gametofit apikal uç *in vitro* kültürlerinin MS₃ ortamındaki aylık ortalama çap büyüme miktarlarının (mm) karşılaştırılması

4.1.2 *S. palustre*'nin *in vitro* Gametofit Kültür Sonuçları

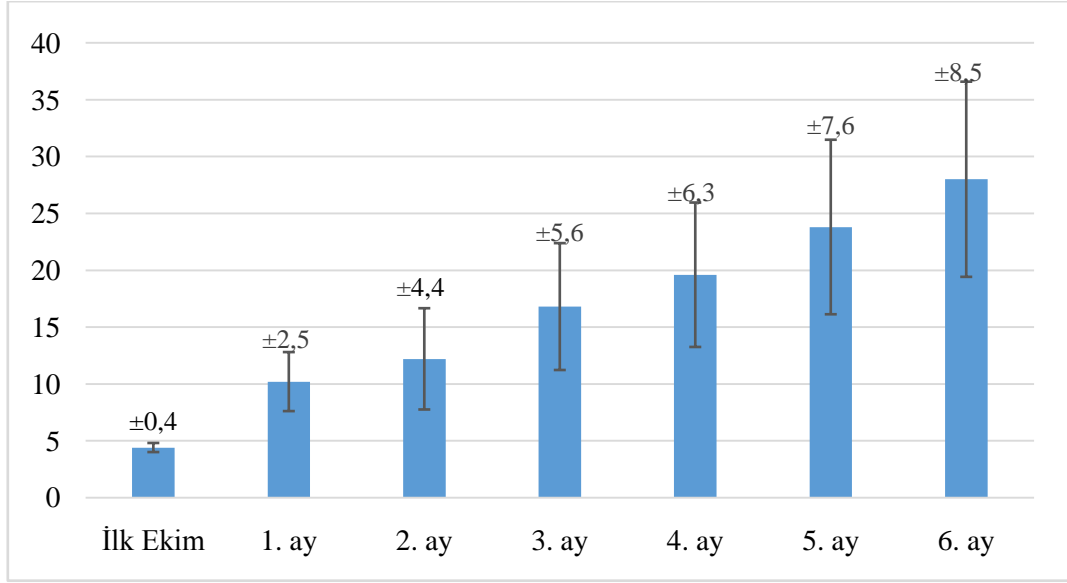
S. palustre türünde sporofit evreyi yakalamak oldukça güç olduğundan, *in vitro* kültürleri bitkinin sadece gametofitin apikal uç kısımlarından yapılmıştır. Bu denemelerde modifiye ettiğimiz MS ortamında bitkinin meristematik hücrelerinin aktif ve bol olduğu klorofilli kapitulumlarının ekimi yapılmıştır. Eksplantların yüzey sterilizasyonlarında %100'e yakın başarı sağlanmıştır. *S. palustre*'nin gelişim evresinde tallus protonema gametoforların oluşumu 2-4 haftalık süreçte görülmeye başlanmıştır. İlerleyen aylarda bitkinin gelişimi sırasında tallus protonema gametoforları sıklıkla gözlemlendi. Büyüme sırasında kültürlerin 4-5 haftalık çap ölçümleri yapılmıştır. *S. palustre*'nin gametofit kültürlerinde en iyi büyüme MS₁ ortamında görülmüştür (Şekil 4.5, 4.6). Ayrıca en iyi gelişim görülen bu ortamdaki aylık ortalama çap büyüme miktarları da aşağıda verilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.5 *S. palustre* *in vitro* gametofit kültürünün gelişiminin gösterilmesi a) ilk ekim; b, c, d) 2-4 haftalık; e, f) 6-8 haftalık; g, h) 12-16 haftalık; i) 20 haftalık; j) 24 haftalık gametofit kültürleri



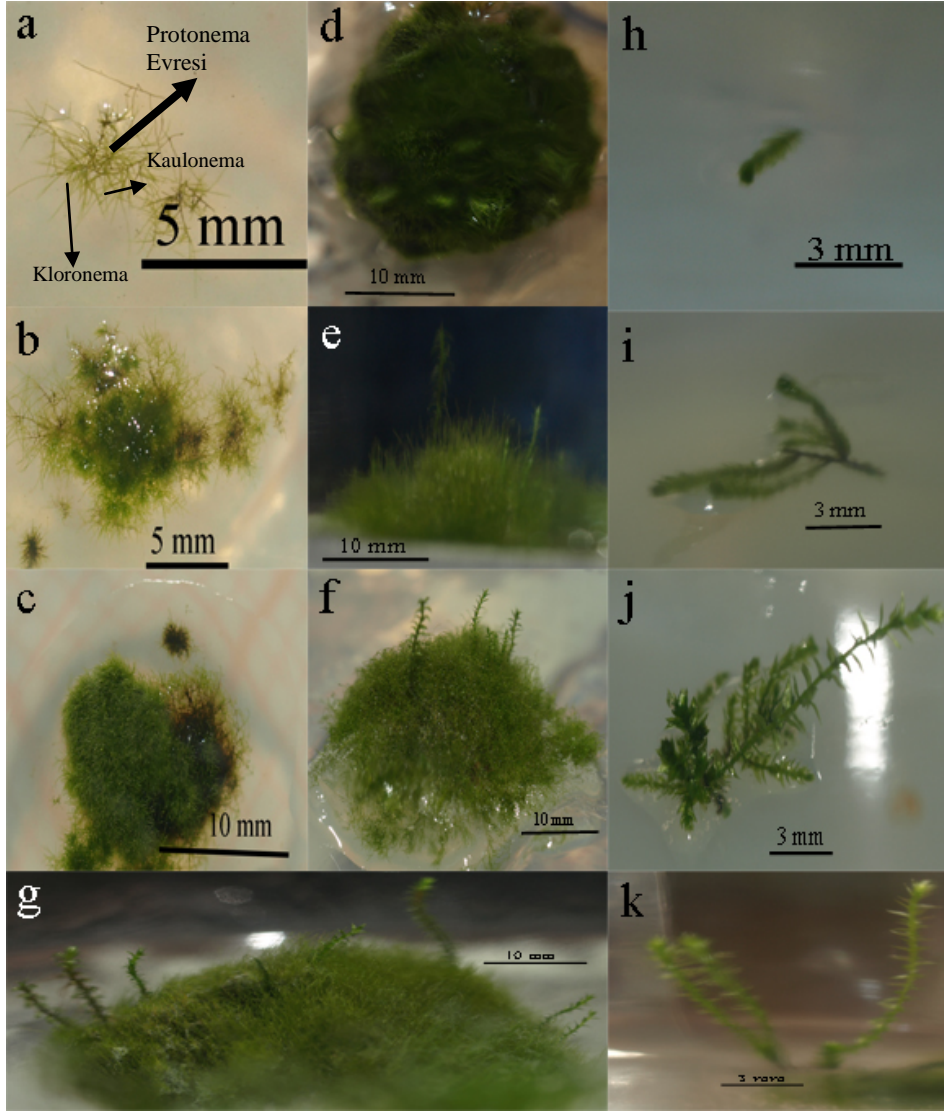
Şekil 4.6 *S. palustre* gametofit kapitulum *in vitro* kültürlerinin farklı MS ortamlarındaki 6 aylık ortalama çap büyüme miktarlarının (mm) karşılaştırılması



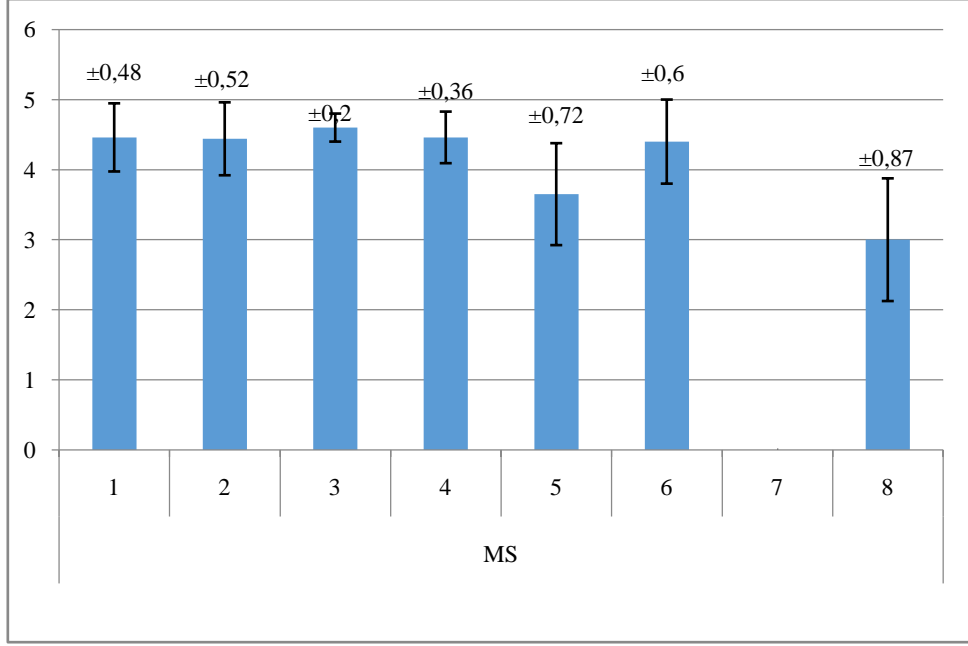
Şekil 4.7 *S. palustre* gametofit apikal uç *in vitro* kültürlerinin MS₁ ortamındaki aylık ortalama çap büyüme miktarları (mm)

4.1.3 *T. alopecurum*'un *in vitro* Spor ve Gametofit Kültür Sonuçları

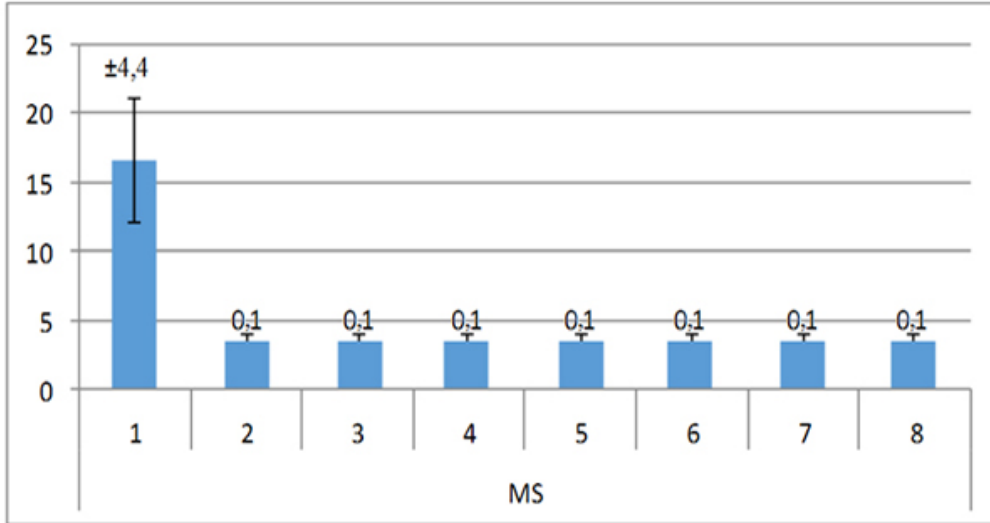
T. alopecurum olgun kapsüllerin yüzey sterilizasyonu sonrası spor kültürlerinde %100'e yakın başarı sağlandı. Gametofitlerinden hafif sert dokuya sahip apikal uçların filizlenmeye başlayan kısımlarının yüzey sterilizasyonu sonrası *in vitro* kültürlerinde %90-95 civarında mantar, alg ve bakteri kontaminasyonu ile karşılaşıldı. Kontaminasyon başlayan petrilere, temiz dokular kurtarılarak yeniden aynı MS ortamı petrilere aktarıldı. *T. alopecurum*'un spor ve gametofit apikal uç kültürleri her 4-5 haftalık dönemlerde alt kültüre alınarak 6 aylık süreyle büyüme verileri kaydedildi. Ekimleri yapılan spor kültürlerinin başlangıcından 2-4 haftalık süre içerisinde protonemal fazın başlangıcıyla kloronema ve kaulonema oluşumları gözlemlendi. Gametofit kültürlerinde ise 8-10 haftalık süre içerisinde direkt olarak sert doku eksplantlarından filizlenerek yan sürgünler gelişmeye başladı (Şekil 4.8, 4.9, 4.10, 4.11) Büyüme sırasında kültürlerin 4-5 haftalık çap ölçümleri yapılmıştır. *T. alopecurum*'un spor kültürlerinde en iyi büyüme MS₃ iken ve gametofit kültürlerinde ise en iyi büyüme MS₁ ortamında görülmüştür. Ayrıca en iyi gelişim görülen ortamlardaki aylık ortalama çap büyüme miktarları da aşağıda verilmiştir (Şekil 4.11).



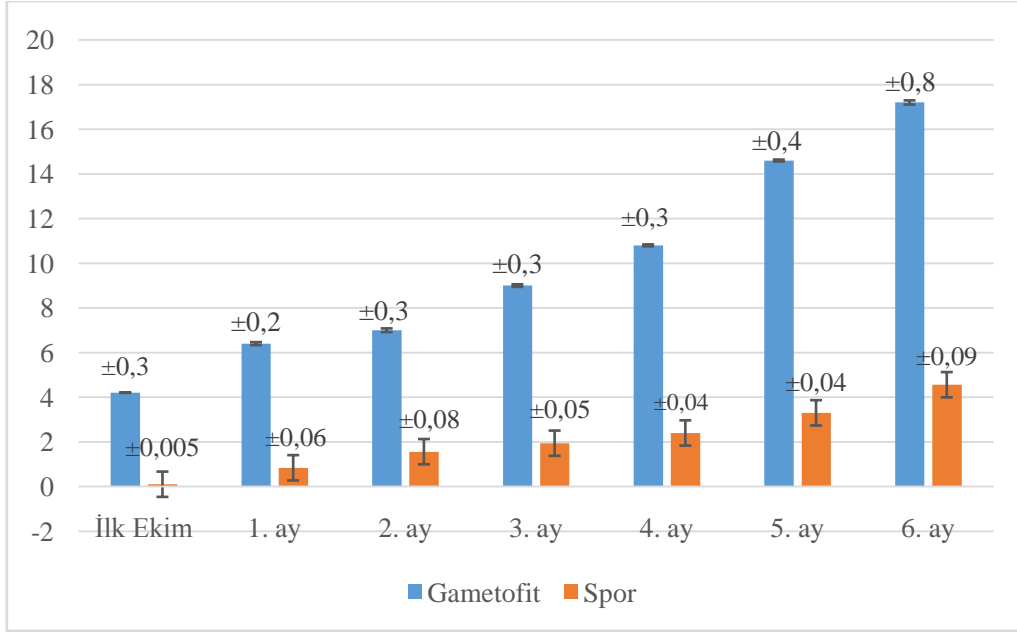
Şekil 4.8 *T. alopecurum* *in vitro* spor kültürü gelişiminin gösterilmesi a, b) 2-4 haftalık; c, d) 8-10 haftalık; e, f) 14-16 haftalık; g) 22 haftalık; ve *in vitro* gametofit kültürünün gelişiminin gösterilmesi h) ilk ekim; i,j) 8-10 haftalık; k) 20 haftalık gametofit kültürleri



Şekil 4.9 *T. alopecurum* sporlarından ekimi yapılan kültürlerin farklı ortamlar üzerindeki 6 aylık ortalama büyüme miktarlarının (mm) karşılaştırılması



Şekil 4.10 *T. alopecurum* gametofit apikal uç eksplantının MS₁ ortamındaki *in vitro* kültürünün 6 aylık ortalama çap büyüme miktarı



Şekil 4.11 *T. alopecurum*'un MS₃ ortamındaki spor ve MS₁ ortamındaki gametofit apikal uç eksplantlarının *in vitro* kültürlerinin aylık ortalama çap büyüme miktarlarının (mm) karşılaştırılması

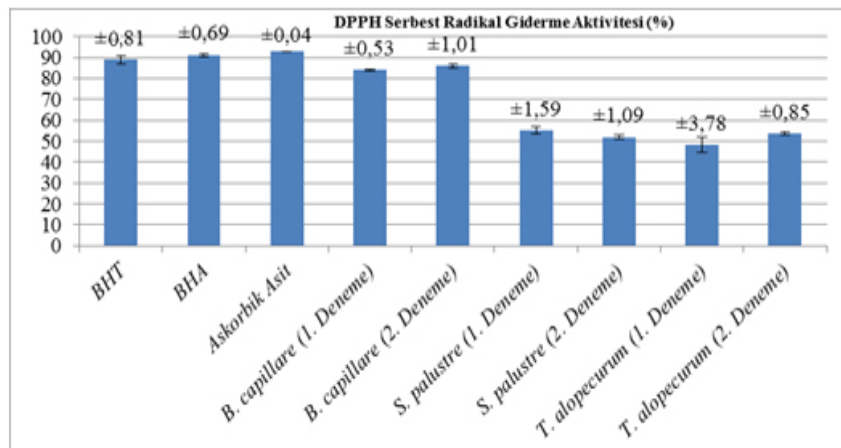
4.2 *Bryum capillare*, *Sphagnum palustre* ve *Thamnobryum alopecurum*'un Doğadan Toplanan Taze Örneklerinin DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi ve Total Fenol Tayini

4.2.1 DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi

Antioksidan maddeler ortamdaki serbest radikalleri giderebildiği ölçüde kuvvetlidir. DPPH metoduna göre yapılan radikal giderme deneylerinde 517 nm de ölçülen absorbanlara bağlı olarak DPPH serbest radikal giderme aktivitesi'nin %inhibisyon değerleri Çizelge 4.1'de ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Yüksek antioksidan aktiviteleri olduğu bilinen BHT, BHA, askorbik asidin ve bryofit türleri ekstraksiyon DPPH serbest radikal giderme aktivitesi yüzdeleri (%)

Çözelti	DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (%)
BHT	88,92±0,81
BHA	91,25±0,69
Askorbik Asit	92,81±0,04
<i>B. capillare</i> (1. Deneme)	83,98±0,53
<i>B. capillare</i> (2. Deneme)	86,09±1,01
<i>S. palustre</i> (1. Deneme)	55,22±1,59
<i>S. palustre</i> (2. Deneme)	51,94±1,09
<i>T. alopecurum</i> (1. Deneme)	48,24±3,78
<i>T. alopecurum</i> (2. Deneme)	53,79±0,85

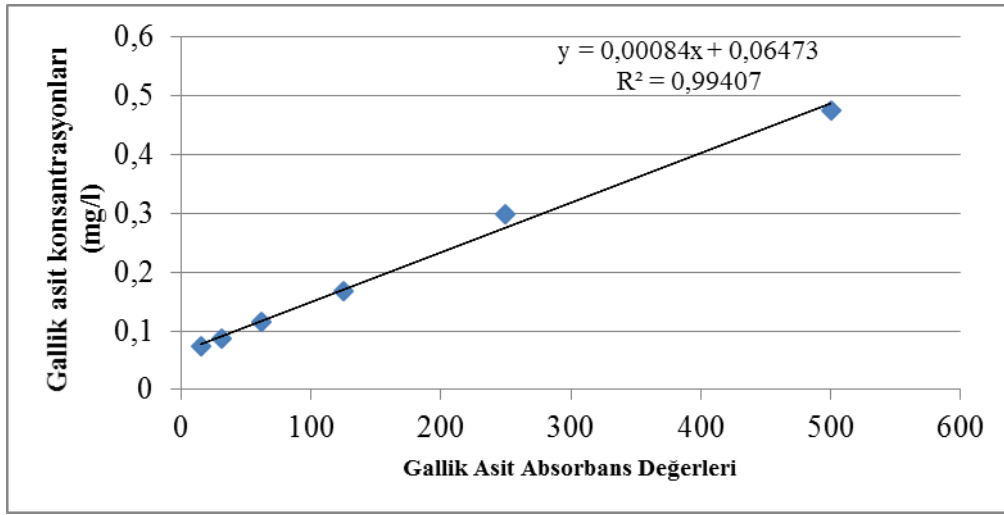


Şekil 4.12 BHT, BHA, askorbik asidin ve bryofit ekstraksiyonlarının antioksidan aktivitesinin DPPH serbest radikal giderme aktivitesi yüzdelerinin karşılaştırılması

B. capillare'nin DPPH yöntemiyle elde edilen sonuçlarına bakıldığında, doğal antioksidan askorbik asit ve sentetik antioksidan olduğu bilinen BHT, BHA ile karşılaştırıldığında yüksek serbest radikalleri giderme aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. *T. alopecurum* ve *S. palustre*'de ise bu DPPH serbest radikal giderme aktivitesinin az olduğu görülmektedir.

4.2.2 Folin-Ciocalteu Yöntemine Göre Toplam Fenol Sonuçları

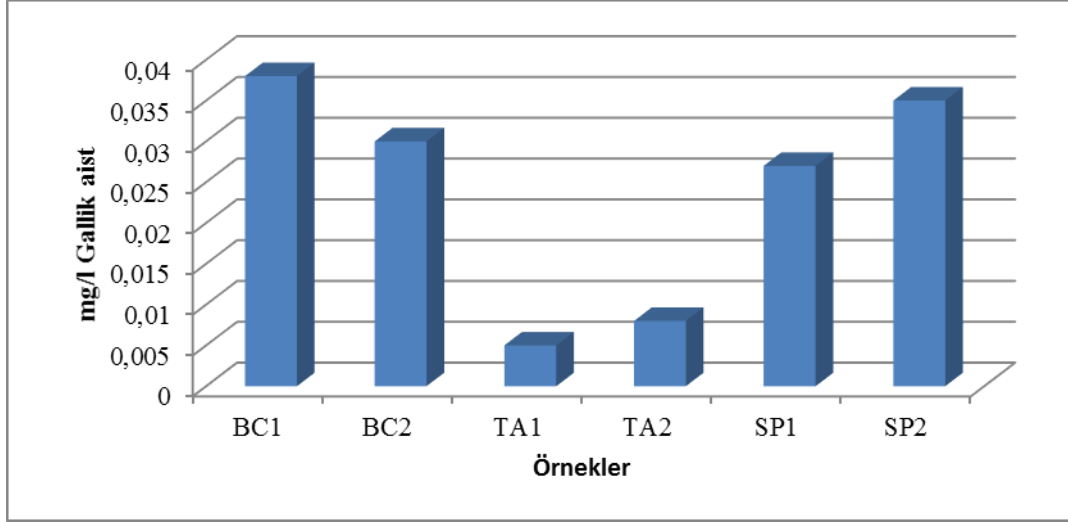
Folin-Ciocalteu yöntemine göre yaptığımız toplam fenolik madde konsantrasyonları, gallik aside eşdeğer bazda gallik asidin kalibrasyon grafiğinden hesaplanmıştır (Şekil 4.13). Elde edilen bulgular Çizelge 4.2'de ve Şekil 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13 Toplam fenolik madde tayini için gallik asit standardı kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği

Çizelge 4.2 Bitki ekstralarının ortalama total fenol miktarları

Örnek	mg/l (gallik asit eşdeğeri)
<i>B. capillare</i>	0,034±0,004
<i>S. palustre</i>	0,032±0,004
<i>T. alopecurum</i>	0,0065±0,0015



Şekil 4.14 Bitki ekstralarının ortalama total fenol miktarları grafiği

Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar (Tunalier vd. 2002). Bu nedenle bir maddenin antioksidan etki yönünden gücü içerdiği fenolik madde miktarına bağlıdır. Bu amaçla Folin-Ciocaltaeu yöntemiyle yapılan deneyde toplam fenolik madde içeriği mg/l gallik asit cinsinden hesaplanmıştır. Bu değerlere göre *B. capillare* ve *S. Palustre*'nin, *T. alopecurum*'a göre daha fazla fenolik madde içerdiği belirlenmiştir.

4.2.3 Fenolik Bileşiklerin Kantitatif olarak HPLC-UV ile Belirlenmesi

B. capillare ve *S. Palustre*'nin *T. alopecurum*'da doğadan toplanan, farklı aylara ait herbaryum numunelerinden, *in vitro* doku kültürüyle üretilen örneklerinden 12 standarda ait (gallik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, taksifolin, rosmarinik asit, kaempferol, genistein, kuersetin, biokanin A, daidzein, formononetin, şikimik asit) lineer cevaplar ($r^2 > 0,97-0,99$ aralığında) doğrultusunda kantitatif madde miktarı belirlendi. Çalışılan tüm örneklerin şikimik asit miktarı genellikle yüksek miktarda olduğu tespit edildi. Diğer fenolik bileşiklerin üç türde bulunan miktarları farklılık göstermektedir. Çizelge 4.3, 4.4 ve 4.5'te bu üç türe ait 12 farklı fenolik bileşik miktarları verilmiştir.

***B. capillare*'nin doğadan toplanan taze örnekleri ve herbaryum örnekleri kullanılan standart fenolik bileşikler yönünden karşılaştırıldığında;**

en yüksek **gallik asit** miktarı ($1,20784 \pm 0,452$ mg/g) herbaryumdan alınan **9. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **kafeik asit** miktarı ($0,04879 \pm 0,041$ mg/g) herbaryumdan alınan **3. ay**

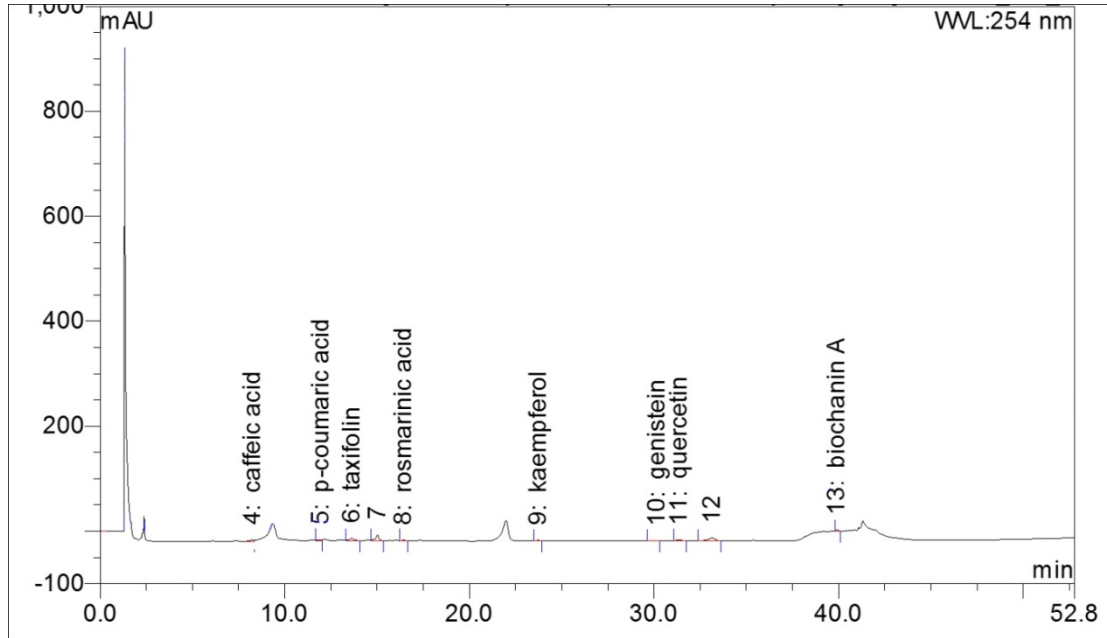
örneğinde bulunduğu; en yüksek **p-kumarik** asit miktarı (0,29558±0,1748 mg/g) herbaryumdan alınan **3. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **taksifolin** miktarı (0,10763±0,09941 mg/g) herbaryumdan alınan **6. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **rosmarinikasit** miktarı (0,32837±0,137 mg/g) herbaryumdan alınan **9. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **kaempferol** miktarı (0,0444±0,0842 mg/g) herbaryumdan alınan **9. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **genistein** miktarı (0,035±0,011 mg/g) herbaryumdan alınan **3. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **kuersetin** miktarı (0,0507±0,0372 mg/g) herbaryumdan alınan **4. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **biokanin A** miktarı (0,05705±0,0241 mg/g) herbaryumdan alınan **9. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **daidzein** miktarı (0,3242±0,2426 mg/g) herbaryumdan alınan **5. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **formononetin** miktarı (0,008±0,007 mg/g) herbaryumdan alınan **3. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **şikimik asit** miktarı (0,17925±0,024 mg/g) herbaryumdan alınan **3. ay** örneğinde bulunduğu belirlendi. *B. capillare*'nin doğadan toplanan taze örnekleri ve herbaryum örneklerinin HPLC-UV kromotogramları ve miktarları aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.3) (Şekil 4.15, 4.16, 4.17, 4.20, 4.21, 4.22, 4.25, 4.26, 4.27).

***B. capillare*'nin in vitro spor kültürleri kullanılan standart fenolik bileşikler yönünden karşılaştırıldığında;**

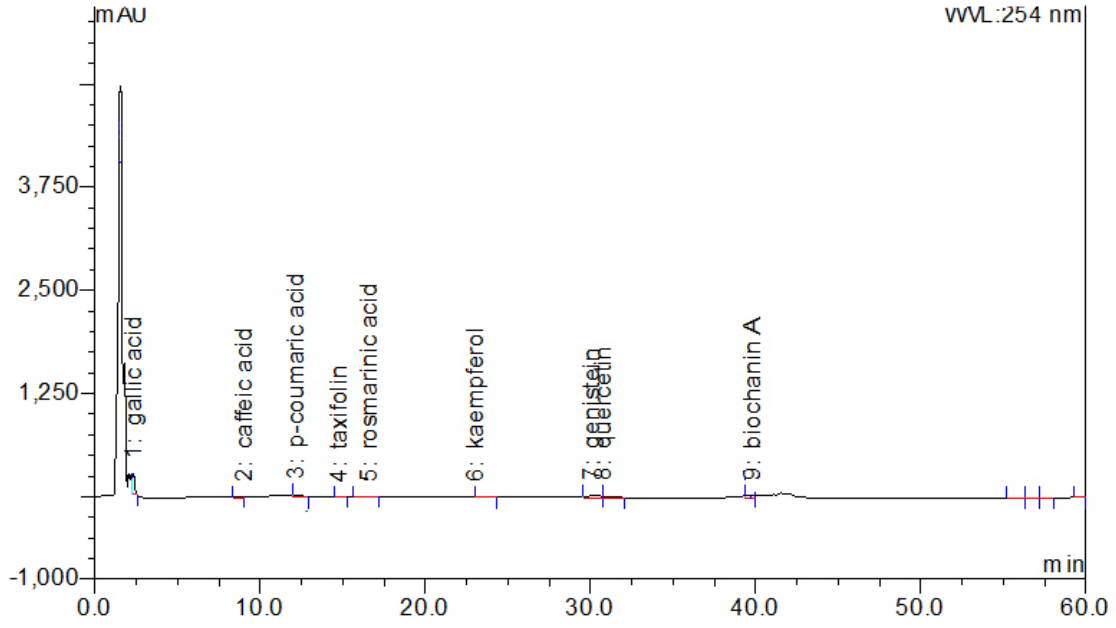
en yüksek **gallik asit** miktarı (0,06765±0,0094 mg/g) MS₁ örneğinde bulunduğu; en yüksek **kafeik asit** miktarı (0,43077±0,0221 mg/g) MS₁ örneğinde bulunduğu; en yüksek **p-kumarik** asit miktarı (0,06775±0,041 mg/g) MS₁ örneğinde bulunduğu; en yüksek **taksifolin** miktarı (0,03758±0,0231 mg/g) MS₇ örneğinde bulunduğu; en yüksek **rosmarinikasit** miktarı (0,01363±0,00248 mg/g) MS₅ örneğinde bulunduğu; en yüksek **kaempferol** miktarı (0,02355±0,00246 mg/g) MS₇ örneğinde bulunduğu; en yüksek **genistein** miktarı (0,0251±0,019 mg/g) MS₇ örneğinde bulunduğu; en yüksek **kuersetin** miktarı (0,01369±0,0054 mg/g) MS₇ örneğinde bulunduğu; en yüksek **biokanin A** miktarı (0,208±0,120 mg/g) MS₄ örneğinde bulunduğu; en yüksek **daidzein** miktarı (0,06464±0,054 mg/g) MS₄ örneğinde bulunduğu; en yüksek **formononetin** miktarı (0,0587±0,05 mg/g) MS₄ örneğinde bulunduğu; en yüksek **şikimik asit** miktarı (261,653±21,84 mg/g) MS₄ örneğinde bulunduğu tespit edildi. *B. capillare*'nin in vitro spor kültürleri HPLC-UV kromotogramları ve miktarları aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.3) (Şekil 4.18, 4.23, 4.28).

***B. capillare*'nin in vitro gametofit kültürleri kullanılan standart fenolik bileşikler yönünden karşılaştırıldığında;**

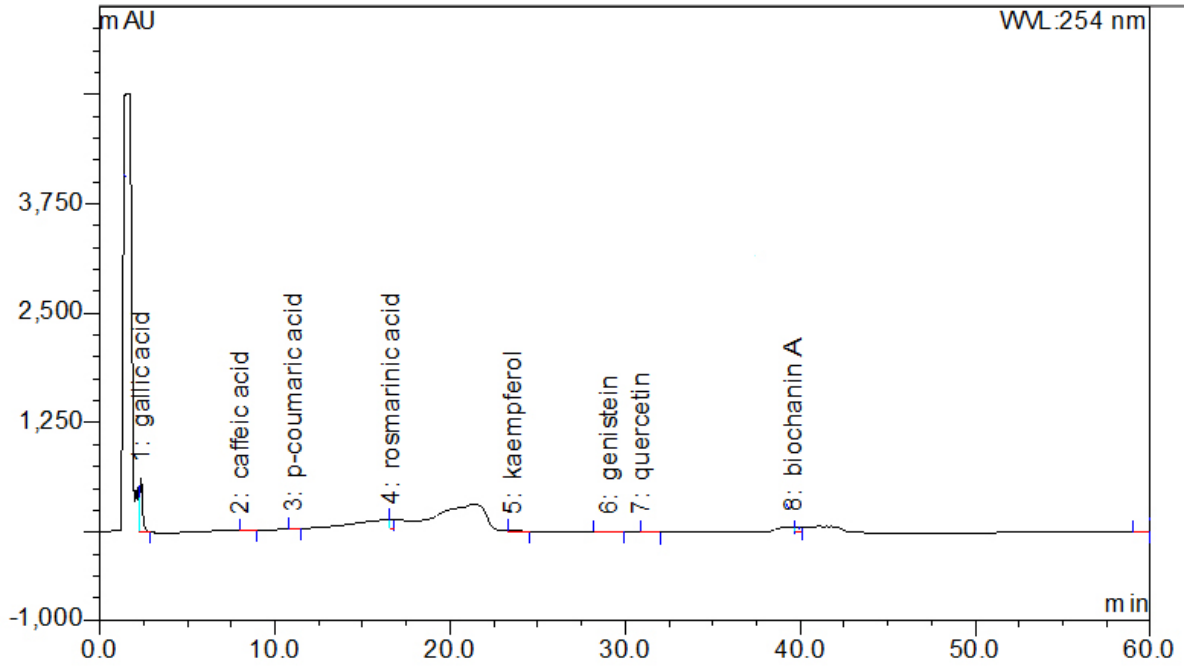
en yüksek **gallik asit** miktarı ($0,11819 \pm 0,03652$ mg/g) MS₈ örneğinde bulunduğu; en yüksek **kafeik asit** miktarları ($0,12859 \pm 0,0765$ mg/g) MS₅, MS₈ örneğinde bulunduğu; en yüksek **p-kumarik asit** miktarı ($0,16563 \pm 0,09675$ mg/g) MS₈ örneğinde bulunduğu; en yüksek **taksifolin** miktarı ($0,18724 \pm 0,04975$ mg/g) MS₈ örneğinde bulunduğu; en yüksek **rosmarinikasit** miktarı ($0,1668 \pm 0,0003$ mg/g) MS₃ örneğinde bulunduğu; en yüksek **kaempferol** miktarı ($0,03828 \pm 0,0284$ mg/g) MS₅ örneğinde bulunduğu; en yüksek **genistein** miktarı ($0,04355 \pm 0,03978$ mg/g) MS₅ örneğinde bulunduğu; en yüksek **kuersetin** miktarı ($0,02732 \pm 0,0061$ mg/g) MS₅ örneğinde bulunduğu; en yüksek **biokanin A** miktarı ($0,3643 \pm 0,2$ mg/g) MS₄ örneğinde bulunduğu; en yüksek **daidzein** miktarı ($1,48083 \pm 0,92$ mg/g) MS₇ örneğinde bulunduğu; en yüksek **formononetin** miktarı ($0,266 \pm 0,2147$ mg/g) MS₃ örneğinde bulunduğu; en yüksek **şikimik asit** miktarı ($220,402 \pm 17,296$ mg/g) MS₄ örneğinde bulunduğu tespit edildi. *B. capillare*'nin in vitro gametofit kültürleri HPLC-UV kromatogramları ve miktarları aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.3) (Şekil 4.19, 4.24, 4.29).



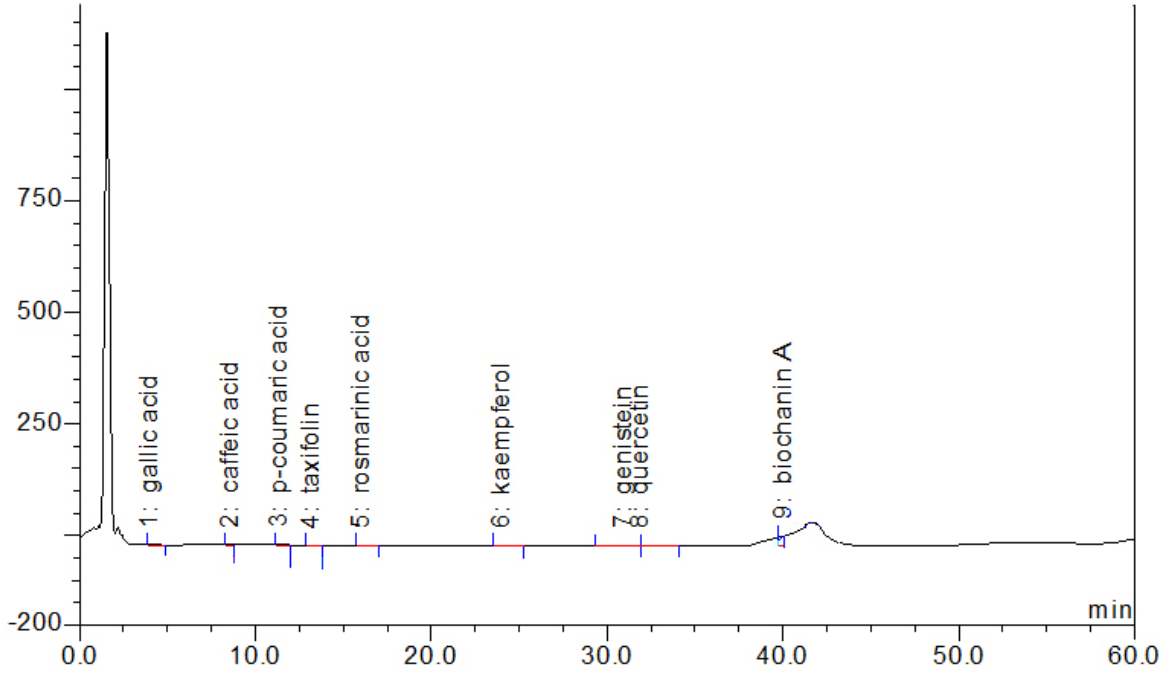
Şekil 4.15 Doğadan toplanan *Bryum capillare* taze örneğinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standartta HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



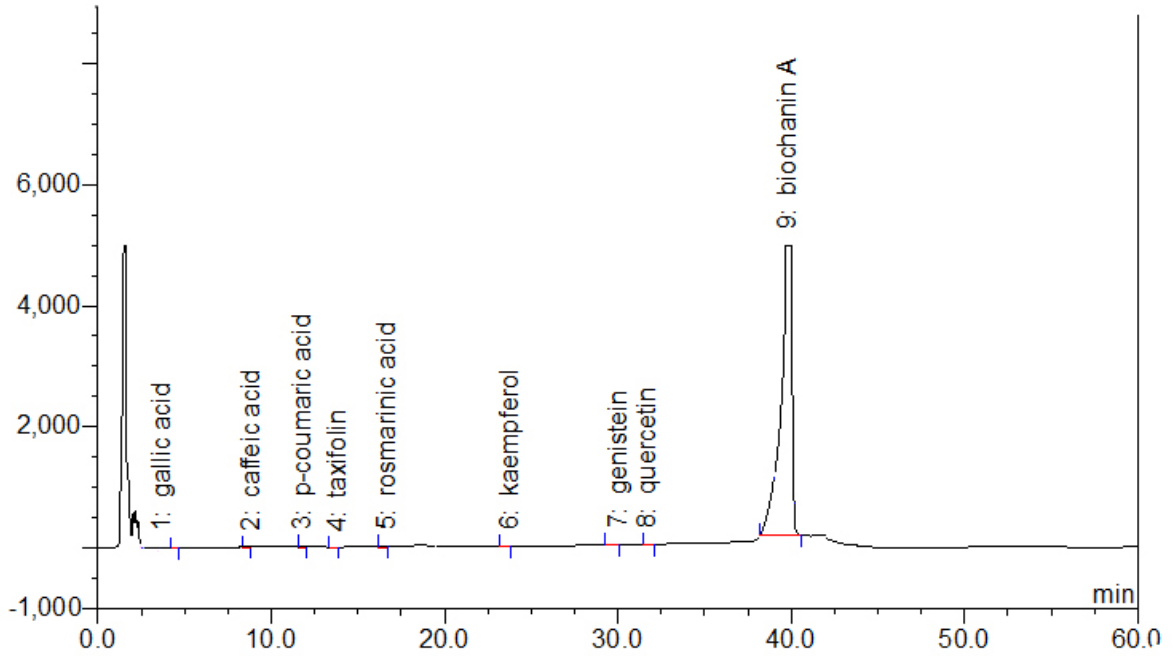
Şekil 4.16 *Bryum capillare* Herbarium 3. Ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standartta HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



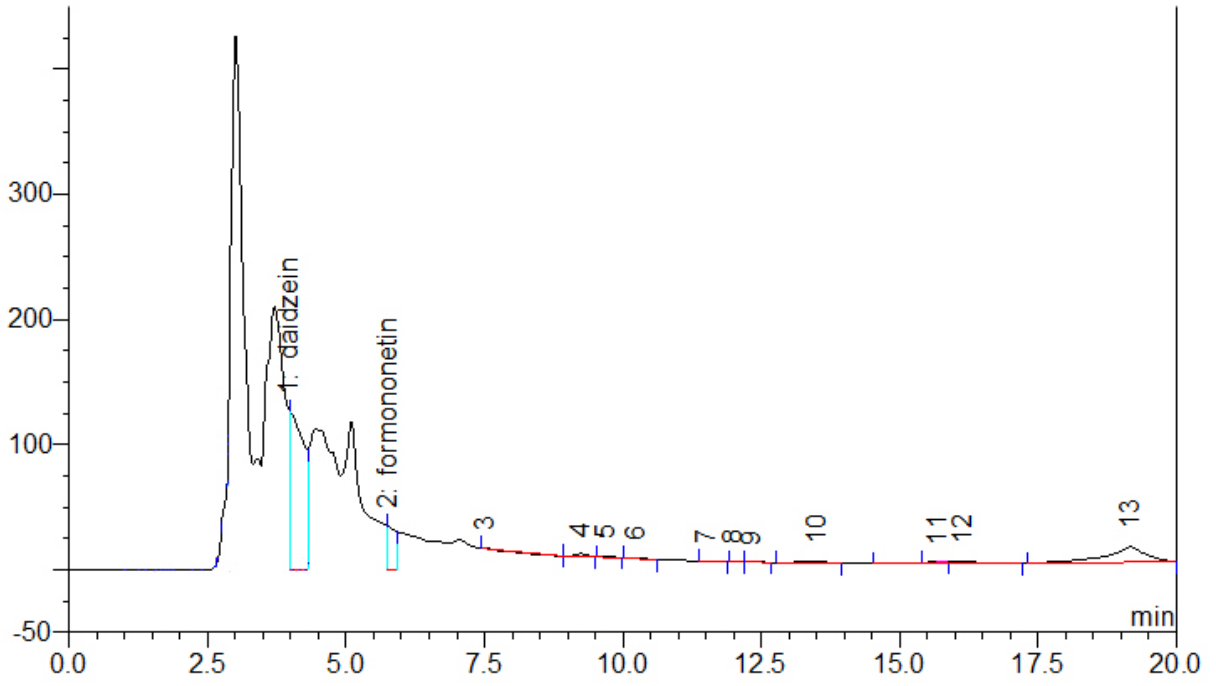
Şekil 4.17 *Bryum capillare* Herbarium 9. Ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standartta HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



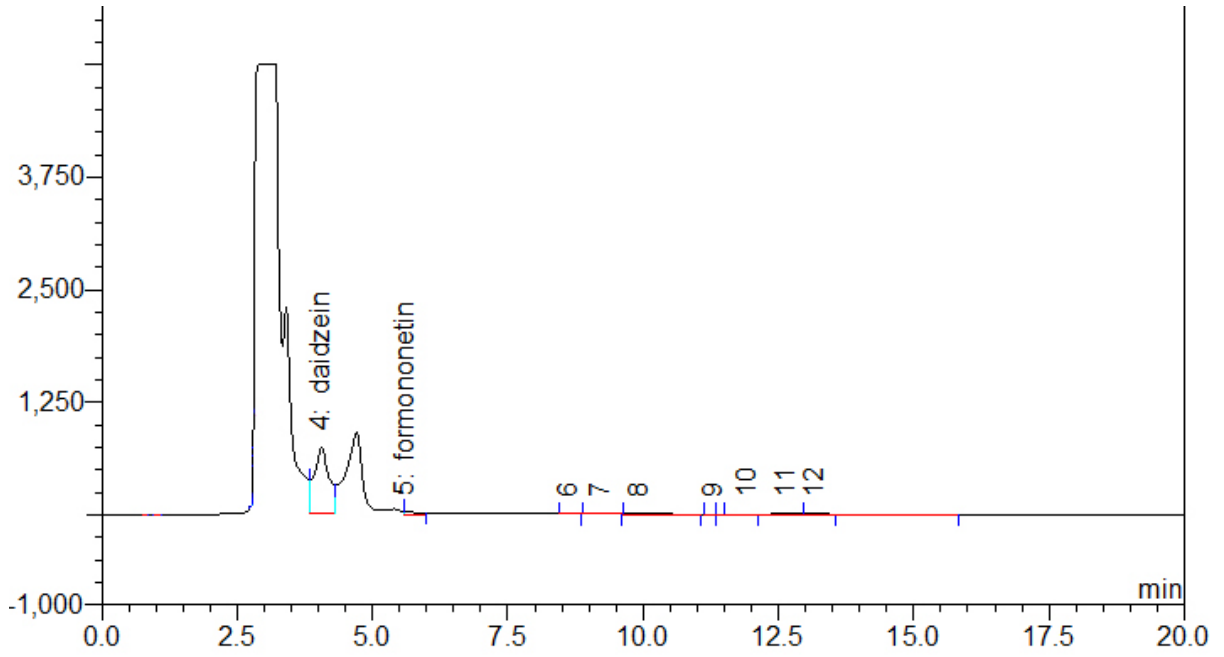
Şekil 4.18 *Bryum capillare in vitro* spor kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standartta HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



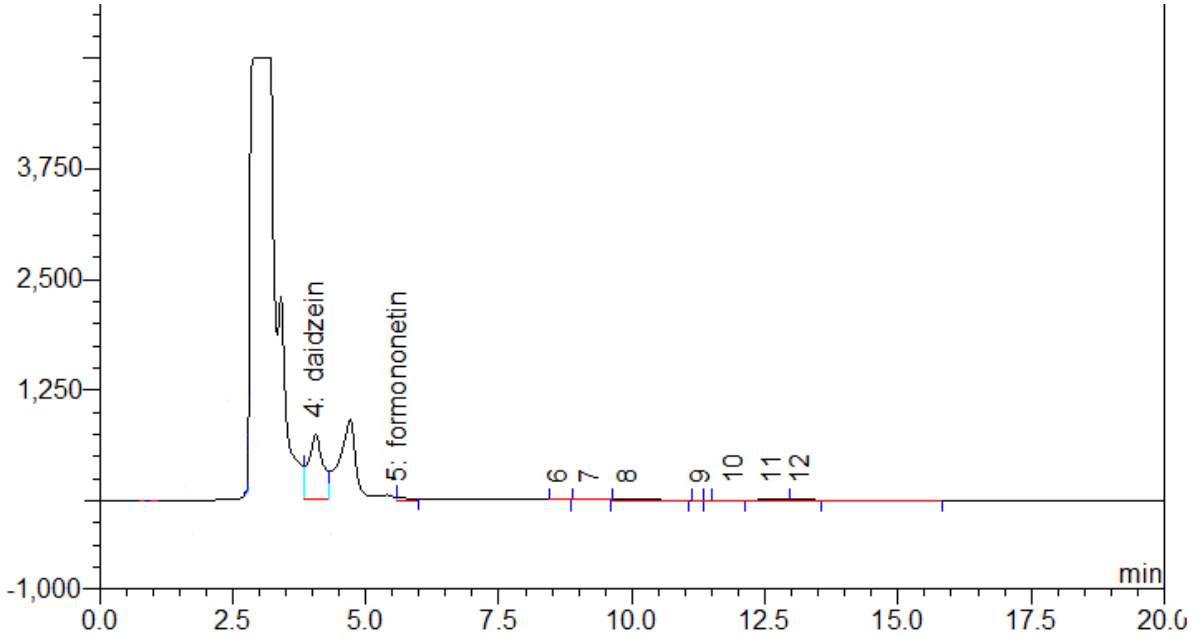
Şekil 4.19 *Bryum capillare in vitro* gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standartta HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



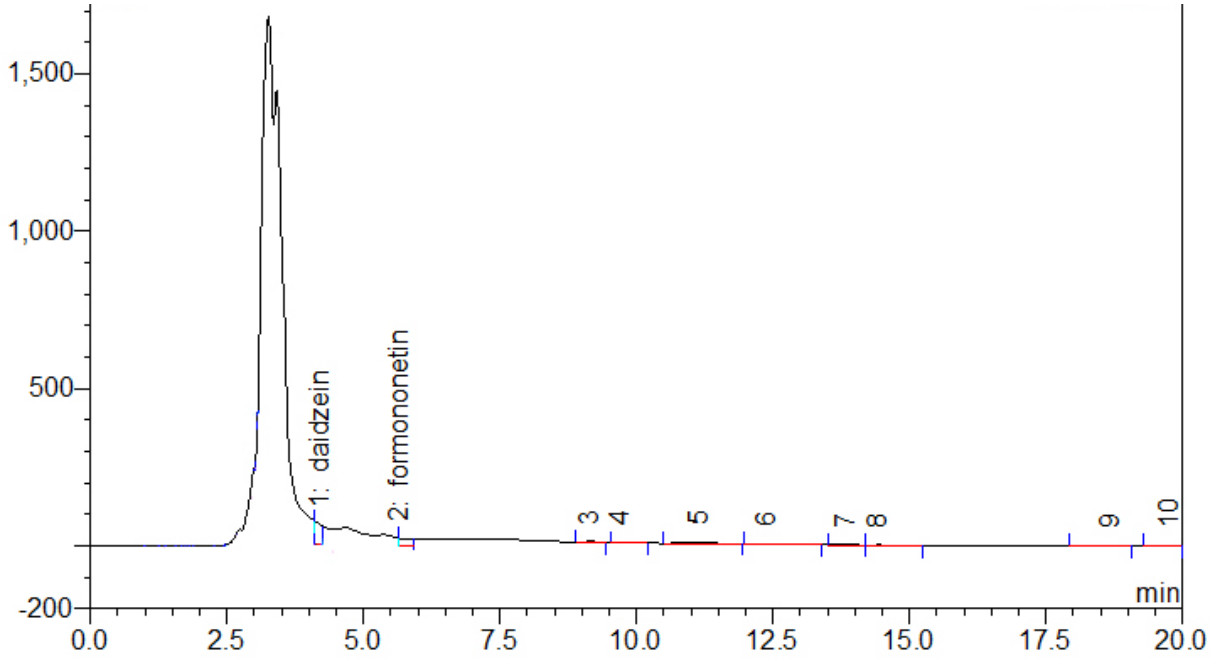
Şekil 4.20 Doğadan toplanan *Bryum capillare* taze örneğinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formononetin standardında HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



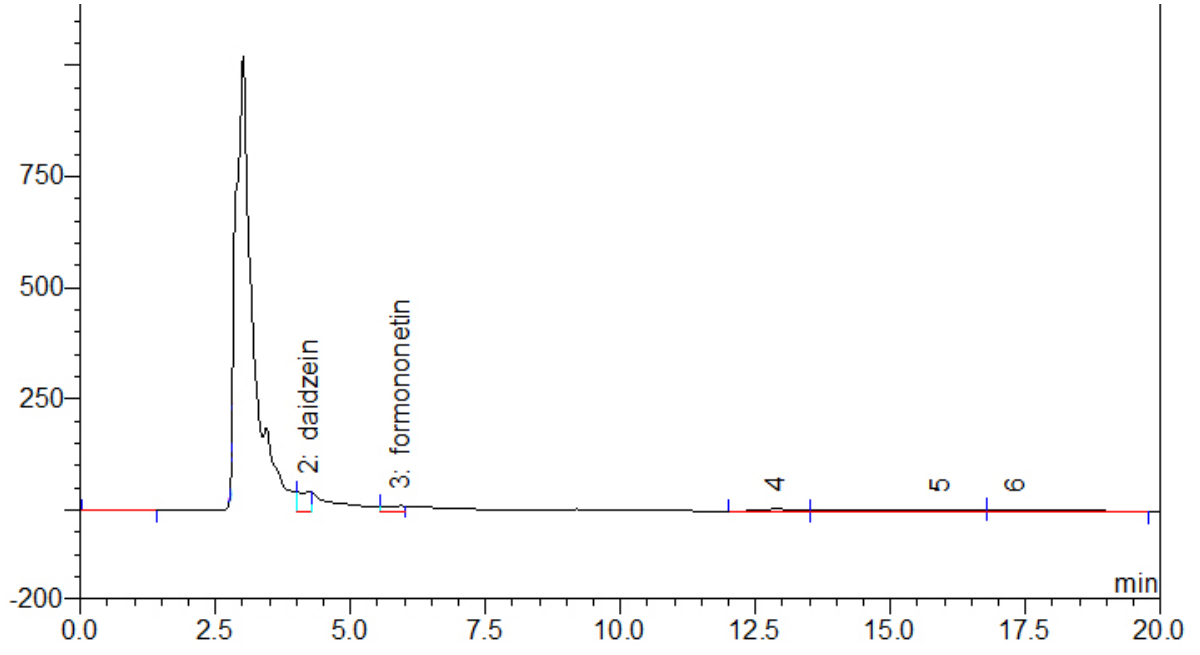
Şekil 4.21 *Bryum capillare* herbarium 3. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formononetin standardında HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



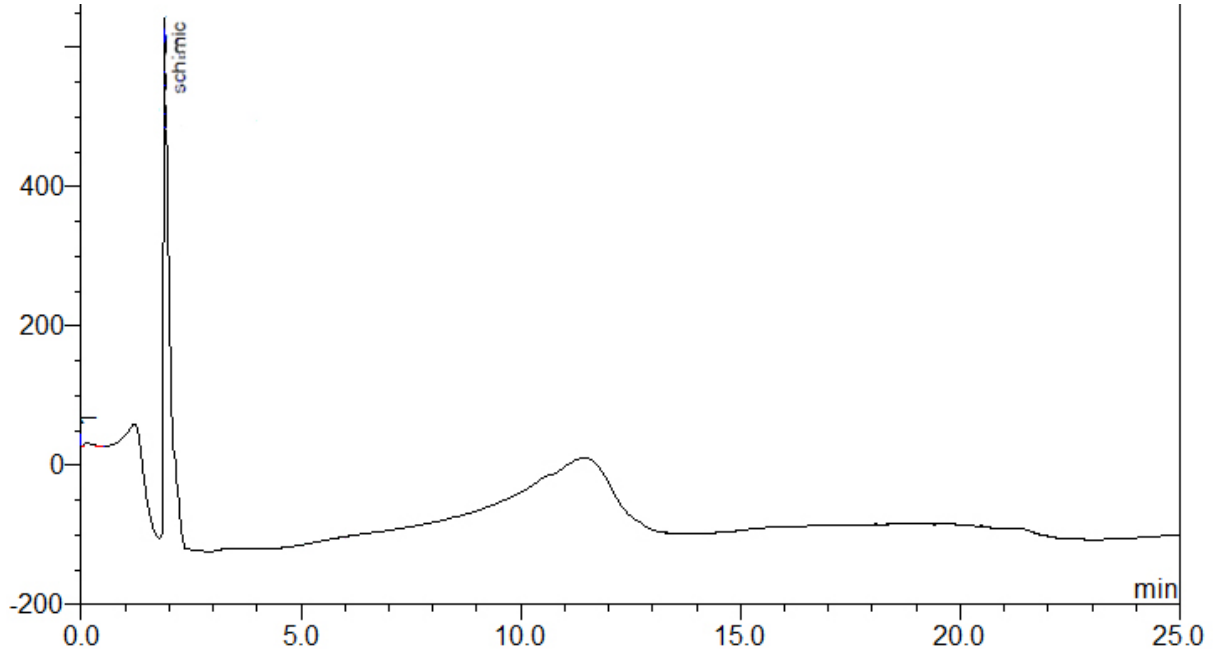
Şekil 4.22 *Bryum capillare* herbarium 9. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formononetin standardında HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



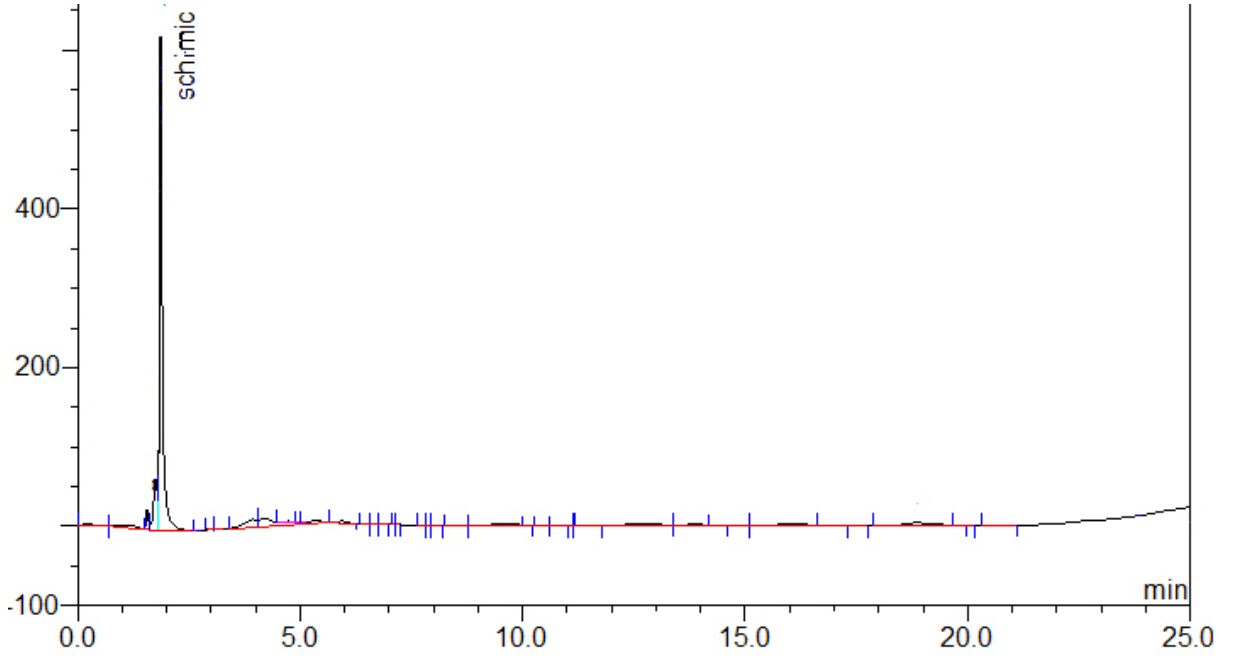
Şekil 4.23 *Bryum capillare* *in vitro* spor kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formononetin HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



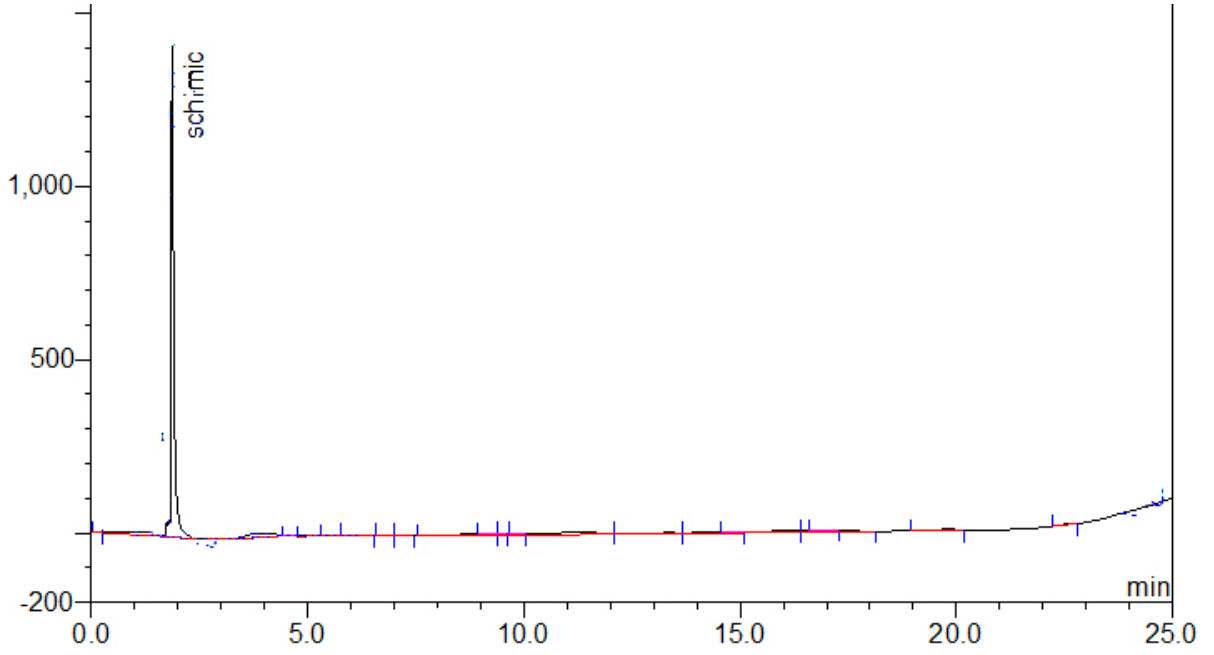
Şekil 4.24 *Bryum capillare* *in vitro* gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formononetin HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



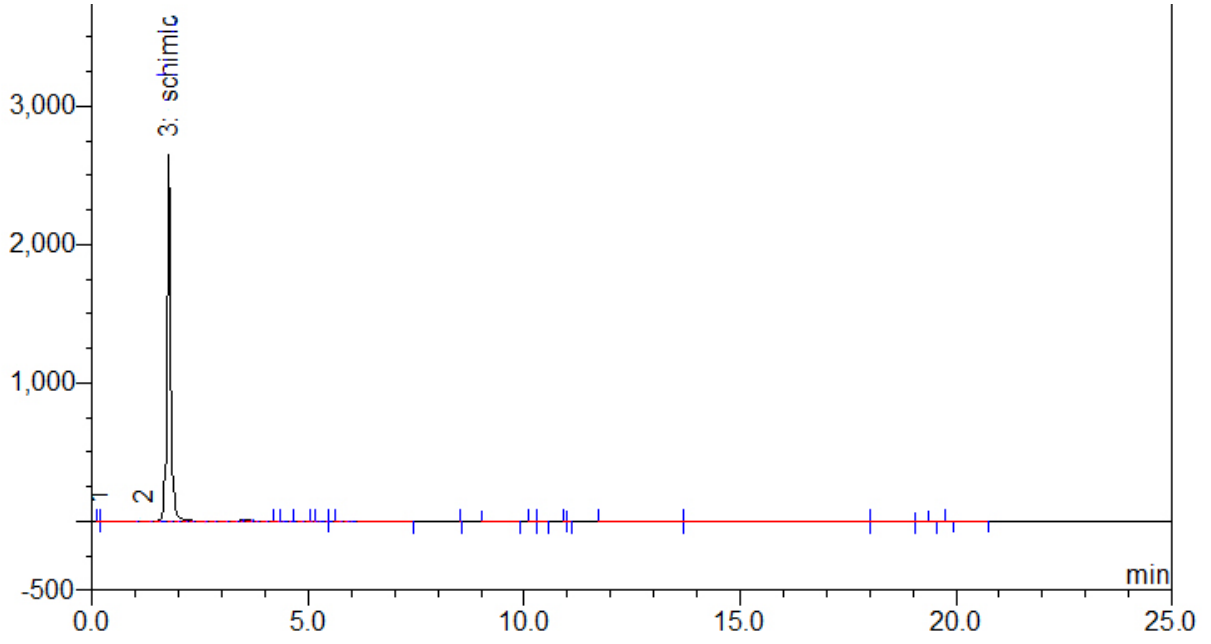
Şekil 4.25 Doğadan toplanan *Bryum capillare* taze örneğinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit standardında HPLC-UV kromatogramı (230 nm)



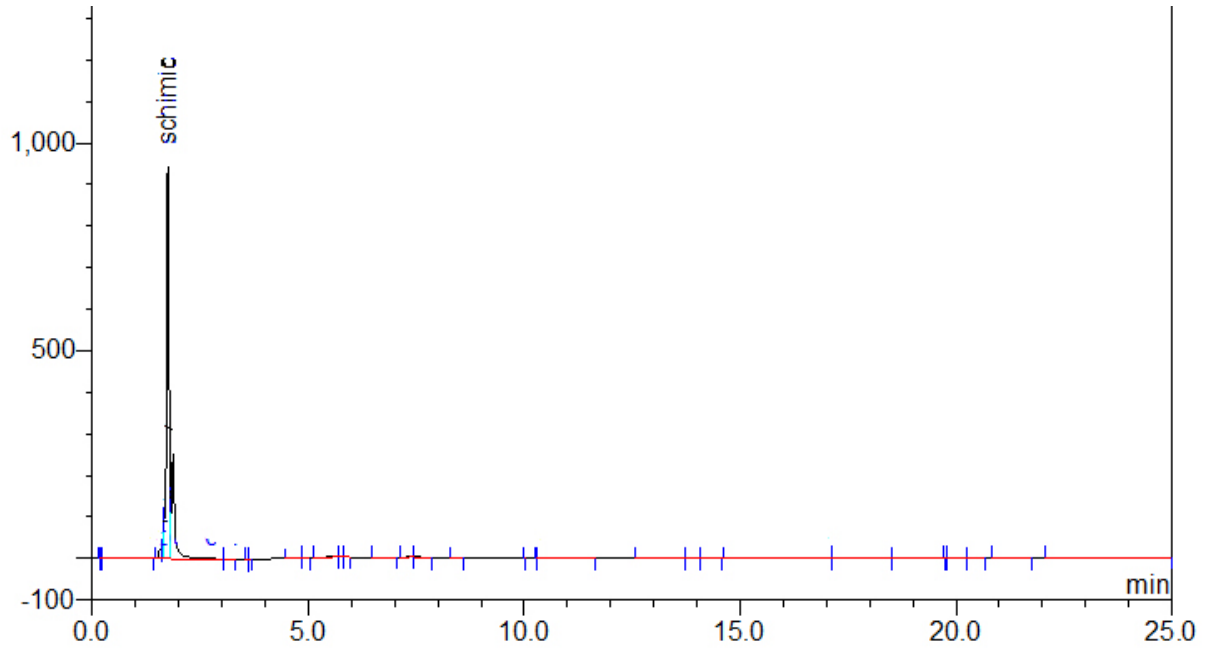
Şekil 4.26 *Bryum capillare* herbarium 3. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit standardında HPLC-UV kromatogramı (230 nm)



Şekil 4.27 *Bryum capillare* herbarium 9. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit standardında HPLC-UV kromatogramı (230 nm)



Şekil 4.28 *Bryum capillare in vitro* spor kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit HPLC-UV kromatogramı (230 nm)



Şekil 4.29 *Bryum capillare in vitro* gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit HPLC-UV kromatogramı (230 nm)

Çizelge 4.3 *B. capillare*'nin taze örnekleri, herbaryum örnekleri ve *in vitro* kültür örneklerinin HPLC-UV analizleri sonucu bulunan fenolik bileşik miktarları (mg/g kuru ağırlık) (nd=bulunamadı).

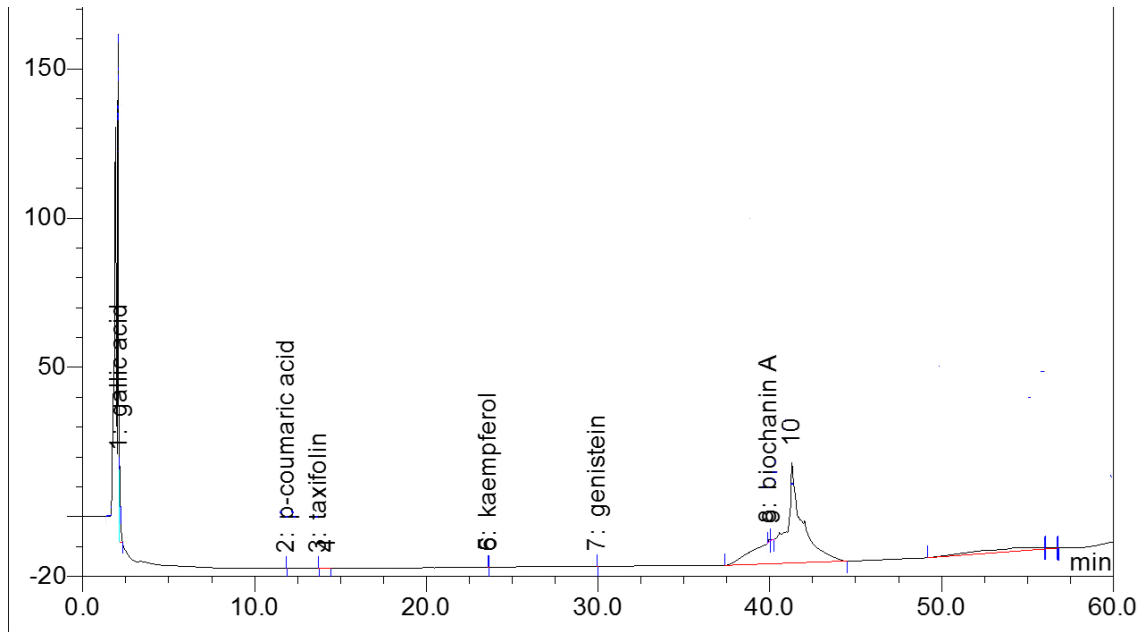
Fenolik Bileşik	<i>Bryum capillare</i> mg/g					
	Taze örnek	Herbaryum 3. ay	Herbaryum 4. ay	Herbaryum 5. ay	Herbaryum 6. ay	Herbaryum 9. ay
Gallik Asit	nd	0,43531±0,002	0,3778±0,021	0,6792±0,51	0,17193±0,0962	1,20784±0,452
Kafeik Asit	0,00256±0,0014	0,04879±0,041	0,0152±0,015	0,0096±0,0092	0,00518±0,0049	0,01861±0,09
<i>p</i> -kumarik Asit	0,00335±0,0024	0,29558±0,1748	0,05818±0,04125	0,06966±0,0324	0,03685±0,0214	0,05871±0,0312
Taksifolin	0,02845±0,01875	0,03197±0,0214	nd	nd	0,10763±0,09941	nd
Rosmarinik Asit	0,00049±0,00021	0,00918±0,0047	0,01112±0,00094	0,12024±0,0745	0,00129±0,00068	0,32837±0,137
Kaempferol	0,00054±0,00047	0,0293±0,0174	0,01301±0,0034	0,02275±0,01974	0,00181±0,00028	0,0444±0,0842
Genistein	0,00001±0,00001	0,035±0,011	0,0264±0,0128	0,00283±0,00164	0,01826±0,00745	0,0065±0,0047
Kuersetin	0,00062±0,00031	0,0395±0,0291	0,0507±0,0372	0,00533±0,00584	0,0093±0,0041	0,022±0,017
Biokanin A	0,00047±0,00014	0,03596±0,023	0,03024±0,0189	0,02226±0,0119	0,0273±0,0165	0,05705±0,0241
Daidzein	0,01031±0,0024	0,13272±0,097	0,22643±0,1117	0,3242±0,2426	0,0239±0,171	0,13272±0,097
Formononetin	0,00205±0,001	0,008±0,002	0,00524±0,004	0,00522±0,004	0,00709±0,006	0,007±0,001
Şikimik Asit	nd	0,17925±0,024	0,078±0,015	0,05872±0,0112	0,0766±0,0512	0,08062±0,021

Çizelge 4.3 (devam ediyor)

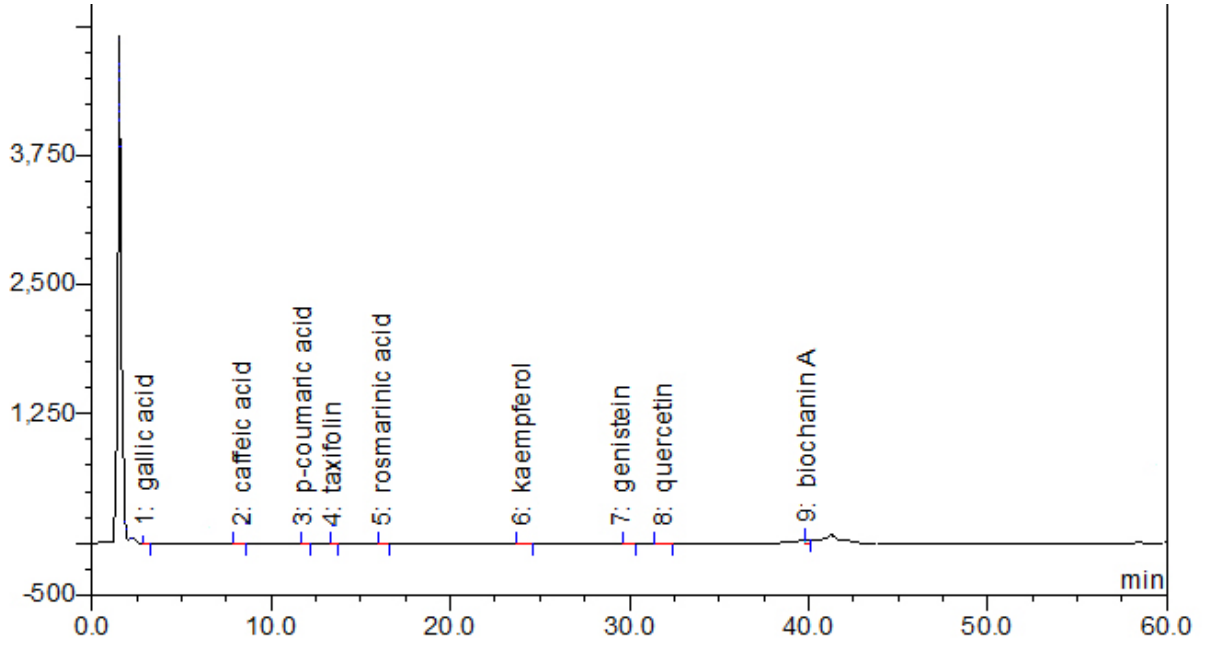
<i>Bryum capillare</i> Spor Kültürleri mg/g								
Fenolik Bileşik	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8
Gallik Asit	0,06765±0,0094		0,00687±0,00024	0,02794±0,017	0,0053±0,0042	0,0145±0,0098	0,00331±0,0029	
Kafeik Asit	0,43077±0,0221		0,00341±0,002	0,26099±0,19	0,018283±0,0098	0,14783±0,0169	0,02481±0,0172	
p-kumarik Asit	0,06775±0,041		0,02313±0,0714	0,0747±0,0541	0,0193±0,0085	0,05205±0,0321	0,02498±0,0174	
Taksifolin	0,0046±0,0045		0,01015±0,01085	nd	0,02802±0,025	nd	0,03758±0,0231	
Rosmarinik Asit	0,00175±0,00084		0,00177±0,00045	nd	0,01363±0,00248	0,00658±0,00346	0,01042±0,0081	
Kaempferol	0,00101±0,00058		0,00077±0,00021	nd	nd	nd	0,02355±0,00246	
Genistein	0,00105±0,00065		0,00056±0,00029	0,00114±0,00065	0,00054±0,00032	0,00052±0,0003	0,0251±0,019	
Kuersetin	0,00141±0,00028		0,00079±0,00016	0,00468±0,0026	0,00262±0,0033	0,0007±0,00034	0,01369±0,0054	
Biokanin A	0,02659±0,0168		0,01512±0,0097	0,208±0,120	0,0456±0,0236	0,03285±0,0147	0,12938±0,098	
Daidzein	0,0152±0,0165		0,00584±0,0031	0,06464±0,054	0,03681±0,0024	0,02239±0,0163	0,02874±0,015	
Formononetin	0,01404±0,012		0,00508±0,003	0,0587±0,05	0,02664±0,008	0,02082±0,019	0,029±0,021	
Şikimik Asit	94,04582±7,3415		79,28662±17,9326	261,65±21,84	91,20691±27,348	147,50003±33,41	72,95811±8,97	
<i>Bryum capillare</i> Gametofit Kültürleri mg/g								
Fenolik Bileşik	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8
Gallik Asit			0,0231±0,00035	0,00437±0,00314	0,00502±0,0048	0,1006±0,087	0,08589±0,0742	0,11819±0,03652
Kafeik Asit			0,0969±0,0001	0,00479±0,0023	0,12704±0,084	0,07518±0,0064	0,0168±0,047	0,12859±0,0765
p-kumarik Asit			0,3439±0,0002	0,00657±0,00349	0,11823±0,07645	0,0542±0,0512	0,02132±0,0203	0,16563±0,09675
Taksifolin			0,0252±0,0005	0,00879±0,003	0,02767±0,025	0,06215±0,0384	0,08212±0,0652	0,18724±0,04975
Rosmarinik Asit			0,1668±0,0003	0,00464±0,0021	0,01291±0,009	0,02693±0,01931	0,06431±0,0581	0,02209±0,01147
Kaempferol			0,0129±0,00072	0,00422±0,00351	0,03828±0,0284	0,00661±0,00324	0,03444±0,0286	0,00609±0,00342
Genistein			0,0049±0,00003	0,00083±0,00071	0,04355±0,03978	0,00073±0,00062	0,01105±0,0092	0,00232±0,00125
Kuersetin			0,0104±0,00001	0,00016±0,00009	0,02732±0,0061	0,00086±0,00097	0,02308±0,013	0,00022±0,00018
Biokanin A			18,8214±0,0174	0,3643±0,2	0,0712±0,025	0,06681±0,059	0,143±0,08	0,0579±0,03
Daidzein			0,3814±0,38	0,06635±0,027	0,01537±0,012	0,06574±0,0055	1,48083±0,92	0,08007±0,085
Formononetin			0,266±0,2147	0,05939±0,041	0,0212±0,003	0,0048±0,001	0,25262±0,101	0,04657±0,092
Şikimik Asit			41,8451±7,62	85,32677±11,247	78,1253±9,652	220,402±17,296	2,62456±0,98	161,99224±41,357

***S. palustre*'nin in vitro gametofit kültürleri ve taze örneği kullanılan standart fenolik bileşikler yönünden karşılaştırıldığında;**

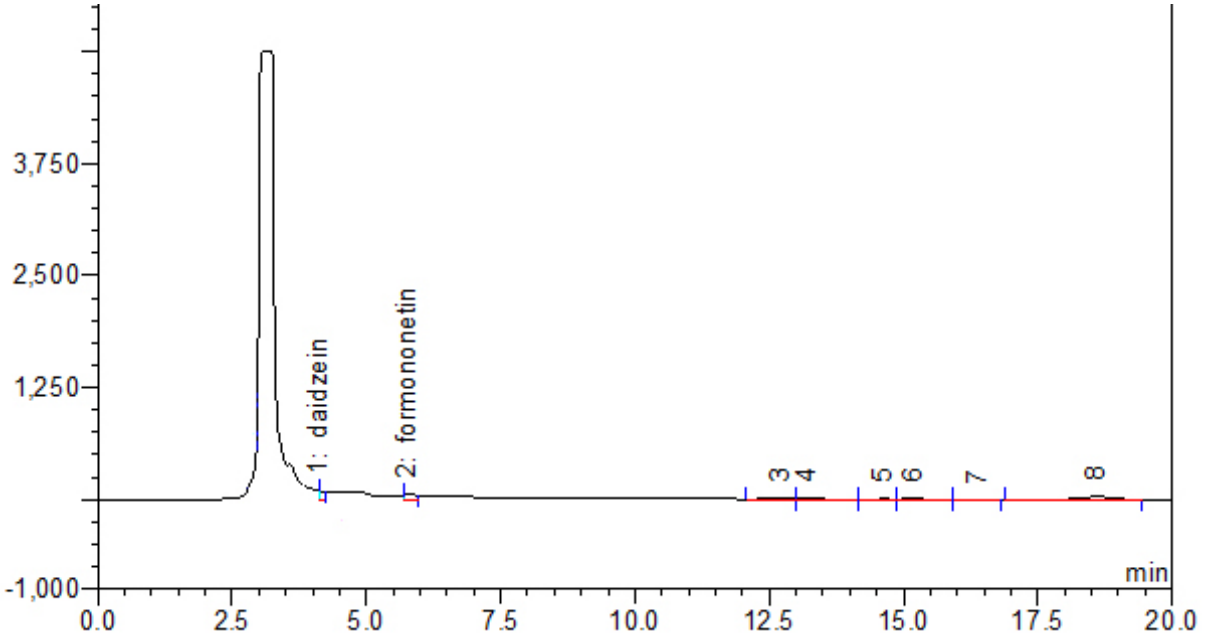
en yüksek **gallik asit** miktarı ($0,63778 \pm 0,214$ mg/g) MS₆ örneğinde bulunduğu; en yüksek **kafeik asit** miktarları ($0,00681 \pm 0,002$ mg/g) MS₄ örneğinde bulunduğu; en yüksek **p-kumarik** asit miktarı ($0,00155 \pm 0,001$ mg/g) MS₂ örneğinde bulunduğu; en yüksek **taksifolin** miktarı ($0,00164 \pm 0,001$ mg/g) MS₂ örneğinde bulunduğu; en yüksek **rosmarinikasit** miktarı ($0,00068 \pm 0,0005$ mg/g) MS₂ örneğinde bulunduğu; en yüksek **kaempferol** miktarı ($0,02589 \pm 0,0024$ mg/g) MS₄ örneğinde bulunduğu; en yüksek **genistein** miktarı ($0,00128 \pm 0,001$ mg/g) MS₄ örneğinde bulunduğu; en yüksek **kuersetin** miktarı ($0,00013 \pm 0,0001$ mg/g) MS₂ örneğinde bulunduğu; en yüksek **biokanin A** miktarı ($0,23478 \pm 0,172$ mg/g) MS₄ örneğinde bulunduğu; en yüksek **daidzein** miktarı ($0,04848 \pm 0,036$ mg/g) MS₄ örneğinde bulunduğu; en yüksek **formononetin** miktarı ($0,23269 \pm 0,139$ mg/g) MS₆ örneğinde bulunduğu; en yüksek **şikimik asit** miktarı ($251,88829 \pm 88,345$ mg/g) MS₄ örneğinde bulunduğu belirlenmiştir. *S. palustre*'nin in vitro gametofit kültürleri ve taze örneklerinin HPLC-UV kromatogramları ve miktarları aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.4)(Şekil 4.30, 4.31, 4.32, 4.33).



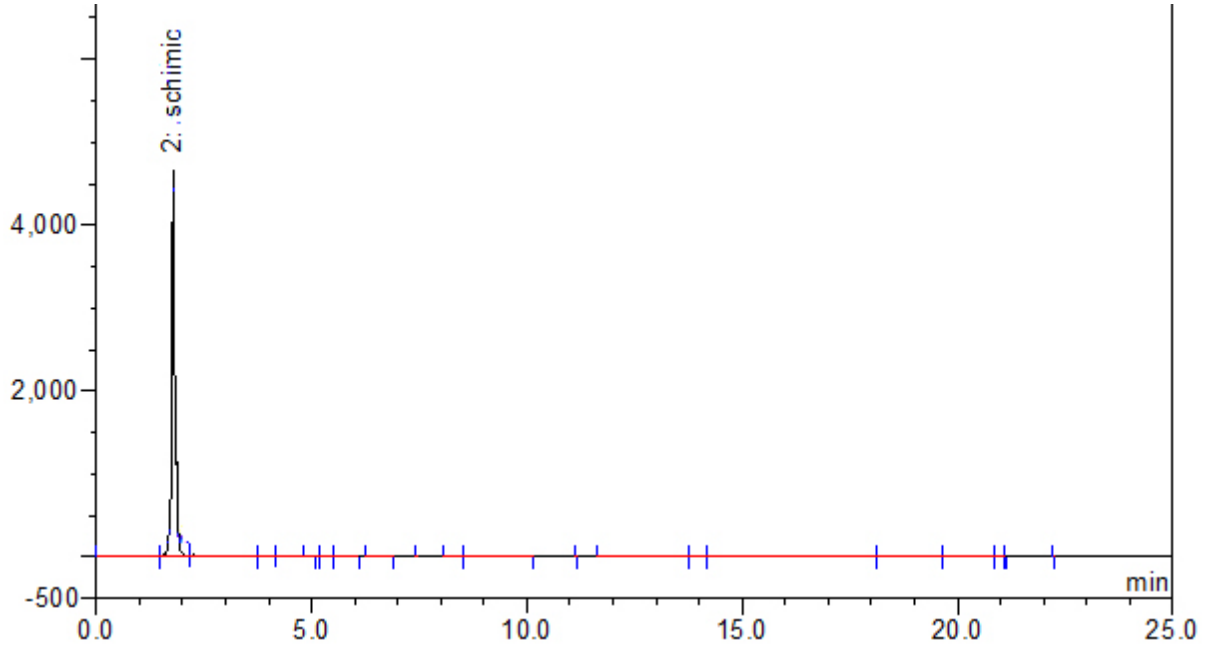
Şekil 4.30 Doğadan toplanan *Sphagnum palustre* taze örneklerinin HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



Şekil 4.31 *Sphagnum palustre in vitro* gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS₁ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standart HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



Şekil 4.32 *Sphagnum palustre in vitro* gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS₁ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formononetin HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



Şekil 4.33 *Sphagnum palustre in vitro* gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS₁ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit HPLC-UV kromatogramı (230 nm)

Çizelge 4.4 *S. palustre*'nin taze örnekleri ve *in vitro* kültür örneklerinin HPLC-UV analizleri sonucu bulunan fenolik bileşik miktarları (mg/g kuru ağırlık) (nd=bulunamadı)

Fenolik Bileşik	<i>Sphagnum palustre</i> Gametofit Kültürleri mg/g								
	Taze örnek	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8
Gallik Asit	0,00889±0,008	0,01842±0,002	0,05114±0,03		0,51868±0,044		0,63778±0,214		
Kafeik Asit		0,0012±0,001	0,00123±0,001		0,00681±0,002		0,00002±0,00001		
<i>p</i> -kumarik Asit		0,00032±0,0002	0,00155±0,001		0,00001±0,00001		0,00000		
Taksifolin		0,00013±0,0001	0,00164±0,001		0,00000		0,00008±0,00004		
Rosmarinik Asit		0,00012±0,0001	0,00068±0,0005		0,00002±0,00002		0,00012±0,0001		
Kaempferol		0,00001±0,00001	0,00074±0,0005		0,02589±0,0024		0,00001±0,00001		
Genistein		0,00001±0,00001	0,0002±0,0001		0,00128±0,001		0,00002±0,0002		
Kuersetin		0,0000012±0,00001	0,00013±0,0001		0,00001±0,00001		0,00001±0,00001		
Biokanin A	0,0001±0,0001	0,03734±0,0092	0,01482±0,013		0,23478±0,172		0,17891±0,15		
Daidzein	0,01029±0,01	0,0099±0,01	0,0139±0,01		0,04848±0,036		0,02438±0,021		
Formononetin	0,00111±0,001	0,01028±0,01	0,00807±0,008		0,03364±0,015		0,23269±0,139		
Şikimik Asit	0,0028±0,002	116,02892±49,24	89,42953±37,419		251,88829±88,345		158,46427±73,716		

***T. alopecurum*'un doğadan toplanan taze örnekleri ve herbaryum örnekleri kullanılan standart fenolik bileşikler yönünden karşılaştırıldığında;**

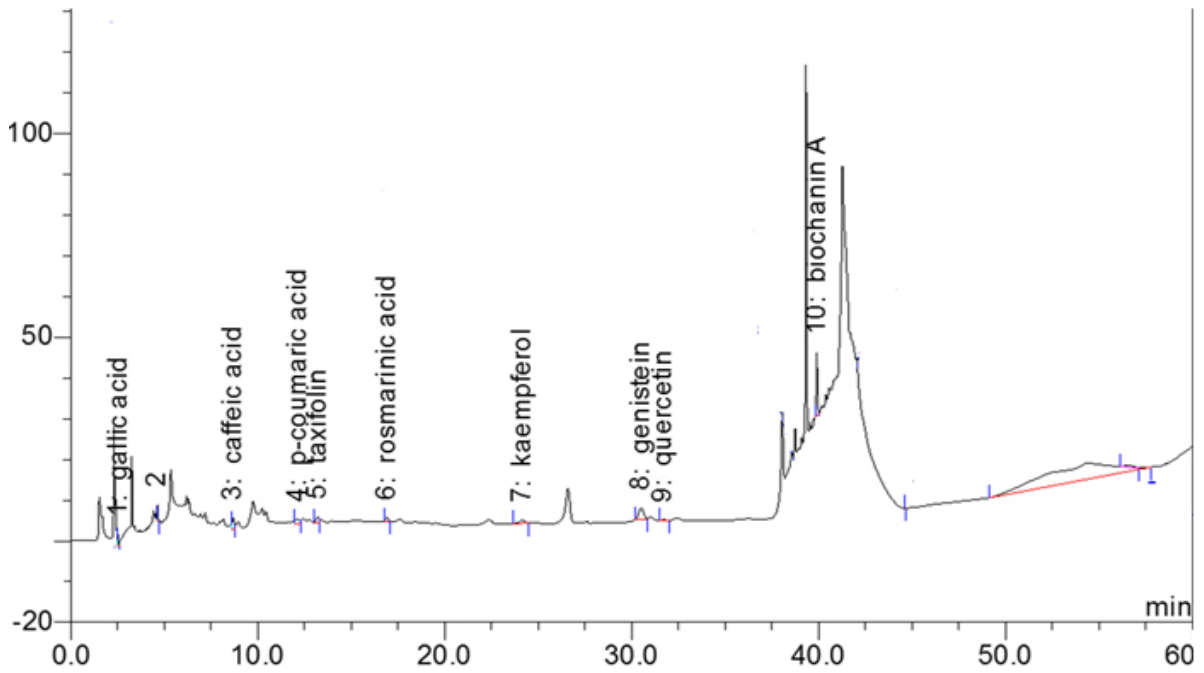
en yüksek **gallik asit** miktarı (0,04098±0,031 mg/g) herbaryumdan alınan **6. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **kafeik asit** miktarı (0,0151±0,01 mg/g) herbaryumdan alınan **7. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **p-kumarik asit** miktarı (0,02461±0,012 mg/g) herbaryumdan alınan **4. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **taksifolin** miktarı (0,01418±0,014 mg/g) herbaryumdan alınan **7. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **rosmarinikasit** miktarı (0,0086±0,007 mg/g) herbaryumdan alınan **4. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **kaempferol** miktarı (0,00447±0,004 mg/g) herbaryumdan alınan **4. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **genistein** miktarı (0,00068±0,0002 mg/g) doğadan toplanan taze örneğinde bulunduğu; en yüksek **kuersetin** miktarı (0,00105±0,001 mg/g) herbaryumdan alınan **10. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **biokanin A** miktarı (0,08053±0,04 mg/g) herbaryumdan alınan **10. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **daidzein** miktarı (0,02558±0,01 mg/g) herbaryumdan alınan **4. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **formononetin** miktarı (0,0139±0,01 mg/g) herbaryumdan alınan **10. ay** örneğinde bulunduğu; en yüksek **şikimik asit** miktarı (3,52319±1,84 mg/g) herbaryumdan alınan **4. ay** örneğinde bulunmuştur. *T. alopecurum*'un doğadan toplanan taze örnekleri ve herbaryum örneklerinin HPLC-UV kromatogramları ve miktarları aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 4.5) (Şekil 4.34, 4.35, 4.38, 4.39, 4.40, 4.43, 4.44, 4.45).

***T. alopecurum*'un *in vitro* spor kültürleri kullanılan standart fenolik bileşikler yönünden karşılaştırıldığında;**

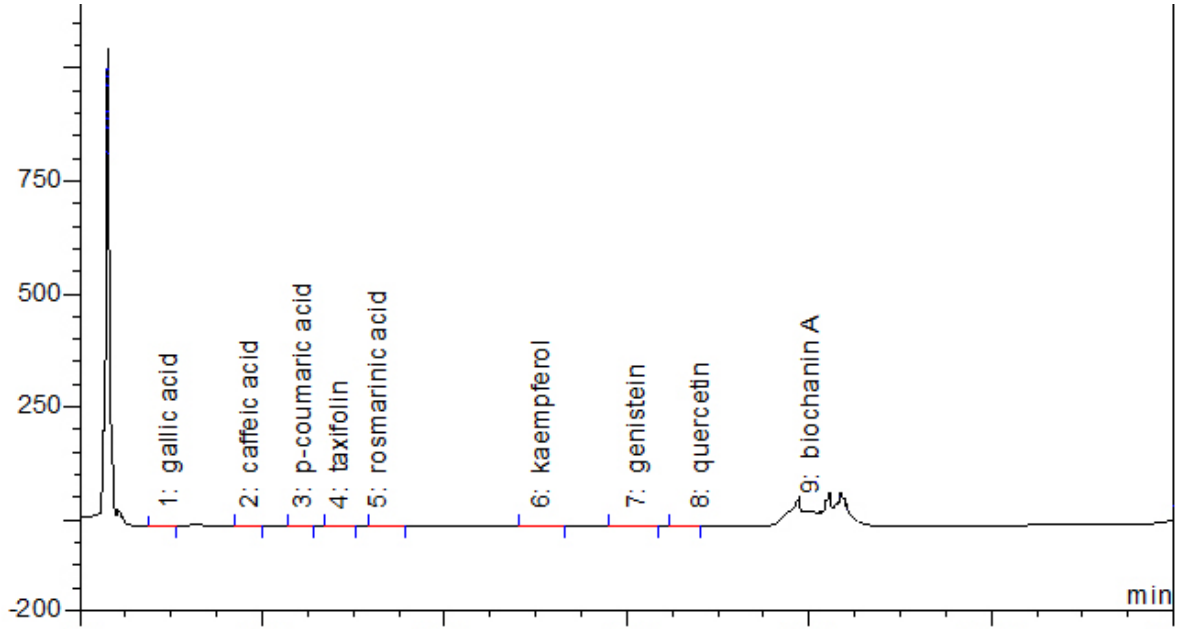
en yüksek **gallik asit** miktarı (0,02935±0,029 mg/g) MS₄ örneğinde bulunduğu; en yüksek **kafeik asit** miktarı (0,00365±0,002 mg/g) MS₅ örneğinde bulunduğu; en yüksek **p-kumarik asit** miktarı (0,045±0,034 mg/g) MS₃ örneğinde bulunduğu; en yüksek **taksifolin** miktarı (0,01463±0,012 mg/g) MS₂ örneğinde bulunduğu; en yüksek **rosmarinikasit** miktarı (0,00493±0,002 mg/g) MS₂ örneğinde bulunduğu; en yüksek **kaempferol** miktarı (0,00992±0,009 mg/g) MS₂ örneğinde bulunduğu; **genistein ve kuersetin** bulunmadığı; en yüksek **biokanin A** miktarı (0,11483±0,081 mg/g) MS₈ örneğinde bulunduğu; en yüksek **daidzein** miktarı (0,05315±0,042 mg/g) MS₂ örneğinde bulunduğu; en yüksek **formononetin** miktarı (0,0627±0,05 mg/g) MS₅ örneğinde bulunduğu; en yüksek **şikimik asit** miktarı (120,92086±41,37 mg/g) MS₈ örneğinde bulunduğu belirlenmiştir. *T. alopecurum*'un *in vitro*

spor kültürü örneklerinin HPLC-UV kromatogramları ve miktarları aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 4.5) (Şekil 4.36, 4.41, 4.46).

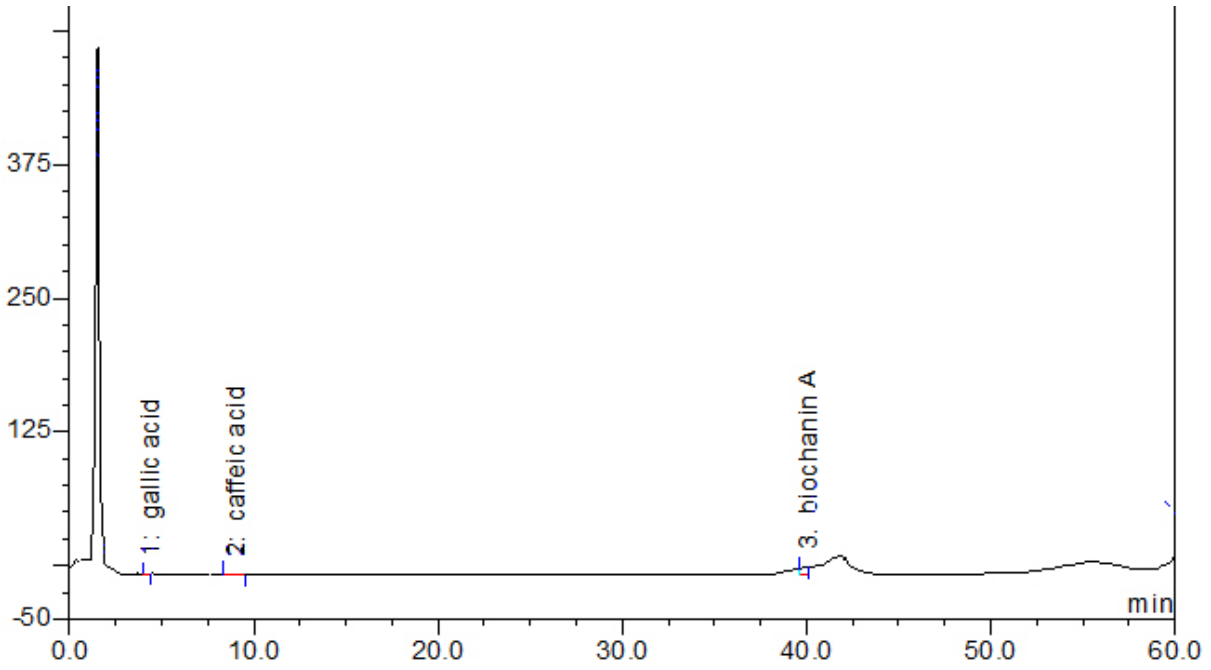
T. alopecurum'un *in vitro* gametofit kültüründe fenolik bileşik miktarları incelendiğinde sadece MS₁ ortamında başarılı büyüme gerçekleştiğinden farklı kültürlerle karşılaştırma yapılamamıştır. MS₁ ortamı kültür örneklerinin standart fenolik bileşiklerine bakıldığında **gallik asit** miktarı (0,00176±0,001 mg/g); **p-kumarik asit** miktarı (0,02612±0,0024 mg/g), **rosmarinikasit** miktarı (0,02079±0,001 mg/g), **biokanin A** miktarı (0,0505±0,05 mg/g), **daidzein** miktarı (0,018±0,01 mg/g), **formononetin** miktarı (0,0153±0,01 mg/g), **şikimik asit** miktarı (118,58952±47,65 mg/g)'dir. *T. alopecurum*'un *in vitro* gametofit kültürü örneklerinin HPLC-UV kromatogramları ve miktarları aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 4.5) (Şekil 4.37, 4.42, 4.47).



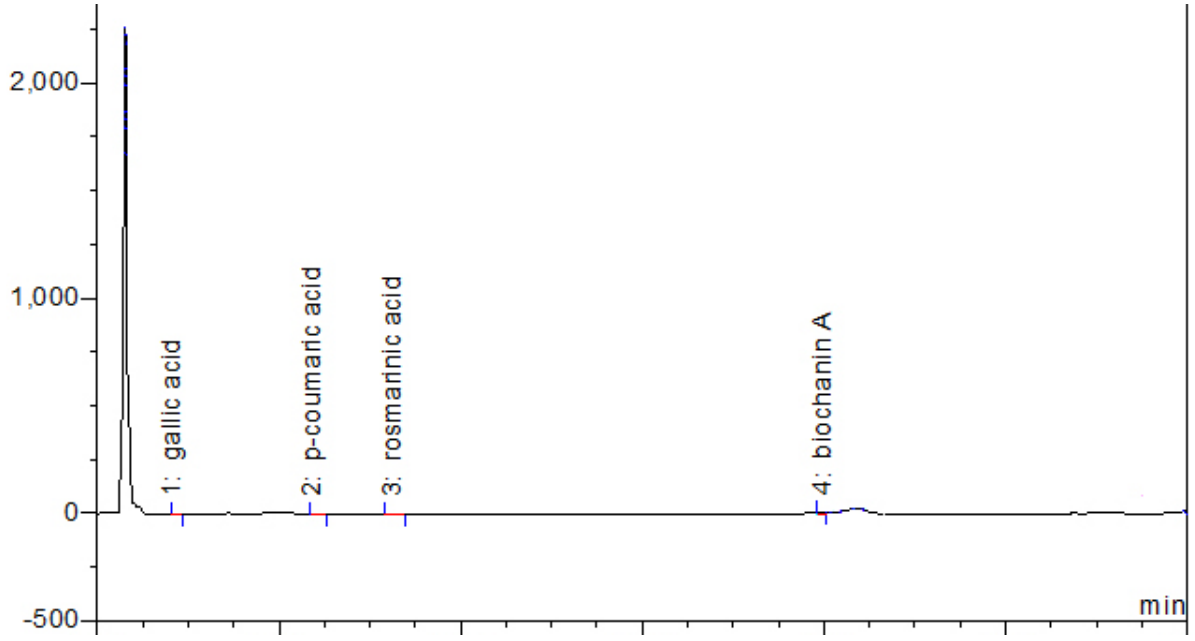
Şekil 4.34 Doğadan toplanan *Thamnobryum alopecurum* taze örneklerinin 9'lu standart HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



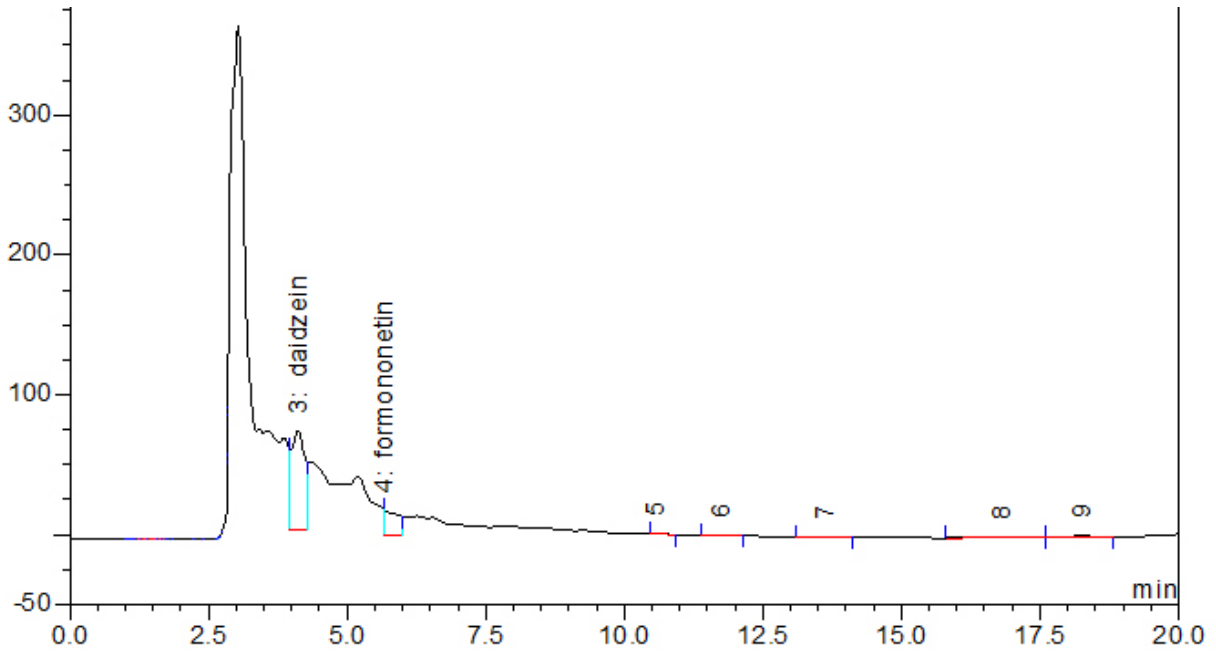
Şekil 4.35 *Thamnobryum alopecurum* herbarium 4. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standartta HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



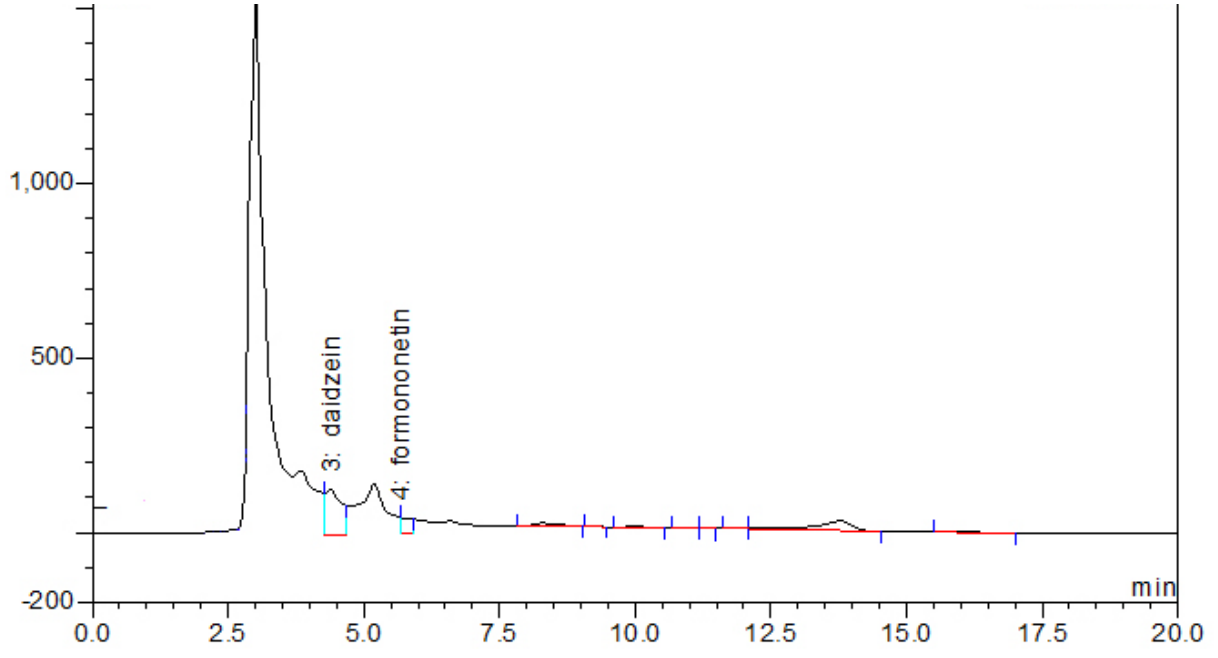
Şekil 4.36 *Thamnobryum alopecurum* in vitro spor kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standartta HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



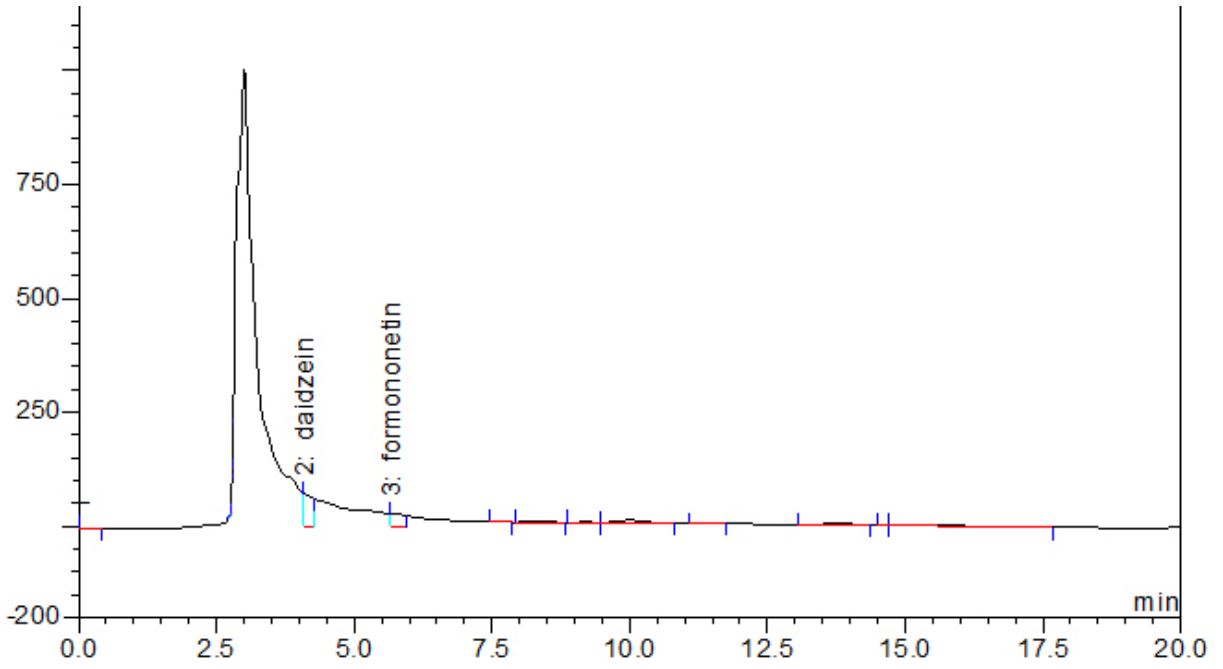
Şekil 4.37 *Thamnobryum alopecurum* *in vitro* gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS₁ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın 9'lu standartta HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



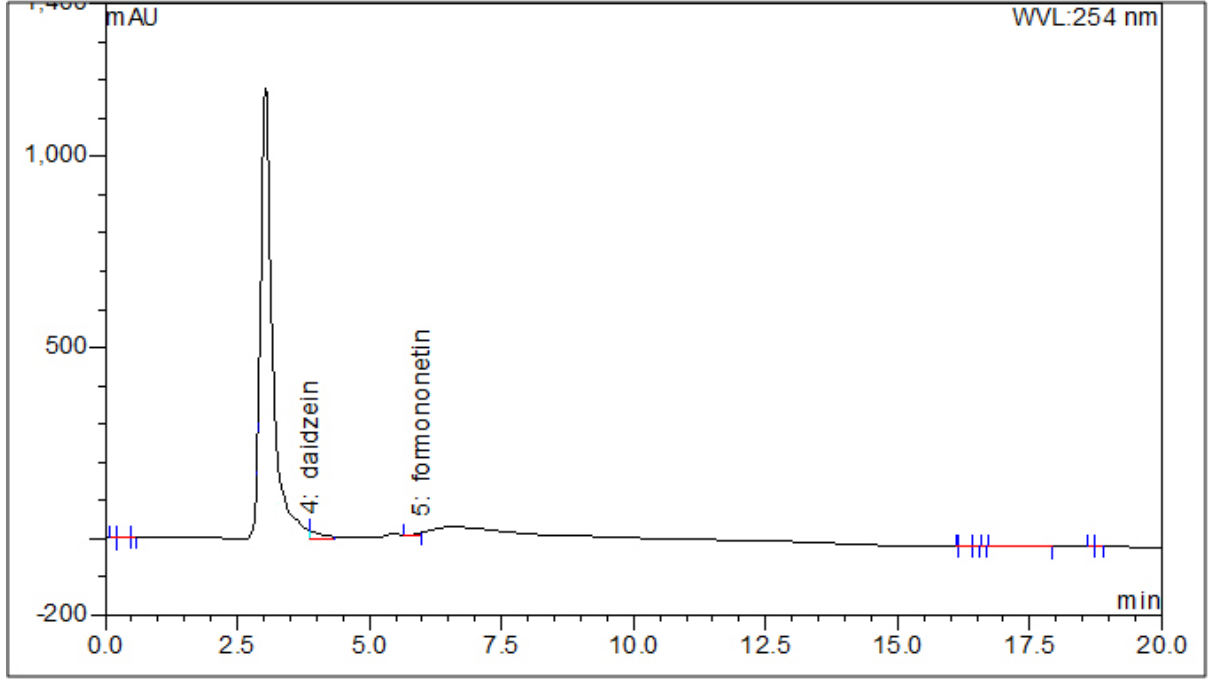
Şekil 4.38 Doğadan toplanan *Thamnobryum alopecurum* taze örneğinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formononetin standardında HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



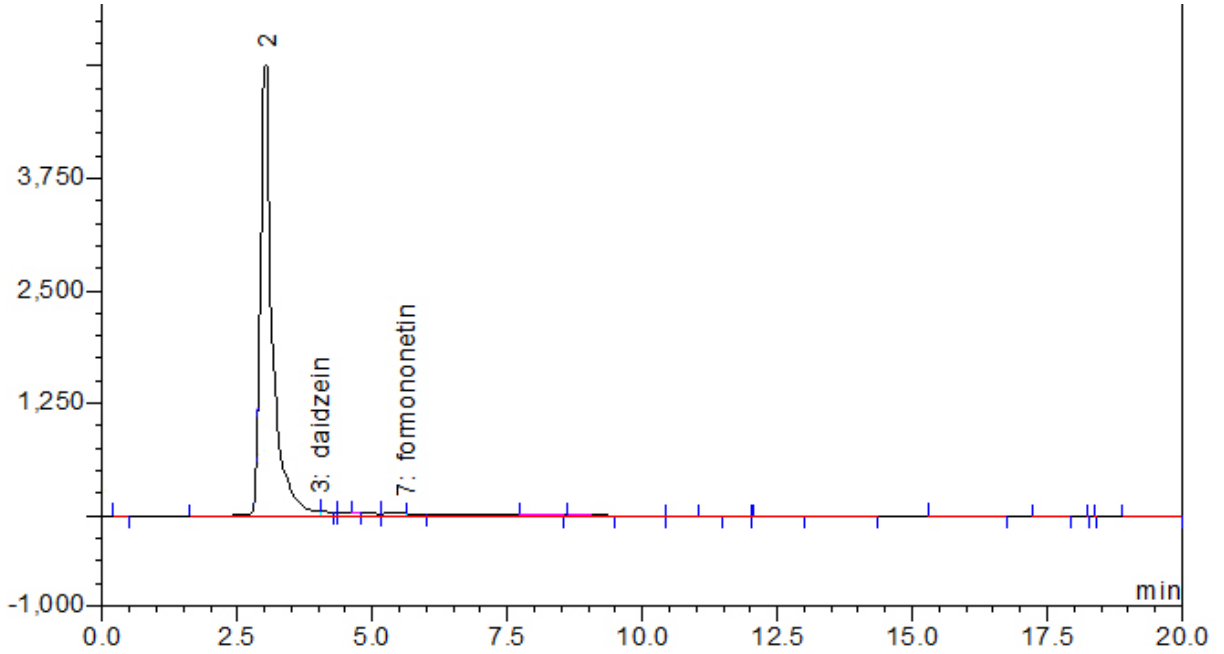
Şekil 4.39 *Thamnobryum alopecurum* herbarium 4. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formononetin standardında HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



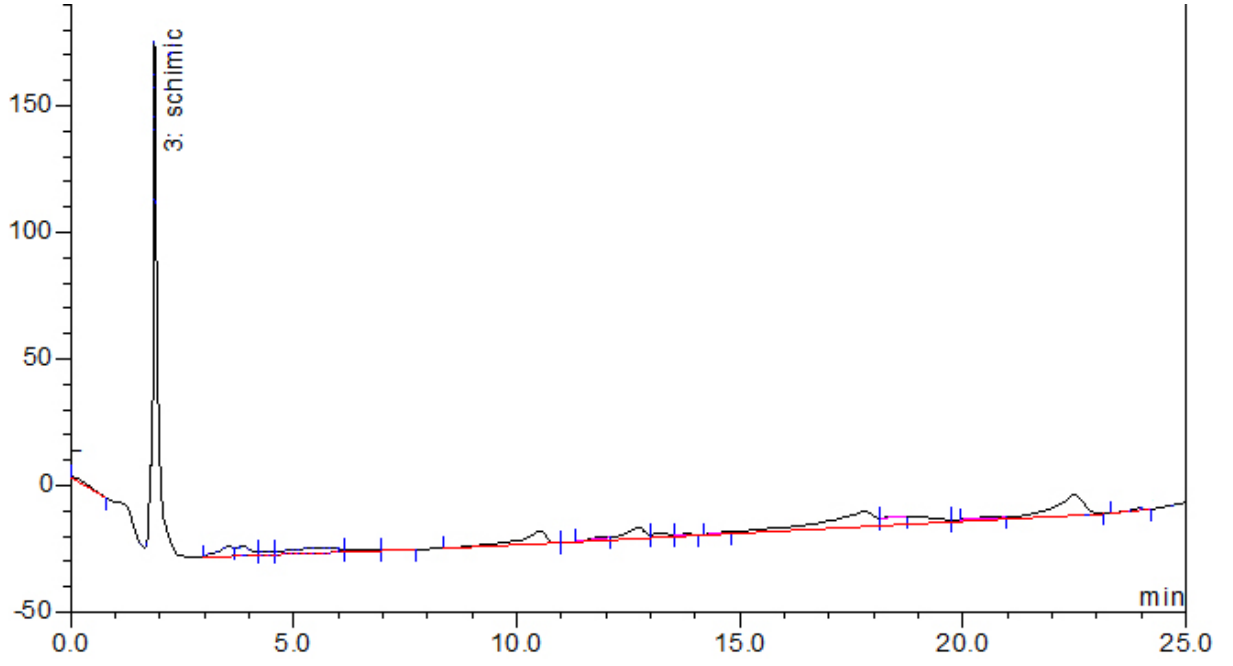
Şekil 4.40 *Thamnobryum alopecurum* herbarium 7. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formononetin standardında HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



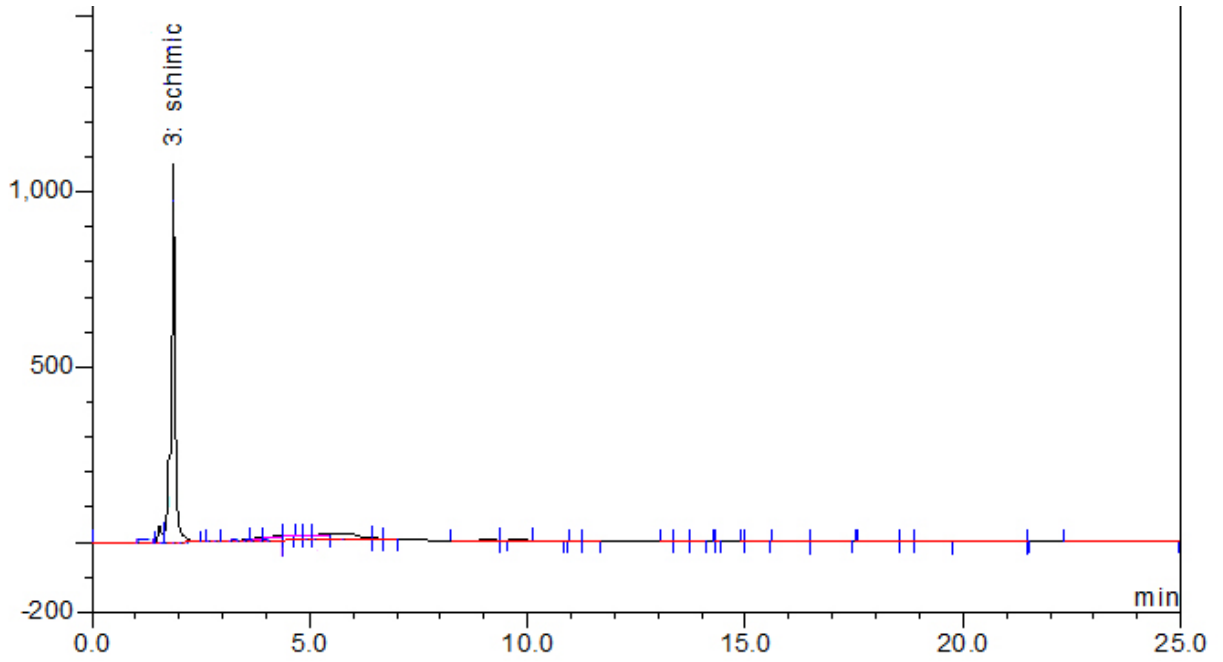
Şekil 4.41 *Thamnobryum alopecurum* *in vitro* spor kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formononetin HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



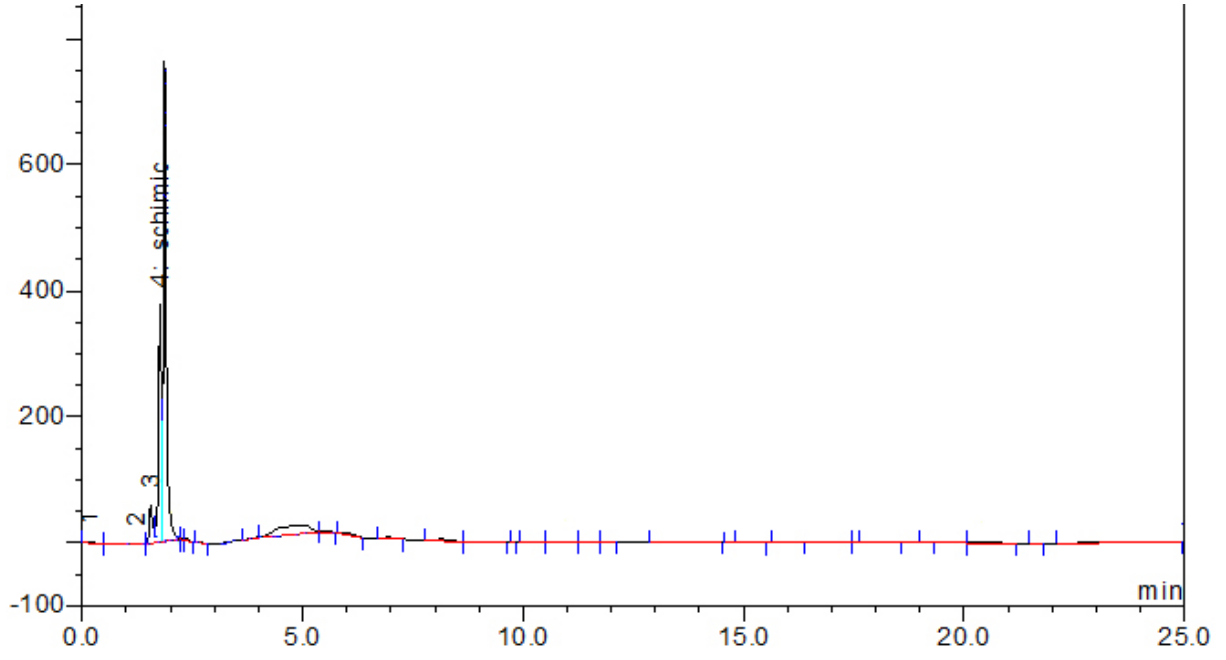
Şekil 4.42 *Thamnobryum alopecurum* *in vitro* gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS₁ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın daidzein+formononetin HPLC-UV kromatogramı (254 nm)



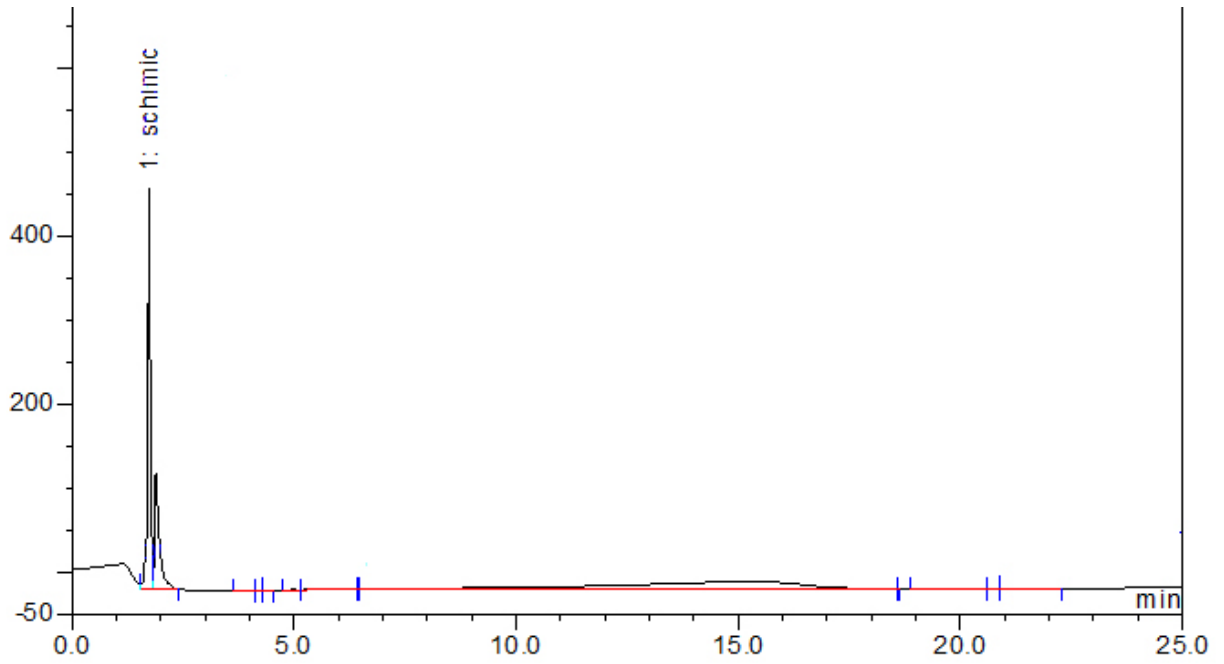
Şekil 4.43 Doğadan toplanan *Thamnobryum alopecurum* taze örneğinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit standardında HPLC-UV kromatogramı (230 nm)



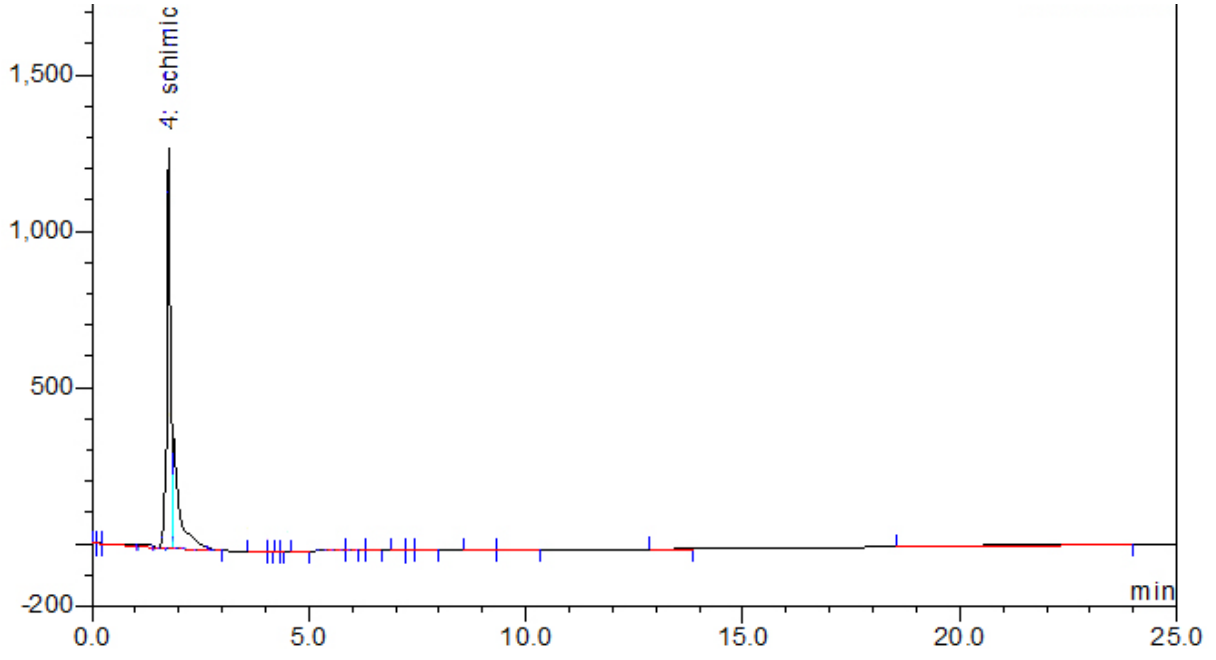
Şekil 4.44 *Thamnobryum alopecurum* herbarium 4. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit standardında HPLC-UV kromatogramı (230 nm)



Şekil 4.45 *Thamnobryum alopecurum* herbarium 7. ay örneğinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit standardında HPLC-UV kromatogramı (230 nm)



Şekil 4.46 *Thamnobryum alopecurum* *in vitro* spor kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS₃ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit HPLC-UV kromatogramı (230 nm)



Şekil 4.47 *Thamnobryum alopecurum in vitro* gametofit kültüründe en iyi büyüme gözlemlenen MS₁ örneklerinden hazırlanmış ekstraktın şikimik asit HPLC-UV kromatogramı (230 nm)

Çizelge 4.5 *T. alopecurum*'un taze örnekleri, herbaryum örnekleri ve *in vitro* kültür örneklerinin HPLC-UV analizleri sonucu bulunan fenolik bileşik miktarları (mg/g kuru ağırlık) (nd=bulunamadı)

Fenolik Bileşik	<i>Thamnobryum alopecurum</i> mg/g					
	Taze örnek	Herbaryum 4. ay	Herbaryum 6. ay	Herbaryum 7. ay	Herbaryum 9. ay	Herbaryum 10. ay
Gallik Asit	0,00059±0,0004	0,01351±0,0012	0,04098±0,031	0,03273±0,017	0,0207±0,01	0,0372±0,01
Kafeik Asit	0,00155±0,0014	0,01435±0,009	0,0073±0,0052	0,0151±0,01	0,00573±0,005	0,00525±0,005
<i>p</i> -kumarik Asit	0,00301±0,001	0,02461±0,012	0,00373±0,002	0,00122±0,001	0,00761±0,006	0,00403±0,004
Taksifolin	0,00571±0,004	0,01339±0,012	0,00182±0,001	0,01418±0,014		
Rosmarinik Asit	0,00096±0,001	0,0086±0,007	0,00141±0,001	0,00564±0,0049	0,00769±0,0075	0,00417±0,003
Kaempferol	0,00074±0,0006	0,00447±0,004	0,00051±0,0003	0,00117±0,001	0,00093±0,0008	0,00087±0,0007
Genistein	0,00068±0,0002	0,00031±0,0002	0,00005±0,00002	0,00028±0,0001	0,00007±0,00005	0,00024±0,0002
Kuersetin	0,00008±0,00007	0,00058±0,0004	0,00001±0,00001	0,00013±0,00001	0,00044±0,0004	0,00105±0,001
Biokanin A	0,00138±0,001	0,01884±0,009	0,01287±0,01	0,02367±0,019	0,02747±0,016	0,08053±0,04
Daidzein	0,00541±0,004	0,02558±0,01	0,00627±0,005	0,00662±0,005	0,01309±0,012	0,02399±0,017
Formononetin	0,00195±0,001	0,00736±0,006	0,0083±0,0074	0,0052±0,004	0,01009±0,01	0,0139±0,01
Şikimik Asit	0,00000	3,52319±1,84	1,90271±0,85	0,86034±0,42	1,03295±0,55	1,88982±0,97

Çizelge 4.5 (devam ediyor)

<i>Thamnobryum alopecurum</i> Spor Kültürleri mg/g								
Fenolik Bileşik	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8
Gallik Asit	nd	0,01275±0,01	0,02687±0,025	0,02935±0,029	0,0289±0,025	0,01719±0,017		0,012±0,009
Kafeik Asit	nd	0,00111±0,001	0,00179±0,001	nd	0,00365±0,002	nd		nd
<i>p</i> -kumarik Asit	nd	0,0039±0,0033	0,045±0,034	nd	nd	nd		nd
Taksifolin	nd	0,01463±0,012	nd	nd	nd	nd		nd
Rosmarinik Asit	nd	0,00493±0,002	nd	nd	nd	nd		nd
Kaempferol	nd	0,00992±0,009	nd	nd	nd	nd		nd
Genistein	nd	nd	nd	nd	nd	nd		nd
Kuersetin	nd	nd	nd	nd	nd	nd		nd
Biokanin A	nd	0,00799±0,005	0,045±0,023	0,03773±0,021	0,07773±0,035	0,08438±0,041		0,11483±0,081
Daidzein	0,00281±0,0012	0,05315±0,042	0,01799±0,013	0,01801±0,011	0,03375±0,024	0,0258±0,019		0,0278±0,021
Formononetin	0,01265±0,01	0,02251±0,019	0,0036±0,0021	0,02536±0,017	0,0627±0,05	0,01692±0,01		0,01446±0,01
Şikimik Asit	65,76785±21,42	59,28304±39,05	57,83256±27,17	89,9398±17,91	104,9496±33,46	54,90648±27,01		120,92086±41,37
<i>Thamnobryum alopecurum</i> Gametofit Kültürleri mg/g								
Fenolik Bileşik	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8
Gallik Asit	0,00176±0,001							
Kafeik Asit	nd							
<i>p</i> -kumarik Asit	0,02612±0,0024							
Taksifolin	nd							
Rosmarinik Asit	0,02079±0,001							
Kaempferol	nd							
Genistein	nd							
Kuersetin	nd							
Biokanin A	0,0505±0,05							
Daidzein	0,018±0,01							
Formononetin	0,0153±0,01							
Şikimik Asit	118,58952±47,65							

BÖLÜM 5

SONUÇ TARTIŞMA

Bryum capillare Hedw., *Sphagnum palustre* L. ve *Thamnobryum alopecurum* (Hedw.) Gangulee türlerinin *in vitro* doku kültürleri, antioksidan aktiviteleri, total fenol içerikleri ve 12 fenolik bileşik standardı (gallik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, taksifolin, rosmarinik asit, kaempferol, genistein, quercetin, biokanin A, daidzein, formononetin, şikimik asit) kullanılarak HPLC-UV analiziyle bitkilerin ve *in vitro* üretilen örneklerin sahip olduğu fenolik bileşiklerin kantitatif miktar tayini başarıyla gerçekleştirildi.

Bryofitlerin içerdikleri sekonder metabolitler bakımından vasküler bitkiler ile karşılaştırdığımızda, bryofitlerin bu konuda çok fazla araştırılmadığı görülmektedir. Çalışmamızın başlangıcında Zonguldak bölgesinde yayılış gösteren *B. capillare* ve *T. alopecurum* türleri Değirmenağzı mevkiinden, *S. palustre* ise Trabzon Çamburnu mevkiinden toplanarak taze örnekleri *in vitro* kültür materyali olarak kullanıldı. Ön denemelerimizin ardından türlerin ekimine devam edildi. Fakat Zonguldak bölgesinde kömür tozu partiküllerinin havadaki bakteriyel kontaminasyonlara neden olan ajanları taşıması nedeniyle kültür ortamlarımız olumsuz yönde etkilenmekteydi. Ekimi yapılan kültürlerde kontaminasyon yüzdesi %90-95'leri bulduğundan kontaminasyon sayımı yapılmamıştır. Bitki Doku Kültür Laboratuvarı haftalık periyotlarla ozonla temizlenmiş ve BEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Fonu tarafından finanse edilen 2012-10-06-12 kod numaralı proje aracılığıyla alınan 3 adet UFO UV filtreli O₂ Temizleyici yardımıyla atmosferik mantar sporlarının ve mikroorganizmaların kültür ortamında oluşturduğu olumsuz kontaminasyonların asgari düzeye indirgenmesi sağlanmıştır. Böylece kültürlerimizin düzenli olarak büyümeleri ve altkültüre alma işlemleri başarıyla yapılarak bu üç türün *in vitro* kültür ortamlarında rejenerasyonları sağlanmıştır.

Bugüne kadar bryofitlerde yapılan *in vitro* gametofit kültür çalışmalarında genel olarak karşılaşılan temel sorunlardan birisi olan kontaminasyon bizim çalışmamızda da

karşılaştığımız bir problemdir (Sabovljević et al. 2003; Rowntree 2006). Yüksek konsantrasyonlarda (%10 ve üzeri) kullanılan NaOCl (sodyum hipoklorit) miktarları gametoforlara zarar verdiği için, kültür gelişimlerinin başarıyla sonuçlanmasına neden olmaktadır. Denemelerde her üç türde de uygulanan farklı konsantrasyonlardaki NaOCl miktarında optimum yüzey sterilizasyon için %5 NaOCl ve bir damla tween 20 karışımının uygun olduğu belirlendi.

Araştırmada ilk denemelerimiz sterilizasyondan sonra *B. capillare* sporlarının *in vitro* kültürlerinin başlamasından 10-14 gün sonrasında protonemal fazın başlangıcıyla kloronema ve kaulonema oluşumları, 1-2 ay sonrasında sekonder protonema gelişerek ve gametofit oluşumu gözlenmiştir. Sporların kültür ortamında çimlenmesi 10 gün içerisinde başlamakta, protonema oluşumunun ilk evreleri ise 15 gün içerisinde gözlemlenebilmektedir. *In vitro* kültür başlangıcı ile ilgili olarak bizim gözlemlerimiz gibi bilgi veren başka bir literatüre rastlanmamıştır. *B. capillare*'nin spor ve gametofit *in vitro* doku kültürlerinde en iyi büyümenin gözlemlendiği ortam MS₃ (şeker (30 g/l), 2,4 D (0,5 mg/l), Kinetin (0,5 mg/l))'tür. Diğer ortam içerikleriyle büyüme karşılaştırıldığında yüksek kinetin miktarının büyümeyi inhibe ettiğini söyleyebiliriz. Yapılan araştırmada altkültür alma işleminin ne sıklıkla yapıldığı da önemlidir. Altkültür aralıkları ne kadar kısa tutulursa büyüme hızını pozitif olarak etkilemektedir (Rowntree 2006). Bizim çalışmamızda da benzer etki görülmüştür.

Sabovljević (2002)'de *B. capillare*'nin *in vitro* kültür çalışmasında olgun kapsüllerin yüzey sterilizasyonunda %8'lik çamaşır suyunda en iyi sonucu sağlamışken, bu çalışmada %5 ticari NaOCl ve 1 damla tween 20 ile başarılı sterilizasyon gözlemlendi. Ayrıca sadece 1 mg/l (2,4-D) ve 2 mg/l kinetin konsantrasyonları denenerek farklı konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicilerinin büyüme etkisi konusunda nicel gözlemler ve veriler yerine nitel değerlendirmeler yapılmıştır. Bizim çalışmamızda farklı konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicilerinin büyüme etkisi aylık olarak izlenmiş, büyüme çapları ölçülerek değerlendirilmiştir. Ayrıca MS ortamlarının farklı miktarlarda bitki büyüme düzenleyicisi içermeleri, şeker içerip içermeme durumuna göre ayrıca veriler değerlendirilmiştir. Bu araştırmacıdan farklı olarak örneklerin yüzey sterilizasyonunda %5 konsantrasyonda NaOCl ile başarılı sonuç elde edildi. Yine araştırmacının MS ortamını 2 mg/l kinetin bitki büyüme düzenleyicisi kullandığı denemelerinde protonemal fazda kaldığından bahsetmiştir. Bizim en iyi büyüme gerçekleştirdiğimiz MS₃ ortamında (%3 şeker, 0,5 mg/l kinetin

konsantrasyonunda) sekonder protonema oluşumları gözlemlenmiş ve gametofit evrenin gelişimine başarıyla geçilmiştir.

S. palustre gametofit *in vitro* doku kültürlerinde en iyi büyümenin gözlemlendiği ortam MS₁ (şekersiz, bitki büyüme düzenleyicisiz (2,4 D ve Kinetin))'tür. En iyi büyüme gözlemlenen ortamda bitki büyüme düzenleyicileri ve şekerin olmaması, MS tuzları ve içeriğinin gelişim için yeterli besin kaynağı olduğunu göstermektedir.

S. palustre L. *in vitro* kültür çalışması Sabovljević tarafından (2009)'da MS, ½MS ve şekersiz hormonsuz MS besin ortamı denemelerinde pH:6'ya ayarlanarak, 25±2°C sıcaklıkta ve 16/8 gün uzunluğu ve 47 µmol/m²/s fotoperiyodunda başarıyla kültürün gerçekleştirdiğinden bahsedilmiş fakat yayında detaylı bilgi ve istatistiksel veriye rastlanmamıştır (Sabovljević et al. 2009). Bizim yapmış olduğumuz denemelerde araştırmacıyla benzer şekilde ortam denemelerimizde en iyi büyüme şekersiz ve bitki büyüme düzenleyicisiz ortamlarda gerçekleştirilerek 1 ay içerisinde talluslu protonemalar gözlenmiş ve gametofit evreye geçerek *in vitro* kültür ortam içerisinde yığın oluşturmuştur. Kantitatif değerlerle büyüme verileri verilmiş ve 6 aylık veriler toplanmıştır.

T. alopecurum spor *in vitro* doku kültürlerinde en iyi büyümenin gözlemlendiği ortam MS₃ (şeker (30g/l), 2,4 D (0,5mg/l), Kinetin (0,5mg/l))'tür fakat diğer MS₁, MS₂, MS₄, MS₅, MS₆ MS₈ ortamlarında da istatistiksel olarak benzer şekilde iyi büyüme gözlenmiştir.

Thamnobryum alopecurum'un *in vitro* kültür çalışması Sabovljević tarafından (2012)'de 10 farklı besin ortamı (MS1, MS2, MS3,MS4,MS5, MS6, MS7, BCD1, BCD2, BCD3), ışık periyodu (16/8 ve 8/16), sıcaklık (18, 20, 25±2 C°) ve yüzey sterilizasyonu için 6 farklı NaOCl (3%, 5%, 7%, 10%, 13% ve 15% konsantrasyonlarda)ile 5 dk. muamele edilerek en iyi sterilizasyon %10'luk konsantrasyon, en iyi kültür ortamı MS7: MS mineral tuzları, bitki büyüme düzenleyicileri ile zenginleştirilmiş (0.1µM IBA ve 0.03µM BAP), 16/8 gündüz/karanlık ışık periyodu ve 20±2 C° elde etmiştir (Sabovljević et al. 2012). Bu çalışmada yüzey sterilizasyonunda % 10'luk NaOCl kullanılarak başarı sağlanırken çalışmamızda % 5'lik NaOCl konsantrasyonunda başarılı sonuç elde edilmiştir. Araştırmacının MS ortam içeriklerini oksin olarak 0.1µM IBA ve sitokinin olarak 0.03µM BAP ile zenginleştirirken çalışmamızda spor kültüründe oksin olarak 0,5 mg/l 2,4 D ve sitokinin olarak 0,5 mg/l kinetin, bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmış ve spor kültürlerinde başarılı sonuç elde

edilmiştir. Bunun yanı sıra araştırmacı gametofit kültürlerinde yaşamış olduğu kontaminasyon problemi dolayısıyla kültürlerini sporlardan başlatmış ve gelişen sporlardan oluşan gametofitlerin uç sürgünlerinden *in vitro* kültür yaparak başarılı sonuç elde etmiştir. Bizim çalışmamızda doğadan toplanan örneklerin gametofit uç sürgünleri yüzey sterilizasyonu başarıyla gerçekleştirilerek protonemal evre görülmeden bud sürgün oluşumu gerçekleşmiştir. Araştırmacı yine *in vitro* kültürlerde büyüme verileri nitel olarak değerlendirmesine rağmen bizim çalışmamızda kantitatif olarak büyüme çapları ölçülmüştür.

Schofield (1981)'de bir çok bryofit türünde iyi bir ortam sağlandığında sporların çimlenmesinin 7-30 gün sonrasında ortaya çıkmasından bahsetmektedir. Çalışmamızda *B. capillare* ve *T. alopecurum* spor kültüründe benzer şekilde spor çimlenmesi şekerli ortama göre şekerli ortamda daha hızlı (7-14 gün) gerçekleşti.

Glime (2007)'de yeterli miktarda kinetin benzeri bitki büyüme düzenleyicilerinin bulunmasının sürgün oluşumu veya ipliksi yapıdan meristemal büyüme geçişi sağladığından bahsetmiştir. Çalışmamızda kullandığımız farklı konsantrasyonlardaki kinetin *B. capillare* ve *T. alopecurum* spor kültüründe büyümelerinde protonemal evreden kaulonema ve kloronemaya sonra normal gametofiti meydana getirmede etkili olduğunu söyleyebiliriz. *S. palustre*'de ise bitki büyüme düzenleyicileri ve şeker bulunmayan ortamda (MS₁) başarılı büyüme elde edilmiştir. *B. capillare* ve *T. alopecurum* spor ve gametofit kültürleri doğadaki gelişim evrelerini gösterecek kadar kültür devam ettirilememiştir. *S. palustre*'de ise 6 aylık süre içerisinde doğadakine benzer olarak gametofit kültürü gelişim göstermiştir. Literatür taramasında her üç türün doğadaki büyüme parametreleri için (spordan → protonema → kloronema → kaulonema → gametofit gelişimi → sporofit gelişimi) büyüme sürelerine ilişkin bilgiye rastlanmamıştır. Bu nedenle normal doğadaki büyüme ile *in vitro* büyüme gerçek anlamda karşılaştırılamamıştır. Ancak *in vitro* kültürdeki büyüme parametreleri gametofit büyüme çapı olarak ölçülebilmıştır. Araştırmamızda 6 aylık süre sonunda *in vitro* kültürlerimizde her üç türde üretilen gametofitlerde yaprak ve gövde yapıları (fillid ve kaulid) meydana gelmiştir (Wyatt 1985).

Denemelerimizde yapmış olduğumuz 8 farklı MS ortamında 3 farklı konsantrasyonda kinetin (0,5, 1, 1,5 mg/l) ve kinetin olmadan ortamlar hazırlanmıştır. *B. capillare* ve *T. alopecurum in vitro* kültürlerinde en iyi büyüme 0,5 mg/l kinetini ortamda gerçekleştiğinden ve diğer ortamlarla karşılaştırmasını yaptığımızda düşük miktardaki kinetin konsantrasyonu büyümeyi

indüklediği, yüksek konsantrasyonlardaki kinetin miktarının ise büyüme hızını yavaşlattığını söyleyebiliriz. *S. palustre*'de ise şeker ve bitki büyüme düzenleyicileri ortama eklendiğinde büyümenin artmasına değil tam aksine büyümenin yavaş olmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Bryofitlerde *in vitro* kültür ortamlarında yetiştirilen örneklerde sekonder metabolit üretimini arttırmada şekerin elisitör etkisi (indükleyici veya inhibe edici) konusunda literatür taraması yapıldığında herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat yüksek bitkilerde Raei (2014)'te *Aloe vera* L. (Tıbbi sarımsabır)'nın *in vitro* kültürüne ve sekonder metabolit üretimine abiyotik elisitörlerin etkisi üzerine yaptığı çalışmada, ortamlara şeker eklendiğinde aloin miktarının arttığını ortaya koymuştur. Yaptığı deneylerde abiyotik elisitörlerin sekonder metabolit üretimini indüklediği göstermiştir (Raei et al. 2014). Bizim çalışmamıza bakıldığında elde ettiğimiz sonuçlara göre; *B. capillare*'nin *in vitro* spor ve gametofit kültürlerinde eşit miktardaki oksin ve sitokininin büyümede daha etkili olduğu belirlenmiştir. *S. palustre*'nin *in vitro* gametofit kültüründe oksin ve sitokininlerin büyüme de çok etkili olmadığı fakat karbon kaynağı olarak şekerin eklenmesi sekonder metabolitlerin üretiminde indükleyici etki gösterdiğini söyleyebiliriz. *T. alopecurum*'un *in vitro* spor kültürünün büyüme verilerine bakıldığında bütün ortamlarda büyüme gözlemlendiğinden oksin ve sitokininlerin yanı sıra şekerinde büyüme de etkili olduğunu, *in vitro* gametofit kültüründe ise yalnızca bitki büyüme düzenleyicisiz ve şekersiz ortamda büyüme gerçekleştiğinden oksinlerin, sitokininlerin ve şekerin etkisi konusunda net bir yorum yapılamamıştır.

Vasküler bitkilerde yapılan çalışmalara bakıldığında bir çok bitkinin antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir. Aynı metodu kullanarak almış olduğumuz sonuçlara bakıldığında gelecekte *B. capillare* antioksidan madde olarak kullanılması muhtemel türler arasındadır.

Araştırma bulgularına göre, *B. capillare*'nin yüksekantioksidan aktiviteye sahip olması, *S. palustre* ve *T. alopecurum* ise *B. capillare*'ye göre daha düşük miktarlarda antioksidan aktivitesi ekstraktlarında bulunan çok miktarda fenolik bileşiklerden kaynaklanabileceği gibi, yine antioksidan aktiviteye sahip ancak bu araştırma kapsamında olmayan bileşiklerin bulunmasından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Burdan çıkan sonuca göre *B. capillare*'nin yüksek serbest radikal giderme aktivitesi olduğu bilinen antioksidanlarla karşılaştırıldığında oldukça yüksek etkisiye sahip olduğunu söyleyebiliriz. Antioksidan ve

antionkojenik etkili olduğu bilinen askorbik asit gibi ilaç arge çalışmalarında ve gıda diyetlerinde kullanışlı olabileceği dűřünülmektedir (Geçkil 2012a).

Clarkeand Robinson (2008)'de bazı antartika karayosunlarının ekstrem habitatlarında yűksek ultraviyole tolerans mekanizmasına sahip olduđundan bahsetmiřtir. Bu savunma mekanizması UV-B ve kurumaya karřı benzer yollarla sađlandıđı dűřünülmektedir (Takács et al. 1999). *In vitro* kűltűrű yapılan *Atrichum undulatum*'un fotoperyot farklılıklarının antioksidan etkisi ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) metoduyla arařtırılarak uzun gűnde bulunan kűltűrlerin kısa gűne gűre daha yűksek oranda antioksidan ve total fenol içerdiđi belirlenmiřtir. Bizimde alıřmamızda da uyguladıđımız uzun gűn peryodu antioksidan etki ve total fenol içeriđi bakımından benzer etki gűstermiřtir (Cvetić et al. 2009).

Literatűrde, yűksek bitkilerde ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri ve fenolik bileřiklerinin kantitatif miktarlarının belirlenmesine yűnelik çalıřmalar yeterli sayıda olmasına rađmen bryofitlere iliřkin çalıřmalar yok denecek kadar azdır. Bryofitler, fenolik bileřikler bakımından çok çeřitli içeriđe sahip olmasına rađmen dűnyada bugűne kadar bryofitlerin sadece %10'u kimyasal olarak analiz edilmiřtir (Asakawa 2012). Fenolik bileřiklerin önemli birkısmı bitkiler tarafından řikimat metabolik yolu űzerinden sentezlenen aromatik ve alifatik sınırsız sayıda bileřiklerden meydana gelmektedir (Dey and Harborne 1989). Daha önce yapılmıř olan çalıřmalarda *B. capillare*'de flavon olan apigenin, luteolin ve izoflavon olan orobol, orobol tűrevleri, pratensein ve pratensein tűrevlerinin varlıđından bahsedilmiřtir. Ayrıca bařka bir çalıřmada *B. capillare*'de bir flavon olan diosmetin, 6-hydroxyluteolin ayrıca antosiyanin pigmentleri içerisinde açillenmiř asit olan malonik asit bulunduđunu belirtmiřtir (Anhut et al. 1984, Stein et al. 1985). Bizim alıřmamızda yukarıda belirtilen standartların dıřında farklı fenolik bileřikler kullanılarak kantitatif tayinleri yapılmıřtır.

Dođadan Kasım ve Mayıs (2012) aylarında toplanmıř taze örnekleri, farklı tarihlerde toplanmıř *B. capillare* ve *T. alopecurum* herbaryum örnekleri ile *in vitro* doku kűltűrű ile űretilen örnekler arasında 12 farklı fenolik bileřiđin (gallik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, taksifolin, rosmarinik asit, kaempferol, genistein, quercetin, biokanin A, daidzein, formononetin, řikimik asit) HPLC-UV ile kantitatif tayinleri sonucunda, tűrler arasında 12 farklı bileřikte en yűksek miktarı veren tűr *B. capillare*'dir. *B. capillare* spor kűltűrűnde en yűksek miktarda MS₄ ortamında řikimik asit (261,65±21,84 mg/g), gametofit kűltűrűnde en yűksek miktarda MS₆ ortamında řikimik asit (220,4±17,3 mg/g), herbaryum örneklerinde ise

en yüksek miktarda 9. ayda toplanan ekstraktlarında gallik asit ($1,20 \pm 0,4$ mg/g), *S. palustre* gametofit kültüründe en yüksek MS₄ ortamında şikimik asit ($251,88 \pm 88,3$ mg/g), *T. alopecurum* spor kültüründe en yüksek miktarda MS₈ ortamında şikimik asit ($120,92 \pm 41,4$ mg/g) gametofit kültüründe en yüksek miktarda MS₁ ortamında şikimik asit ($118,6 \pm 47,7$ mg/g), herbaryum örneklerinde ise en yüksek miktarda 4. ayda toplanan ekstraktlarında şikimik asit ($3,52 \pm 1,84$ mg/g) belirlendi.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre *in vitro* kültür ortamlarında kullanılan şekerin, 2,4 D'nin ve farklı konsantrasyonlardaki kinetin miktarının fenolik bileşik üretimini ne yönde etkilediğine bakıldığında; *B. capillare*'nin *in vitro* spor kültür ortamlarından şekersiz MS₁, MS₄ ve MS₆ ortamlarında kafeik asit üretiminin diğer ortamlara göre daha yüksek olduğunu, şeker, 0,5 mg/l 2,4 D ve 1,5 mg/l kinetin konsantrasyonundaki MS₇ ortamında, tıbbi olarak antikarsinojen etki gösteren genisteinin diğer ortamlara göre daha yüksek miktarda üretildiği görülmüştür. Bu fenolik bileşiğin üretimi düşünüldüğünde yüksek konsantrasyonda kullanılacak kinetin daha etkili olduğunu söyleyebiliriz. Doğadan toplanan taze örnekler ile *in vitro* spor kültür örneklerindeki şikimik asit miktarları karşılaştırıldığında *in vitro* spor kültür örneklerinde çok yüksek olduğu görülmektedir. Çok miktarda bu bileşiğin eldesi düşünüldüğünde *in vitro* spor kültür ortamlarından şekersiz MS₁, MS₄, MS₆ hazırlanması daha etkin üretimi sağlayabilecektir. Ayrıca şekersiz ortamlarında şikimit asit şekerli MS₃ ve şekersiz MS₄ ortamları karşılaştırıldığında, 12 farklı fenolik bileşiğinde MS₄ ortamında daha etkili şekilde üretildiğini söyleyebiliriz. *B. capillare*'nin *in vitro* gametofit kültür ortamları karşılaştırıldığında; yüksek miktarda şikimik asit şekersiz MS₄, MS₆ ve MS₈ ortamlarında görülmektedir. *B. capillare*'nin *in vitro* gametofit kültür ortamlarından şekerli MS₃ ve MS₄ karşılaştırıldığında 12 farklı fenolik bileşiğin şekerli MS₃ *in vitro* gametofit kültüründe olduğu görülmektedir. *In vitro* spor ve gametofit kültüründeki bu ters orantı, gelişimlerinde kullandıkları farklı kimyasal metabolik yollardan kaynaklanabileceği gibi ortamdaki şekerin elisitör olarak birinde 12 farklı fenolik bileşiğin üretiminde indükleyici etki gösterirken diğerinde inhibe edici etki göstermesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. *B. capillare*'nin *in vitro* gametofit kültür ortamlarından şekerli MS₃, MS₅ ve MS₇'de genistein, biokanın A ve formononetin miktarı şekersiz MS ortamlarına göre daha yüksek miktarda üretilmiştir. *S. palustre*'nin *in vitro* gametofit MS kültür ortamlarıyla ve doğadan toplanan taze örneklerindeki 12 farklı fenolik bileşiğin miktarları karşılaştırıldığında MS kültür ortamlarında daha yüksek olduğu görülmektedir. 8 farklı MS kültür ortamı kendi aralarında karşılaştırıldığında şekersiz MS₁, MS₄ ve MS₆ ortamlarında biokanın A, daidzein,

formononetin ve şikimik asit miktarlarının şekerli ortama göre çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu 4 fenoliğin üretimi söz konusu olduğunda şekersiz ortamların tercih edilmesi daha doğru olacaktır. *T. alopecurum*'un *in vitro* kültür örnekleriyle herbaryum örneklerindeki fenolik bileşikler karşılaştırıldığında, 8 farklı MS ortamında daha yüksek miktarda olduğu görülmektedir. *In vitro* kültür MS ortamları birbiriyle karşılaştırıldığında formononetin şekerli MS ortamlarında daha yüksek miktarda üretilmiştir. Bu fenolik bileşiğin eldesi düşünüldüğünde şekerli MS ortamlarının tercih edilmesini daha doğru olacağı görülmektedir. *In vitro* spor kültürlerinde şikimik asit miktarlarına bakıldığında her ortamda yüksek miktarda olduğu görülmektedir. Bunun nedeni, miktarlara bakıldığında kinetin konsantrasyonlarının lineer artışına benzemektedir. Yüksek konsantrasyonda kullanılan kinetin, şikimik asit üretimini etkin şekilde arttırdığı görülmektedir. *In vitro* gametofit kültüründe yalnız şekersiz ortamda büyüme gerçekleştiğinden farklı MS ortamlarıyla karşılaştırma yapılamamıştır.

Elde edilen sonuçlar göre bu üç tür etkin bir şekilde *in vitro* kültür ortamında üretilip ve fenolik bileşikler yönünden zengin oldukları, dikkate değer antioksidan aktiviteye de sahip oldukları saptandı.

Önemli bir isoflavonoid ve fitoöstrojen kabul edilen genisteinin varlığı bryofitlerin ne denli önemli fenolik bileşikler içerdiğinin kanıtıdır. Genisteinin düşük konsantrasyonlarda, östrojen reseptör etkileşimi yolu ile meme kanseri hücre proliferasyonunu uyardığı da gösterilmiştir (Hsieh et al. 1998, Chen and Wong 2004). Günümüzde kanser araştırmalarında sık kullanılan genistein (4,5,7-trihydroxyisoflavone) doğal olarak bulunan bir isoflavonoiddir. Antikarsinojenik etkiler olduğu rapor edilmiştir (Hsieh et al. 1998). Soya temelli beslenmenin bazı kanserlerin (meme, prostat, kolon) risklerini azaltabildiği rapor edilmiştir (Gescher et al. 1998). Denemelerimizde bu üç türdeki genistein varlığı ile ilgili bilgiler elde edilmiştir.

Bütün örneklerimizin HPLC-UV analizleri sonucunda elde edilen fenolik bileşik miktarları incelendiğinde doğadan toplandığı aydan normal kültür ortamında ki gelişim sürelerine bağlı olarak artma ve azalmalar gözlenmiştir. Örneğin şekersiz *in vitro* kültür ortamları ile şekerli *in vitro* kültür ortamlarında gelişen bitkilerden hazırlanmış ekstraktlarının şikimik asit miktarı karşılaştırıldığında şekeriz *in vitro* kültür ortamlarında yetişen bitkide daha yüksek olduğu görülmektedir. Kantitatif sonuçlara bakıldığında önem arz eden diğer bir sonuç doğadan toplanan örneklerin *in vitro* kültürü yapılan örnekler ile fenolik bileşik içerikleri

karşılaştırıldığında doğadan toplanan örneklerin çok az miktarda fenolik bileşik içerdiği *in vitro* kültür örneklerininse çok daha fazla miktarda fenolik bileşik içerdiği belirlenmiştir. Bu da gelişen bitkinin kültür ortamlarında şeker ve bitki büyüme düzenleyicilerinin olup olmamasına, doğada ise mevsimsel değişimlere bağlı olarak fenolik bileşiklerin bioyararlılıklarını pozitif yönde etkileyebileceği düşünülebilir. Kültür örnekleri arasında en çok miktarda bulunan şikimik asitin temel fenolik bileşik olduğunu söyleyebiliriz. Bu sekonder metabolitlerin *in vitro* kültürler ile bu türlerde üretilebileceği sonucuna da varabiliriz.

Mevcut yaptığımız çalışma ile bu üç türde *in vitro* kültür sonucunda başarılı bir şekilde üretim sağlanmıştır. *B. capillare* spor ve gametofit kültürü için MS₃, *S. palustre* gametofit kültürü için MS₁, *T. alopecurum* spor kültürü için MS₃ gametofit kültürü içinse MS₁'deki büyüme sonuçları bu bryofitlerin *in vitro* doku kültürü tekniğiyle yüksek ölçekte de üretilebilecekleri konusunda bize temel verileri sağlamıştır. Doğadan toplanan, herbaryum ve *in vitro* kültür örneklerinde *B. capillare* en iyi fenolik bileşik ürettiği belirlenen tür olmuştur. Bu özelliği antioksidan özelliğini de en iyi olduğu bilgisiyle desteklenmektedir. Kantitatif sonuçlara göre *in vitro* kültürler ile de bu fenolik bileşiklerin bryofitlerde üretilebileceği söylenebilir. Bryofitlerin bazı tümör hücrelerini baskılamada ve sağlık problemlerinin tedavisinde etkili olmasından dolayı, gelecekte ilaç sanayiinde kullanılması ve yapılacak bilimsel çalışmalara kaynak oluşturması açısından günden güne önem kazanmaktadır. Bu türlerin gelecekteki çalışmalarda ileri biyoteknolojik çalışmalarda kullanılacak türler arasında olacağı sonucunu bilim dünyasına sunabiliriz.

KAYNAKLAR

- Abay G** (2006) Bryofitlerin Kullanım Alanları, Ekolojik ve Ekonomik Önemi. *I. Uluslararası Odun Dışı Orman Ürünleri Sempozyumu, Bildiriler Kitabı*, 01-04 Kasım 2006, Trabzon, 258-265 s.
- Abay G** (2014) Bryodiversity of Turkey, Scientific and Technological Cooperation in The Field of Plant Diversity and Biotechnology between Turkey and Germany, *International Workshop*, 25-27 September, Artvin-Turkey, 15 pp.
- Abdille H, Singh R P, Jayaprakasha G K and Jena B S** (2005) Antioxidant Activity of The Extracts from *Dillenia Indica* Fruits. *Food Chem.*, 90: 891-896.
- Ak T** (2006) Curcuminin Antioksidan ve Antiradikal Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 98 s.
- Altuner E M** (2008) Bazı Karayosunu Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Türkiye, 323 s.
- Anhut S, Zinsmeister H D, Mues R, Barz W, Mackenbrock K, Köster J and Markham K R** (1984) The first identification of isoflavones from a bryophyte. *Phytochemistry*. 23: 1073.
- Asakawa Y** (1994) Highlights in Phytochemistry of Hepaticae Biologically Active Terpenoids and Aromatic Compounds. *Pure & Appl. Chem.*, 66 (10/11): 2193-2196.
- Asakawa Y** (2012) Liverworts-Potential Source of Medicinal Compounds Asakawa. *Med Aromat Plants*, 1: 3.
- Ashton N W, Cove D J and Featherstone D R** (1979a) The Isolation and Physiological Analysis of Mutants of The Moss, *Physcomitrella patens*, Which Over-Produce Gametophores. *Planta*, 144: 437-442.
- Ashton N W, Grimsley N H and Cove D J** (1979b) Analysis of Gametophytic Development in The Moss, *Physcomitrella patens*, Using Auxin and Cytokinin Resistant Mutants. *Planta*, 144: 427-435.
- Atherton I, Bosanquet S and Lawley M** (2010) Mosses and Liverworts of Britain and Ireland: *A Field Guide Published by the British Bryological Society*, 848 pp.
- Babaoğlu M, Gürel E ve Özcan S** (2001) *Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kültürü ve Uygulamaları*, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, 374 s.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Basile A, Sorbo, S, Giordano S, Lavitola A and Cobianchi C R** (1998c) Antibacterial Activity in *Pleurochaete squarrosa* Extract (Bryophyta). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 10: 169-172.
- Beike A K, Spagnuolo V, Lüth V, Steinhart F, Ramos-Gomez J, Krebs M, Adamo P, Rey-Asensio AI, Fernandez J A, Giordano S, Decker E L and Reski R** (2014) Clonal *in vitro* Propagation of Peat Mosses (*Sphagnum* L.) as Novel Green Resources for Basic and Applied Research. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Print ISSN: 0167-6857, 13 pp.
- Bendz G, Martensson O and Terenius L** (1962) Moss Pigments, The Anthocyanins of *Bryum cryophilum*. *Acta chem Scand*, 16: 1183.
- Bhattarai H D, Paudel B, Lee H K, Joung H and Yima H** (2009) *In vitro* Antioxidant Capacities of Two Benzonaphthoxanthones: Ohioensins F and G, Isolated from the Antarctic Moss *Polytrichastrum alpinum*. *Z. Naturforsch*, 64: 197–200.
- Bopp M** (1983) *Developmental Physiology of Bryophytes*, In: R. M. SCHUSTER (ed.): New manual of bryology. The Hattori Botanical Laboratory, Nichinan, Miyazaki-ken, Japan, 1: 276-324.
- Borbalán Á M A, Zorro L, Guillén D A and Barroso C G** (2003) Study of Polyphenol Content of Red and White Grape Varieties by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Relationship to Antioxidant Power, *Journal of Chromatography A*, 1012: 31-38.
- Brown D C W and Thorpe T A** (1995a) Crop Improvement Through Tissue Culture. *World J. Microb. Biotech.*, 11: 409-415.
- Brown P R and Grushka E** (1995b) *Advances in Chromatography*, Volume 35, ISBN: 0-8247-9361-7, Marcel Dekker Inc., New York, 218-220 pp.
- Butcher D N and Ingram D S** (1976) *Plant Tissue Culture*, London, Arnold, 69 pp.
- Cazes J** (2004) *Encyclopedia of Chromatography*, ISBN: 0-8247-2153-5, Marcel Dekker Inc., New York, 187 pp.
- Chang L C and Kinghorn A D** (2001) *Bioactive Compounds from Natural Sources*, In: C. Tringali (Ed.), Taylor & Francis, London, 159 pp.
- Chen W F and Wong M S** (2004) Genistein Enhances Insulin-Like Growth Factor Signaling Pathway in Human Breast Cancer (MCF-7) Cells. *J Clin Endocrinol Metab.*, 89 (5): 2351-2359.
- Chen Y Y, Lou Y X, Guo S L and Cao T** (2009) Successful Tissue Culture of The Medicinal Moss *Rhodobryum giganteum* and Factors Influencing Proliferation of Its Protonemata. *Annales Botanici Fennici*, 46 (6): 516-524.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Chobota V, Kubicova L, Nabbout S, Jahodar L and Hadacek F** (2008) Evaluation of Antioxidant Activity of Some Common Mosses. *Z. Naturforsch.*, 63: 476-482.
- Chopra R N and Kumar P K** (1988) *Biology of Bryophytes*, John Wiley & Sons, New York, Ny, 350 pp.
- Clarke L J and Robinson S A** (2008) Cell Wall-Bound Ultraviolet-Screening Compounds Explain The High Ultraviolet Tolerance of The Antarctic Moss, *Ceratodon purpureus*, *New Phytologist*, 179: 776–783.
- Cody V, Middleton E and Harborne J B** (1988) *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*, Vol.2, New York, 28 pp.
- Cove D J and Ashton N W** (1984) *The Hormonal Regulation of Gametophytic Development in Bryophytes*. In: A. F. Dyer and J. G. Duckett (eds.): *The experimental biology of bryophytes*, Academic Press, London, 177-201 pp.
- Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O and Dyatmiko W** (1997) Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fragraea blumei*, *Helvetica Chimica Acta*, 80: 1144-1152.
- Cvetić T, Sabovljević A, Pristov J B and Sabovljević M** (2009) Effects of day length on photosynthetic pigments and antioxidative metabolism of in vitro cultured moss *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. (Bryophyta) *Botanica serbica* 33 (1): 83-88.
- Debergh P C and Read P E** (1993) *Mikropropagation*. In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (eds.), *Mikropropagation–Technology and Application.*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Hollanda, 1-15 pp.
- Dey P M and Harborne J B** (1989) *Methods in Plant Biochemistry*, Vol.1, Academic Press, London, 552 pp.
- Di Cosmo F and Towers G H N** (1984) *Stress in Secondary Metabolism in Cultured Plant Cells*. Eds: (B.N. Timmermann, C. Steelink, F.A. Loewus) Recent advances in phytochemistry Phytochemical adaptations to stress. Plenum Press, New York U.S.A, 97-175 pp.
- Dodds J H and Roberts L W** (1985) *Experiments in Plant Tissue Culture*, sec. Edi. Cambridge Univ. Press Presented by Britain, 250 pp.
- Duckett G J, Burch J, Fletcher W P, Matcham W H, Read J D, Russell J A and Pressel S** (2004) *In Vitro* Cultivation of Bryophytes: A Review of Practicalities, Problems, Progress and Promise. *Journal of Bryology*, 26: 3–20.
- Duncan D B** (1955) Multiple Range and Multiple F-Tests. *Biometrics*, 11: 1-42.
- Ellnain-Wojtaszek M, Kruczynski Z and Kasprzak J** (2003) Investigation of The Free Radical Scavenging Activity of *Ginkgo Biloba* L. Leaves. *Fitoterapia*, 74: 1-6.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Endress P K** (1994) *Diversity and Evolutionary Biology of Tropical Flowers*, Cambridge University Press, ISBN 0521 420881, 420 pp.
- Erkoç Ş, Erkoç F ve Keskin N** (2003) Theoretical Investigation of Quercetin and Its Radical Isomers. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 631: 141-146.
- Ezer T** (2008) Güney Amanos Dağları (Musa Dağı) Biryofit Florası ve Epifitik Biryofit Vejetasyonunun Araştırılması, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 304 s.
- Fabre N, Rustan I, Hoffmann D E and Quetin-Leclercq J** (2001) Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12: 707-715.
- Fang Z, Zhang M and Wang L** (2007) HPLC-DAD-ESI-MS Analysis of Phenolic Compounds in Bayberries (*Myrica rubra* Sieb.et Zucc.). *Food Chemistry*, 100: 845-852.
- Farnsworth N R and Soejarto D D** (1985) Potential Consequence of Plant Extinction in The United States on The Current and Future Availability of Prescription Drugs. *Economic Botany*, 39: 231-240.
- Karim A F, Suleiman M, Rahmat A, Fadzelly M and Bakar A** (2014) Phytochemicals, Antioxidant and Antiproliferative Properties of Five Moss Species from Sabah. *Malaysia International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6 (10): 292-297.
- Gamborg O L, Miller R A and Ojima O** (1968) Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cell. *Exp. Cell Res.*, 50: 151-158.
- Gaspar T, Kevers C, Penei C, Greppin H, Reid D M and Thorpe T A** (1996) Plant Hormones and Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 32: 272-289.
- Geçkil H** (2012a) *Biyokimya I*, İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Malatya, 278 s.
- Geçkil H** (2012b) *Biyokimya II*, İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Malatya, 288 s.
- Hsiao G, Teng C M, Wu C L and Ko F N** (1996) Marchantin H as Natural Antioxidant and Free Radical Scavenger. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, 334 (1): 18-26.
- Gescher A, Pastorino U, Plummer S M and Manson M M** (1998) Suppression of Tumour Development by Substances Derived from The Diet-Mechanisms and Clinical Implications. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 45 (1): 1-12.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Glime J M** (2007) *Economic and Ethnic Uses of Bryophytes*, In Flora of North America Editorial Committee. Flora of North America North of Mexico. Vol. 27. Bryophyta, part 1. Oxford University Press, New York, 14-41 pp.
- Glime J** (2009) *Bryophyte Ecology*, Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. <<http://www.bryoecol.mtu.edu/>> (28.01.2015), 1250 pp.
- Goffinet B and Shaw A J** (2009) *Bryophyte Biology*, Second Edition, Cambridge University Press, The Edinburgh Building, Cambridge CB2 8RU, UK, 565 pp.
- González M L, Mallón R, Reinoso J and Rodríguez-Oubiña J** (2006) *In Vitro* Micropropagation and Long-Term Conservation of The Endangered Moss *Splachnum ampullaceum* Hedw., *Biol. Plant.*, 50: 339-345.
- Goode J A, Duckett J G and Stead A J** (1992a) Towards an Understanding of Developmental Interrelationships between Chloronema, Caulonema, Rhizoids and Plates in Mosses: A Comparative Study, *Cryptogamic Botany*, 3: 50–59.
- Goode J A, Duckett J G and Stead A J** (1992b) Morphogenesis of The Moss *Tetraphis pellucida* Hedw. in Culture and in The Wild. *Annals of Botany*, 70: 519–530.
- Günaydın B ve Çelebi H** (2003) Genel Anesteziklerin Serbest Radikaller ve Antioksidanlarla İlişkileri. *Anestezi Dergisi*, 11: 87-98.
- Gündüz T** (2001) *Enstrümental Analiz*, Gazi Büro Kitapevi, Ankara, 607 s.
- Gürel E ve Uçar-Türker A** (2001) Organogenez . In: Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S. (eds.) Bitki Biyoteknolojisi I - Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 36-70 s.
- Gürel E** (1997) *Plant Tissue Culture Techniques and Types of in vitro Development Occuring In Cultures*. Kızılırmak Fen Bilimleri Kongresi, Kırklareli Üniversitesi, 14-16 Mayıs 1997, 23-36 pp.
- Haberer G and Kieber J J** (2002) Cytokinins. New Insights into a Classic Phytohormone. *Plant Physiology*, 128: 354–362.
- Haberlandt G** (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen, Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-Naturwiss. Kl., Abt. J., 111: 69–92.
- Hahn H and Bopp M** (1968) A Cytokinin Test With High Specificity. *Planta*, 83: 115-118.
- Halliwell B and Gutteridge J M C** (1990) Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease. *Method Enzymol.*, 186: 1-80.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Harborne J B and Simmonds N W** (1964) *The Natural Distribution of the Phenolicaglicones*. In *Biochemistry of Phenolic Compounds*. Ed: J.B. Harborne. Academic Press, London and New York, 200 pp.
- Harris E S J** (2009) Phylogenetic and Environmental Lability of Flavonoids in A Medicinal Moss. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37: 180-192.
- Hartman H T and Kester D E** (1975) *Plant Propagation - Principles and Pratices*. Prentice-Hall. Inc., New Jersey, 662 pp.
- Hatanaka-Ernst M** (1966) Untersuchungen an Strahleninduzierten Protonemamutanten Von *Funaria hygrometrica*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 55: 259-277.
- Henderson D M** (1961) *Contribution to the Bryophyte Flora of Turkey: IV*. Notes from Royal Botanic Garden Edinburgh, 23: 263-278.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T and Kumasho T** (1994) Efficient Transformation of Rice (*Oryza sativa* L.) Mediated by Agrobacterium and Sequence Analysis of The Boundries of The T-DNA. *Plant J.*, 6: 271-282.
- Hildebrandt A C** (1958) Stimulation or Inhibition of Virus Infected and Insect Gall Tissues and Single Cell Clones. *Proc. Nat Acad.*, 44: 354-363.
- Holyoak D T and Pedersen N** (2007) Conflicting Molecular and Morphological Evidence of Evolution Within The Bryaceae (Bryopsida) and Its Implications For Generic Taxonomy. *J. Bryol.*, 29: 111-124.
- Hossain M A and Asad K** (1985) Monodehydroascorbate Reductase from Cucumber is a Flavin Adenine Dinucleotide Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 260 (24): 12920-12926.
- Hsieh C Y, Santell R C, Haslam S Z and Helferich W G** (1998) Estrogenic Effects of Genistein on The Growth of Estrogen Receptor-Positive Human Breast Cancer (MCF-7) Cells *In Vitro* And *In Vivo*. *Cancer Res.*, 58 (17): 3833-3838.
- Huang D, Ou B and Prior R L** (2005) The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841-1856.
- Hulme A C** (1971) *The Biochemistry of Fruits and Their Products*, Vol.2, A.R.C.Food Research Institute, Norwich, England, 172-205 pp.
- Ichikawa T, Yamada K, Namikawa M, Sakai K and Kondo K** (1984) New Cyclopentanol Fatty Acid from Japanese Mosses. *J. Hattory Bot. Lab.*, 56: 209.
- İlhan S, Savaroğlu F, Çolak F, Filik C ve Erdemgil F Z** (2006) Antimicrobial Activity of *Palustriella commutata* (Hedw.) Ochyra Extracts (Bryophyta). *Turk. J. Biol.*, 30: 149-152.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Jang G and Dolan L** (2011) Auxin Promotes The Transition from Chloronema to Caulonema in Moss Protonema by Positively Regulating PpRSL1 and PpRSL2 in *Physcomitrella patens*. *New Phytologist*, 192: 319-327.
- Johri M M and Desai S** (1973) Auxin Regulation of Caulonema Formation in Moss Protonema. *Nature*, 245: 223-224.
- Kļaviņa L, Bikovens O, Šteinberga I, Maksimova V and Eglīte L** (2012) Characterization of Chemical Composition of Some Bryophytes Common in Latvia. *Environmental and Experimental Biology*, 10: 27–34.
- Kowalczyk A, Przywara L and Kuta E** (1997) *In Vitro* Culture of Liverworts. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 39: 27–33.
- Kozłowski MA** (1921) *Compt. Rend.*, 173: 429.
- Kung S D and Wu R** (1993a) *Transgenic Plants*. Vol. 1. Engineering and Utilization. Academic Press, San Diego, CA, 383 pp.
- Kung S D and Wu R** (1993b) *Transgenic Plants*. Vol. 2. Present Status and Economic Impacts. Academic Press, San Diego, CA, 265 pp.
- Kurz W G W and Constabel F** (1979) Plant Cell Cultures, a Potential Source of Pharmaceuticals. *Adv. Apl. Microbiol.*, 25: 209-240.
- Lamb C J and Beachy R N** (1989) *Plant Gene Transfer*. In: Lamb, C.J., Beachy, R.N. (eds.), Proceedings of a UCLA Symposium, April 1-7, Wiley-Liss, New York, 275 pp.
- Lee J, Koo N ve Min DB** (2004) Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3: 21-33.
- Lehnert B and Bopp M** (1983) The Hormonal Regulation of Protonema Development in Mosses. I. Auxin-Cytokinin Interaction. *Z. Pflanzenphysiol.*, 110: 379-391.
- Lila M A** (2005) *Valuable Secondary Products from In Vitro Culture*, In: Plant Development and Biotechnology. Trigiano, R.N. and Gray, D. (eds), CRC Press, Oxford, U.K., 285-289 pp.
- Madhavi D L, Deshpande S S and Salunkhe D K** (1996) *Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives*. Markel Dekker, 471 pp.
- Maheswari N, Rajyalahsmi K, Baneja K, Dhir S K, Chowdry C N and Maheswari S C** (1995) *In Vitro* Culture of Wheat and Genetic Transformation. Retrospect and Prospect. *Critic. Rev. Plant Sci.*, 14 (2): 149-178.
- Miller C O, Skoog F, Okumura F S, Von Saltza M H and Strong F M** (1956) Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, A Substance Promoting Cell Division. *J. Am. Chem. Soc.*, 78: 1375–1380.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Molisch H** (1911) *Ber. Dt. Bot. Gcs.*, 29: 487.
- Monier M** (1990) Induction of Embriyogenesis in Callus Culture. In: Pollard, J.W., Walker, J.M. (eds.), *Plant Cell and Tissue Culture*, Humana Press, New Jersey, 141-148 pp.
- Montenegro G, Portaluppi M C, Salas F A and Díaz M F** (2009) Biological Properties Of The Chilean Native Moss *Sphagnum magellanicum*. *Biol Res.*, 42: 233-237.
- Muir W H, Hildebrandt A C and Riker A J** (1958) The Preparation, Isolation and Growth in Culture of Single Cells From Higher Plants. *Am. J. Bot.*, 45: 589-597.
- Murashige T and Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plantarum.*, 15: 473-497.
- Naczk M and Shahidi F** (2004) Extraction and Analysis of Phenolics in Food, *Journal of Chromatography A*, 1054: 95-111.
- Nobecourt P** (1939) Sur Les Radicelles Naissant Des Cultures De Tissus Vegetaux. *C.r. Seanc. Soc. Biol.*, 130: 1271-1272.
- Ören M** (2010) Batı Küre Dağları Briyofit Florası, Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 343 s.
- Özgen M, Ertunç F, Kınacı G, Yıldız M, Birsin M, Ulukan H, Emiroğlu H, Koyuncu N ve Sancak C** (2005) Tarım Teknolojilerinde Yeni Yaklaşımlar ve Uygulamalar: Bitki Biyoteknolojisi. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, Ankara, 1: 315-346.
- Pandey V K, Mishra R and Chandra R** (2014) *In Vitro* Culture of Moss *Bryum Coronatum* Schwaegr. (Bryaceae) and It's Phytochemical Analysis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (9): 307-311.
- Pejin B and Bogdanović-Pristov J** (2012) ABTS Cation Scavenging Activity and Total Phenolic Content of Three Moss Species. *Hem. Ind.*, 66 (5): 723-726.
- Pejin B and Bogdanović-Pristov J, Pejin I and Sabovljević M** (2013) Potential Antioxidant Activity of The Moss *Bryum moravicum*. *Natural Product Research*, 27 (10): 900-902.
- Pejin B, Savic A, Kien-Thai Y and Mojovic M** (2014) Further *In Vitro* Evaluation of Antiradical Activity of the Moss *Rhodobryum ontariense* Tea Using EPR and Fluorescence Spectroscopy. *Cryptogamie, Bryologie*, 35 (2): 173-179.
- Pierik R L M** (1993) *Mikropropagation: Technology and Opportunities*. In: Prakash J., Pierik, R.L.M. (eds.), *Plant Biotechnology. Commercial Prospects and Problems.*, Intercept Ltd., UK., 9 pp.
- Pietta P G** (2000) Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63: 1035-1042.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Pietta P and Gardana C** (2003) *Flavonoids in Herbs, in Flavonoids in Health and Disease*, 2nd Ed. Revised and Expanded, Eds., New York, 49-69 pp.
- Plochmann K, Korte G, Koutsilieri E, Richling E, Riederer P, Rethwilm A, Schreier P and Scheller C** (2007) Structure–Activity Relationships of Flavonoid-Induced Cytotoxicity on Human Leukemia Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 460 (1): 1-9.
- Preece J E and Sutter E G** (1993) Acclimatization of Micropropagated Plants to The Greenhouse and Field. In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (eds.), *Micropropagation Technology and Application*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 71-95 pp.
- Principe P** (1989) *The Economic Significance of Plants and their Constituents as Drugs*, in H.Wagner, H.Hikino and N.Farnsworth, *Economic and Medicinal Plant Research*, Vol.3, London: Academic Press, 1-17 pp.
- Prior R L, Wu X and Schaich K** (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302.
- Ramachandra R S and Ravishankar G A** (2002) Plant Cell Cultures: Chemical Factories of Secondary Metabolites. *Biotechnol. Adv.*, 20: 101-153.
- Raei M, Angaji S A, Omid M and Khodayari M** (2014) Effect of abiotic elicitors on tissue culture of Aloe vera. *International Journal of Biosciences*, 5 (1): 74-81.
- Raven P H and Johnson G B** (2001) *Biology Book, Evolutionary History of Plants*, Chapter 37, McGraw-Hill, 739 pp.
- Razdan M K** (2003) *Introduction to Plant Tissue Culture*. Science Publishers, India, 375 pp.
- Rice-Evans C and Packer L** (1998) *Flavonoids in Health and Disease*, Marcel-Dekker, New York, 179-197 pp.
- Richardson D H S** (1981) *The Biology of Mosses*. Oxford, London, Edinburgh: Blackwell Sci. Publ., 220 pp.
- Rowntree J K** (2006) Development of Novel Methods for The Initiation of *In Vitro* Bryophyte Cultures for Conservation. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 87: 191-201.
- Sabovljević A, Sokovic M, Sabovljević M and Grubisic D** (2006) Antimicrobial Activity of *Bryum argenteum*. *Fitoterapia*, 77: 144-145.
- Sabovljević A, Sabovljević M and Jockovic N** (2009) *In Vitro* Culture and Secondary Metabolite Isolation in Bryophytes. *Methods in Molecular Biology*, 547: 117-128.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Sabovljević A, Sabovljević M and Grubišić D** (2010c) Gibberellin Influence on The Morphogenesis of The Moss *Bryum Argenteum* Hedw. In *In Vitro* Conditions. *Arch. Biol. Sci.*, 62 (2): 373-380.
- Sabovljević A, Vujičić M, Skorić M, Bajić-Ljubičić J and Sabovljević M** (2012) Axenically Culturing The Bryophytes: Establishment And Propagation of The Pleurocarpous Moss *Thamnobryum alopecurum* Nieuwland Ex Gangulee (Bryophyta, Neckeraceae) In in vitro Conditions. *Pak. J. Bot.*, 44 (1): 339-344.
- Sabovljević M, Bijelovic A and Draglcevic I** (2002) Effective And Easy Way of Establishing In Vitro Culture of Mosses, *Bryum argenteum* Hedw. and *Bryum capillare* Hedw. (Bryaceae). *Arch. Bioi. Sci.*, 54 (1-2): 7-8.
- Sabovljević M, Sabovljević A and Dragicevic I** (2003) *In Vitro* Culture of Mosses: *Aloina aloides*, *Brachythecium velutinum*, *Ceratodon purpureus*, *Eurhynchium praelongum*, *Grimmia pulvinara*. *Turk. Journ. Bot.*, 27: 441-446.
- Sahu V and Asthana A K** (2013) An Observation on Growth Response of *Anomobryum filiforme* var. *concinatum* (Spruce) Aman. (Bryaceae) in Different Culture Media. *Natl. Acad. Sci. Lett.*, 36 (6): 587-589.
- Saxena D K and Harinder G** (2004) Uses of Bryophytes. *Resonance*, 56-65 pp.
- Scher M J, Speakman J B, Zapp J and Becker H** (2004) Bioactivity Guided Isolation of Antifungal Compounds from The Liverwort *Bazzania trilobata* (L.) S.F. *Gray Phytochemistry*, 65: 2583-2588.
- Schofield W B** (1981) Ecological Significance of Morphological Characters in The Moss Gametophyte. *Bryologist*, 84: 149-165.
- Servettaz C** (1913) Reserches Experimentales Sur Le Development Et La Nutrition Des Mousses En Milieux Sterilise. *Ann. Sci. Nat., Bot. Biol. Veg.*, 17: 111-223.
- Sharma A, Slathia S, Gupta D, Sikander N H, Choudhary P, Langer A and Bhardwaj R** (2014) Antifungal and Antioxidant Profile of Ethnomedicinally Important Liverworts (*Pellia endivaefolia* and *Plagiochasma appendiculatum*) Used by Indigenous Tribes of District Reasi North West Himalayas Proc. *Natl. Acad. Sci.*, India, 10 pp.
- Sies H** (1991) Oxidative Stress from Basic Research to Clinical Application. *Am. J. Med.*, 9: 31-37.
- Singleton V L and Rossi J A** (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Singleton V L, Orthofer R and Lamuela-Raventos R M** (1999) Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
- Skoog F** (1944) Growth and Organ Formation in Tobacco Tissue Cultures. *Am. J. Bot.*, 31: 19-24.
- Skoog F and Tsui C** (1948) Chemical Control of Growth and Bud Formation in Tobacco Stem Segments and Callus Cultured *in Vitro*. *Am. J. Bot.*, 35: 782-787.
- Skoog D A and Leary J** (1992) *Principles of Instrumental Analysis*, fourth edition, Saunders College Publishing, Orlando, Florida, 102 pp.
- Skoog D A, James Holler F and Nieman T A** (1998) *Principles of Instrumental Analysis*, Fifth Edition, Kılıç E., Köseoğlu F. ve Yılmaz H., Saunders College Publishing, US, Bilim Yayıncılık, Ankara, 102 pp.
- Smith A J E** (2004) *The Moss Flora of Britain and Ireland*. Second Edition, ISBN: 0-521-81640-8, Cambridge Univ. Press, 1012 pp.
- Snedecor G W and Cochran W G** (1967) *Statistical Methods*, 6th ed. Ames, I. A., The Iowa State University Press.
- Snyder L R, Kirkland J J and Dolan J W** (2010) *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Third Edition, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, Hoboken, New Jersey, 39 pp.
- Spence J R** (1996) *Rosulabryum* Genus Novum (Bryaceae). *Bryologist*, 99: 221-225.
- Stein W, Anhut S, Zinsmeister H D and Mues R** (1985) New Flavone Glucoside Malonylestere from *Bryum capillare* Wolfgang Stein, Siegbert Anhut, H. Dietmar Zinsmeister, Rüdiger Mues. *Z. Naturforsch.*, 40: 469-473.
- Steward F C, Mapes M O and Mears K** (1958) Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cell. *Am. J. Bot.*, 45: 705-708.
- Storz G and Imlay J A** (1999) Oxidative Stress. *Current Opinion in Microbiology*, 2 (2): 188-194.
- Street H E** (1977) Cell (Suspension) *Cultures Techniques*. In: *Plant Tissue and Cell Culture*, 2nd ed., H. E. Street, Oxford, Blackwell Scientific Publications., 61-102 pp.
- Suschetet M, Siess M H, Le Bon A M and Canivenc Lavier M C** (1998) In: *INRA (Ed.), Polyphenols 96*, Les Colloques, Paris, 166-204 pp.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Takács Z, Csintalan Z, Sass L, Laitat E, Vass I and Tuba Z** (1999) UV-B Tolerance of Bryophyte Species with Different Degrees of Desiccation Tolerance. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, 48: 210-215.
- Tsimogiannis D I and Oreopoulou V** (2006) The Contribution of Flavonoid C-Ring on The DPPH Free Radical Scavenging Efficiency. A Kinetic Approach for The 3',4'-Hydroxy Substituted Members. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7: 140-146.
- Tunalier Z, Öztürk N, Koşar M, Başer K H C, Duman H ve Kırimer N** (2002) Bazı Sideritis Türlerinin Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir, Eds., 130-138 s.
- Ulusoy E** (2010) *Anzer Balı ve Poleninin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Fenolik Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan Özellikleri*, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 143 s.
- Ulusoy E, Kolaylı S ve Sarıkaya A O** (2010) Antioxidant and Antimicrobial Activity of Different Floral Origin Honeys from Türkiye. *Journal of Food Biochemistry*, 34 (1): 321-335.
- Uyar G, Ören M, Yıldırım Y ve İnce M** (2007a) Mosses as Indicators of Atmospheric Heavy Metal Deposition Around a Coal-Fired Power Plant in Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin.*, 16: 182-192.
- Uyar G, Ören M ve İnce M** (2007b) Atmospheric Heavy Metal Deposition in Düzce Province by Using Mosses As Biomonitors. *Fresenius Environmental Bulletin.*, 16: 145-153.
- Uyar G, Ören M, Yıldırım Y ve Öncel S** (2008) Biomonitoring of Metal Deposition in the Vicinity of Ereğli Steel Plant in Turkey. *Environmental Forensics*, 9: 350-363.
- Uyar G, Avcı E, Ören M, Karaca F ve Öncel M S** (2009) Determination of Heavy Metal Pollution in Zonguldak (Turkey) by Moss Analysis (*Hypnum cupressiforme*). *Environmental Engineering Science*, 26 (1): 183-194.
- Vanderpoorten A and Goffinet B** (2009) *Introduction to Bryophyte Biology*. Cambridge University Press. Cambridge, UK., 303 pp.
- Voth P D and Hammer K C** (1940) Responses of *Marchantia polymorpha* to Nutrient Supply and Photoperiod. *Botanical Gazette*, 102 (1): 169-205.
- Voth P D** (1941) Gemmae-Cup Production in *Marchantia polymorpha* and Its Response to Calcium Deficiency and Supply of Other Nutrients. *Botanical Gazette*, 103 (2): 310-325.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Voth P D** (1943) Effects of Nutrient-Solution Concentration on The Growth of *Marchantia polymorpha*. *Ibid*, 104: 591-601.
- Voth P D** (1945): Effect of Algastatic Agents on Marchantia . *Botanical Gazette*, 106 (4): 472-483.
- Wang C K and Lee W H** (1996) *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44 pp.
- Wang M and Ha Y** (2007) An Electrochemical Approach to Monitor pH Change in Agar Media During Plant Tissue Culture. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 2718-2723.
- Werbrouck S P O and Debergh P C** (1994) *Applied Aspects of Plant Regeneration (Mikropropagation)*. In: Dixon, R.A., Gonzales, R.A. (eds.) *Plant Cell Culture–A Pratical Approach*, Oxford Uni. Press., New York, 127-135 pp.
- White P R** (1934) Potentially Unlimited Growth of Excised Tomato Root Tips in A Liquid Medium. *Plant Physiol.*, 9: 585-600.
- White P R** (1939) Controlled Differentiation in A Plant Tissue Culture. *Bull. Torrey Bot. Club*, 66: 507-513.
- Winston G W** (1991) Oxidant and Antioxidants, in Aquatic Animals. *Comp. Biochem. Phys.*, 100: 173-176.
- Wu Q, Wang M and Simon J E** (2004) Analytical Methods to Determine Phytoestrogenic Compounds. *Journal of Chromatography B*, 812: 325-355.
- Wyatt R** (1985) Chemosystematics of the Mniaceae. I. Identities of Lowry's species pairs. *Monographs in Systematic Botany. Missouri Botanical Garden*, 11: 187–194.
- Xie C F and Lou H X** (2009) Secondary Metabolites in Bryophytes: An Ecological Aspect. *Chemistry & Biodiversity*, 6: 303-312.
- Yağcı C, Toker M C and Toker G** (2008) Bitki Doku Kültürü Yoluyla Üretilen Flavonoidler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 1 (1): 47-58.
- Yen G C and Duh P D** (1994) Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 629-32.
- URL-1** (<http://www.sciencemuseum.org.uk>) Erişim Tarihi: 28.01.2015.
- URL-2** (<http://www.tropicos.org/>) Erişim Tarihi: 28.01.2015.
- URL-3** (<http://blogs.ubc.ca>) Erişim Tarihi: 28.01.2015.
- URL-4** (<http://herbarium.beun.edu.tr>) Erişim Tarihi: 28.01.2015.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Bursa'nın Karacabey ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Karacabey'de tamamladı. 1999-2002 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Bilgisayar Donanımı önlisans bölümünü, 2003-2008 yılları arasında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimini ve 2008-2010 yılları arasında yine aynı üniversitede Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamladı. 2010 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. Halen aynı üniversitede Yabancı Diller Yüksekokulu İncirharmanı Kampüsü Bilgi İşlem Servisinde sistem sorumlusu olarak çalışmaktadır.

ADRES BİLGİLERİ

Adres : Sırabademler Mah. 14 Eylül Cad. No: 179
16700 Karacabey/BURSA

Tel : (372) 26658 85 / 143

Cep : (536) 455 21 32

E-posta : yasin_hzr@hotmail.com