

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ROZMARİNİK ASİT'İN *Satureja hortensis* L. KALLUS
KÜLTÜRLERİNDE ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU**

Bektaş TEPE

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. Atalay SÖKMEN**

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu çalışma, jürimiz tarafından, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	Prof. Dr. M. Ali AKPINAR	
.....		
Üye	Prof. Dr. Ekrem GÜREL
Üye	Prof. Dr. Atalay SÖKMEN
Üye	Prof. Dr. Fikretin ŞAHİN
Üye	Doç. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen Öğretim Üyeleri'ne ait olduğunu onaylarım.

21/04/ 2006

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Prof. Dr. Halil GÜRİSOY

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 05 / 01 / 1984 tarihli toplantısında kabul edilen ve daha sonra 30 / 12 / 1993 tarihinde C. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'nce hazırlanan ve yayınlanan "Yüksek Lisans ve Doktora Tez Yazım Kılavuzu" adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Özet	iii
Summary	v
Teşekkür	vii
Şekiller Dizini	viii
Tablolar Dizini	xi
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL ve METOD	10
2.1. Tohumların Toplanması	10
2.2. Kallus Kültürlerinin Başlatılması	10
2.3. Kültürlerin Sürdürülmesi	13
2.4. Kullanılan Besi Ortamı Parametreleri	13
2.4.1. IBA/6-BA Birleşimleri	13
2.4.2. Karbon Kaynağı Değişimleri	14
2.5. Farklı Ortamlarda Büyütülen Kallus Kültürlerinde Büyüme Kinetiklerinin Hesaplanması	15
2.6. Kültürlerde Su İçeriğinin Hesaplanması	16
2.7. Kallus Kültürlerinde Rozmarinik Asit Tayini	16
2.7.1. Spektrofotometrik Rozmarinik Asit Tayini	16
2.7.2. HPLC ile Rozmarinik Asit Tayini	17
2.8. Verilerin Değerlendirilmesi	17
3. BULGULAR	19
3.1. IBA/6-BA Birleşimlerinin Büyüme, Su İçerikleri (%) ve Rozmarinik Asit Birikimi Üzerine Etkileri	20
Uygulama 1	20
Uygulama 2	22
Uygulama 3	24
Uygulama 4	26
Uygulama 5	28
Uygulama 6	31

Uygulama 7	33
Uygulama 8	36
Uygulama 9	38
Uygulama 10	40
Uygulama 11	42
Uygulama 12	44
Uygulama 13	47
Uygulama 14	49
3.2. Farklı Sukroz Derişimlerinin Büyüme, Su İçeriği (%) ve Rozmarinik Asit Birikimi Üzerine Etkileri	51
Uygulama 15	51
Uygulama 16	53
Uygulama 17	55
Uygulama 18	57
Uygulama 19	59
3.3. Uygulamalardan elde edilen yaş ve kuru biyokütle ile rozmarinik asit birikiminin karşılaştırmalı analizi	61
3.3.1. Farklı IBA/6-BA birleşimlerinin yaş ve kuru biyokütle ile rozmarinik asit birikimi üzerine etkileri	61
3.3.2. Farklı sukroz derişimlerinin yaş ve kuru biyokütle ile rozmarinik asit birikimi üzerine etkileri	65
3.4. <i>S. hortensis</i> bitkisinden elde edilen rozmarinik asit miktarı	70
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	72
Sonuç ve Öneriler	88
5. KAYNAKLAR	90
6. EKLER	101
Ek-1. <i>S. hortensis</i> MeOH özütünün HPLC kromatogramı	102
Ek-2. Uygulama 17'nin HPLC kromatogramı	103
Ek-3. 50 µg/ml düzeyinde standart rozmarinik asit çözeltisinin HPLC kromatogramı	104
7. ÖZGEÇMİŞ	105

ÖZET
DOKTORA TEZİ

**ROZMARİNİK ASİT'İN *Satureja hortensis* L.
KALLUS KÜLTÜRLERİNDE ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU**

Bektaş TEPE
Cumhuriyet Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman
Prof. Dr. Atalay SÖKMEN

Bu çalışmada, olgun *Satureja hortensis* L. (sater, anık) tohumlarından başlatılan kallus kültürlerinde, ekonomik önem taşıyan ve bir fenolik asit olan rozmarinik asit'in üretimi ve optimizasyonu araştırıldı. Kallus kültürlerinin başlatılması ve sürdürülmesinde indol bütirik asit (IBA) (1.00 ppm), 6-benzil aminopürin (6-BA) (1.00 ppm) ve sukroz (% 2.5 w/v) ile desteklenen Gamborg'un B5 temel besi ortamı kullanıldı. Kültürlerle yapılan ön çalışmalarda, yukarıda bahsedilen ortam dışında, diğer bitki büyüme düzenleyicisi birleşimleri ile farklı karbon kaynakları gerek büyüme ve gerekse toplam fenolik birikimi açısından beklenen verimi sağlamadı. Bu nedenle farklı IBA/6-BA birleşimleri ile farklı sukroz derişimlerini içeren uygulamalara geçildi. Tüm uygulamalar sürekli karanlık ortamda yapıldı. IBA/6-BA birleşimlerinin büyüme ve rozmarinik asit birikimi üzerine etkilerinin araştırıldığı uygulamalarda (1-15. uygulamalar), en yüksek yaş biyokütle verimi 1.00 ppm IBA ve 5.00 ppm 6-BA'nın kullanıldığı uygulamadan elde edildi. En düşük verim ise 10.00 ppm IBA ve 1.00 ppm 6-BA'nın kullanıldığı uygulamadan elde edildi.

Bu uygulamalardan elde edilen yaş ve kuru kütle verimleri değerlendirildiğinde, kültür ortamında büyümede asıl belirleyici etkenin 6-BA derişimindeki artışın olduğu anlaşıldı. Ancak bu artışın belirli bir noktaya kadar biyokütle artışını desteklediği ve bu noktadan sonra verimin tekrar düşüşe geçtiği belirlendi.

Rozmarinik asit birikimi esas alındığında ise, büyüme ve rozmarinik asit üretimi arasında zıt bir ilişki olduğu belirlendi. En yüksek biyokütle verimi 1.00 ppm IBA ve 5.00 ppm 6-BA'nın yer aldığı uygulamadan elde edilmesine rağmen, en yüksek rozmarinik asit birikimi 1.00 ppm IBA ve 1.00 ppm 6-BA'nın ile desteklenen uygulamadan sağlandı. Bu uygulama aynı zamanda standart ya da kaynak kültürüdür.

Sukroz derişimlerinin büyüme ve rozmarinik asit birikimi üzerine etkilerinin araştırıldığı uygulamalarda en yüksek yaş biyokütle kütle verimi % 4.0 (w/v) sukroz bulunan uygulamadan elde edildi. En düşük verim ise % 1.0 (w/v) sukroz bulunan uygulamadan elde edildi. Bu kısımda büyüme üzerindeki belirleyici etkenin sukroz derişimindeki artış olduğu, ancak % 4.0 (w/v)'den daha yüksek derişimlerin büyümeyi olumsuz etkilediği belirlendi.

Bu kısımda en yüksek rozmarinik asit birikimi % 3.0 (w/v) sukroz bulunan uygulamadan elde edildi. Yabani *S. hortensis* bitkisi ile yapılan çalışmalar sonucunda 25.02 ± 1.21 mg/g rozmarinik asit tespit edildi. HPLC analizleri sonucunda elde edilen veriler, spektrofotometrik veriler ile yüksek oranda tutarlılık gösterdi.

Tüm uygulamalarda su içeriğinin (hiperhidrisite) yüksek olduğu belirlendi. Ancak, yalnızca yüksek sukroz derişimleri kullanılan uygulamalarda su içeriğinde bir azalma gözlemlendi.

Çalışma süresince, kallusların hiçbirisinde farklılaşma gözlenmedi.

Sonuç olarak, *S. hortensis* kallus kültürleri ile hem yeterli biyokütle verimi hem de yüksek rozmarinik asit üretimi için en ideal ortamın 1.00 ppm IBA, 1.00 ppm 6-BA ve karbon kaynağı olarak % 3.0 sukroz bulunan Gamborg'un B5 besi ortamı olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Satureja hortensis* L., Rozmarinik asit, Kallus, HPLC, İndol bütirik asit, 6-Benzil adenin, Sukroz.

SUMMARY**Ph.D.****PRODUCTION AND OPTIMIZATION OF THE
ROSMARINIC ACID BY *Satureja hortensis* L. CALLUS CULTURES****Bektaş TEPE****Cumhuriyet University****Graduate School of Natural and****Applied Sciences****Department of Biology****Supervisor****Prof. Dr. Atalay SÖKMEN**

In this study, production and optimization of rosmarinic acid, a phenolic acid and an economically important metabolite, was investigated in the callus cultures established from the mature seeds of *Satureja hortensis* L. (summer savory) plant. Gamborg's B5 basal medium, supplemented with indol butyric acid (IBA) (1.00 ppm), N⁶ benzyl aminopurine (6-BA) (1.00 ppm) and sucrose (% 2.5 w/v), was employed for the establishment and maintenance of the callus cultures. In the preliminary experiments carried out with proformed calli, neither biomass yield nor total phenolics accumulation was much lower than expected, except for the aforesaid culture medium. Therefore, applications were individually prepared by preferring the media containing different IBA/6-BA combinations and sucrose concentrations. All applications were carried out in the continuous dark room. In the applications, where the effects of IBA/6-BA combinations on the growth and rosmarinic acid accumulation were assayed (1-15. applications), the highest biomass yield was obtained from the medium supplemented with 1.00 ppm IBA and 5.00 ppm 6-BA. The lowest yield was, on the other hand, determined in the application containing 10.00 ppm IBA and 1.00 ppm 6-BA.

When the fresh and dry biomass yields obtained from these applications were evaluated it was understood that the major determinative factor on the growth is the

increased 6-BA concentration. However, this increase was supported at a precise point where the 6-BA concentration was 5.00 ppm and then the yield has become gradually decreased.

In the case of the rosmarinic acid accumulation, an opposite relationship was determined between the growth and rosmarinic acid production. While the highest biomass yield was obtained from the medium containing 1.00 ppm IBA and 5.00 ppm 6-BA, the highest rosmarinic acid accumulation was obtained from the medium with 1.00 ppm IBA and 1.00 ppm 6-BA. At the same time, this application was employed as standart (seed) culture.

In the applications where the effects of sucrose concentrations on the growth and rosmarinic acid accumulation were examined, the highest biomass yield was obtained from the medium which was supplemented with 4.0% (w/v) sucrose. The lowest yield, however, was obtained from the medium containing 1.0% (w/v) sucrose. For this category, it can be concluded that the determinative factor on the growth was the increased concentration of sucrose, but higher concentrations (i.e. 4.0% and onwards) were also found to have negative effect on the growth.

In this category, the highest rosmarinic acid accumulation was obtained from the medium which was supplemented with 3.0% (w/v) sucrose. According to the experiments carried out with the wild *S. hortensis*, it is found to have 25.02 ± 1.21 mg/g rosmarinic acid. Results obtained from the HPLC analysis showed a strong correlation with the data revealed from spectrophotometric assays.

In the all applications calli were found to be hyperhydric and, therefore, it can be said that none of applications employed in this study was capable of reducing the hyperhydricity in the cultures.

No differentiation was observed in any callus during the course of this study.

In conclusion, Gamborg's basal medium (B5) supplemented with 1.00 ppm IBA, 1.00 ppm 6-BA and sucrose as carbon source 3.0% (w/v) can be suggested as the most appropriate medium for both sufficient biomass and higher rosmarinic acid production.

Key Words: *Satureja hortensis* L., Rosmarinic acid, Callus, HPLC, Indol butyric acid, N⁶ benzyl amino purine, Sucrose.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın sürdürülmesi konusunda yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Atalay SÖKMEN'e teşekkürlerimi sunarım. Zorlu doktora dönemi boyunca gülümseyen yüzünü ve manevi desteğini esirgemeyen değerli eşim Arzuhan ŞİHOĞLU-TEPE'ye ve zorlu ve yorucu günlerin akşamlarında tüm sıkıntı ve kederlerimi mutluluk kıvılcımlarına dönüştüren canım kızım Miray Ecehan TEPE'ye minnet ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca tezin hazırlanması aşamasında verdikleri teknik destekten dolayı Biyoloji Bölümü Yüksek Lisans Öğrencileri Sayın Enes AYDIN ve Sayın Önder YUMRUTAŞ'a teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Fenolik bileşiklerin halkasal yapısı	1
Şekil 1.2. Fenolik bileşiklerin biyosentez yolları	2
Şekil 1.3. Fenilalaninden başlayan fenolik biyosentezinin şematik görünümü	2
Şekil 1.4. Rozmarinik asit ve bazı türevlerinin kimyasal yapıları	4
Şekil 1.5. <i>Satureja hortensis</i> L. bitkisinin görünümü	8
Şekil 3.1. Uygulama 1’de büyüme eğrisi	21
Şekil 3.2. Uygulama 1’de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	22
Şekil 3.3. Uygulama 2’de büyüme eğrisi	23
Şekil 3.4. Uygulama 2’de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	23
Şekil 3.5. Uygulama 3’de büyüme eğrisi	26
Şekil 3.6. Uygulama 3’de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	26
Şekil 3.7. Uygulama 4’de büyüme eğrisi	28
Şekil 3.8. Uygulama 4’te kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	28
Şekil 3.9. Uygulama 5’te büyüme eğrisi	30
Şekil 3.10. Uygulama 5’te kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	31
Şekil 3.11. Uygulama 6’da büyüme eğrisi	32
Şekil 3.12. Uygulama 6’te kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	33
Şekil 3.13. Uygulama 7’de büyüme eğrisi	35
Şekil 3.14. Uygulama 7’de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	36
Şekil 3.15. Uygulama 8’de büyüme eğrisi	37
Şekil 3.16. Uygulama 8’de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	38

Şekil 3.17. Uygulama 9’da büyüme eğrisi	39
Şekil 3.18. Uygulama 9’da kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	39
Şekil 3.19. Uygulama 10’da büyüme eğrisi	41
Şekil 3.20. Uygulama 10’da kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	42
Şekil 3.21. Uygulama 11’de büyüme eğrisi	44
Şekil 3.22. Uygulama 11’de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	44
Şekil 3.23. Uygulama 12’de büyüme eğrisi	46
Şekil 3.24. Uygulama 12’de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	46
Şekil 3.25. Uygulama 13’de büyüme eğrisi	48
Şekil 3.26. Uygulama 13’de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	48
Şekil 3.27. Uygulama 14’te büyüme eğrisi	50
Şekil 3.28. Uygulama 14’te kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	50
Şekil 3.29. Uygulama 15’de büyüme eğrisi	52
Şekil 3.30. Uygulama 15’de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	52
Şekil 3.31. Uygulama 16’da büyüme eğrisi	54
Şekil 3.32. Uygulama 16’da kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	54
Şekil 3.33. Uygulama 17’de büyüme eğrisi	56
Şekil 3.34. Uygulama 17’de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	56
Şekil 3.35. Uygulama 18’de büyüme eğrisi	58
Şekil 3.36. Uygulama 18’de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	58
Şekil 3.37. Uygulama 19’da büyüme eğrisi	60

Şekil 3.38. Uygulama 19’da kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler	60
Şekil 3.39. Bitki büyüme düzenleyicisi derişimlerinin <i>S. hortensis</i> kallus kültürlerinde yaş kütle verimleri üzerine etkisi	62
Şekil 3.40. Bitki büyüme düzenleyicisi derişimlerinin <i>S. hortensis</i> kallus kültürlerinde rozmarinik asit birikimi üzerine etkisi	64
Şekil 3.41. Sukroz derişimlerinin <i>S. hortensis</i> kallus kültürlerinde yaş kütle verimi üzerine etkisi	66
Şekil 3.42. Sukroz derişimlerinin <i>S. hortensis</i> kallus kültürlerinde rozmarinik asit birikimi üzerine etkisi	67
Şekil 3.43. <i>S. hortensis</i> ’den elde edilen rozmarinik asit düzeyinin, en yüksek ve en düşük verim sağlayan uygulamalarla karşılaştırılması	70
Şekil 4.1. <i>S. hortensis</i> kallus kültürlerinde kahverengi nekrotik lekelerin görünümü	86
Şekil 4.2. <i>S. hortensis</i> kallus kültürü uygulamalarından bazı görünümler	87

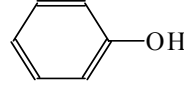
TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. Rozmarinik asidin bitkiler alemindeki dağılımı	5
Tablo 2.1. <i>S. hortensis</i> kallus kültürlerinde denenen besi ortamları	11
Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan temel besi ortamı içerikleri (mg/l)	12
Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan Gamborg'un B5 besi ortamı varyasyonları	14
Tablo 3.1. Uygulama 1'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	20
Tablo 3.2. Uygulama 2'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	22
Tablo 3.3. Uygulama 3'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	25
Tablo 3.4. Uygulama 4'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	27
Tablo 3.5. Uygulama 5'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	29
Tablo 3.6. Uygulama 6'da büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	31
Tablo 3.7. Uygulama 7'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	34
Tablo 3.8. Uygulama 8'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	37
Tablo 3.9. Uygulama 9'da büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	38
Tablo 3.10. Uygulama 10'da büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	41
Tablo 3.11. Uygulama 11'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	43
Tablo 3.12. Uygulama 12'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	45
Tablo 3.13. Uygulama 13'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	47
Tablo 3.14. Uygulama 14'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	49
Tablo 3.15. Uygulama 15'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	51
Tablo 3.16. Uygulama 16'da büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	53
Tablo 3.17. Uygulama 17'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	55
Tablo 3.18. Uygulama 18'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	57
Tablo 3.19. Uygulama 19'da büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)	59
Tablo 3.20. Bitki büyüme düzenleyicisi verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi	68
Tablo 3.21. Sukroz derişimi verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi	69

1. GİRİŞ

Bitkiler doğal yaşam ortamlarında çok çeşitli düşmanlarla kuşatılmış durumdadırlar. Bitkilerin, düşmanlarından kaçmak için yer değiştirmeleri söz konusu olmadığına göre, birtakım özel savunma mekanizmaları geliştirmek zorundadırlar. Bunlardan birisi de ürettikleri özel kimyasallardır. Bitkisel savunmada önemli işlevleri olan bu kimyasallara “sekonder metabolitler” ya da “ikincil ürünler” adı verilir.

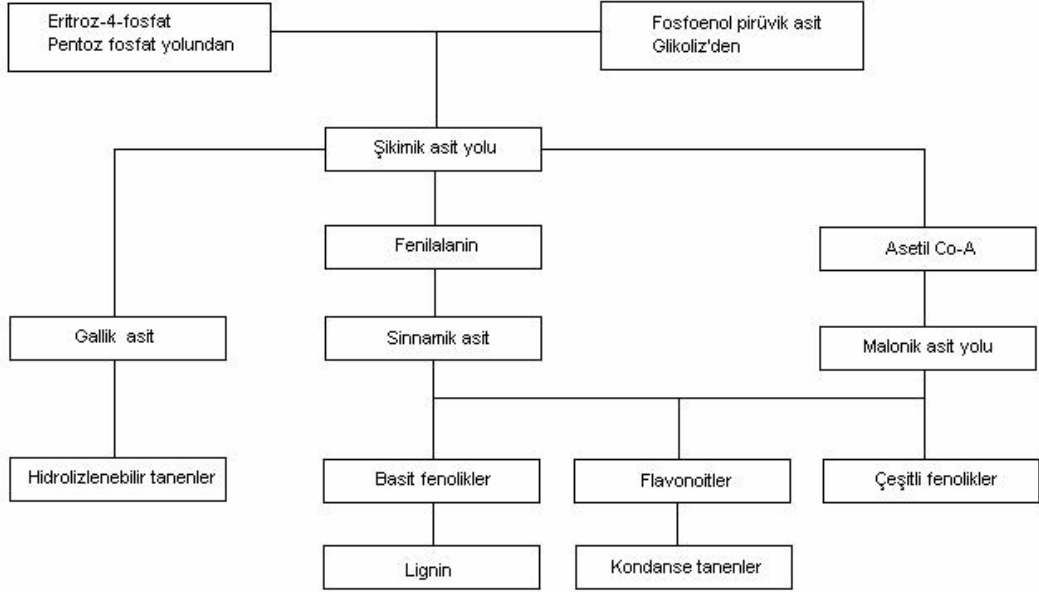
Sayı ve yapı itibariyle çok fazla değişkenlik gösteren bu ürünler esasen üç ana başlıkta toplanabilir. Bunlar; terpenler, azotlu bileşikler ve fenolik bileşiklerdir. Son anılan grupta, adından da anlaşılacağı üzere, yapısında bir fenol grubu, yani aromatik halkasında işlevsel bir hidroksil grup içeren kimyasallar yer alır (Şekil 1.1).



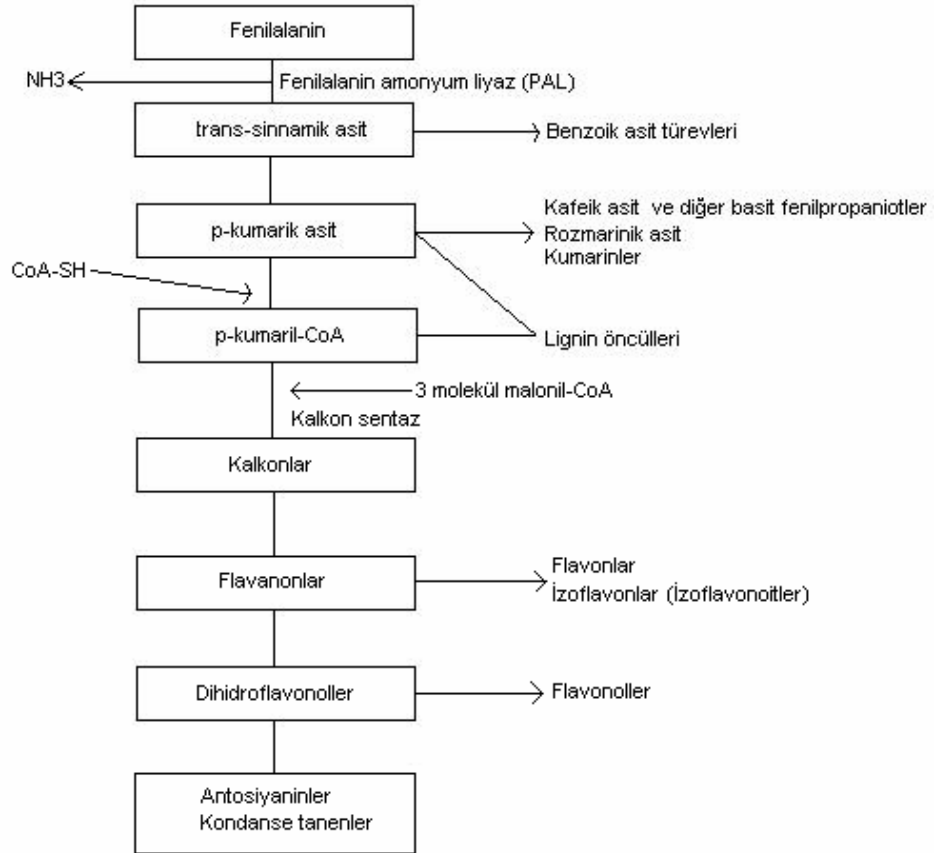
Şekil 1.1. Fenolik bileşiklerin halkasal yapısı

Fenolik bileşikler, farklı metabolik yollardan sentezlendiklerinden dolayı oldukça heterojen bir grubu oluştururlar. Bu bileşiklerin sentezi için iki ana metabolik yol bulunur. Bunlar şikimik asit ve malonik asit yollarıdır (Şekil 1.2). Şikimik asit yolu pek çok bitkisel fenoliklerin biyosentezine katılır. Malonik asit yolu ise bakteri ve funguslarda fenolik ikincil ürünler için önemli bir kaynak oluşturmakla beraber, yüksek bitkilerde daha az önem taşır (Taiz ve Zeiger, 2002).

Şikimik asit metabolik yolu, glikoliz ve pentoz fosfat yolunda oluşan basit karbohidrat öncüllerini aromatik amino asitlere dönüştürür (Hermann ve Weaver, 1999). Bitkilerde en sık rastlanan sekonder fenolik bileşik grupları fenilalanin'den köken alır. Fenilalanin'den amonyum molekülünün uzaklaşmasıyla sinamik asit oluşur (Şekil 1.3). Bu tepkimeyi katalizleyen fenilalanin amonyum liyaz (PAL), bitkisel sekonder metabolizmada belki de en çok çalışılan enzimdir. PAL, primer ve sekonder metabolizmanın tam ayrılma noktasında bulunduğundan, birçok fenolik bileşiğin oluşumunda önemli bir düzenleyici basamağı katalizler (Taiz ve Zeiger, 2002).



Şekil 1.2. Fenolik bileşiklerin biyosentez yolları (Taiz ve Zeiger, 2002)



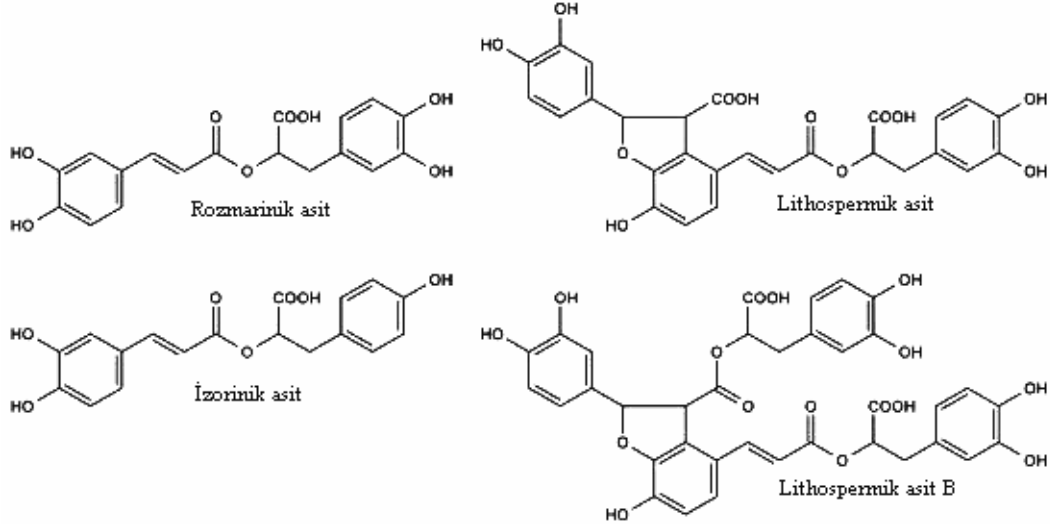
Şekil 1.3. Fenilalaninden başlayan fenolik biyosentezinin şematik görünümü (Taiz ve Zeiger, 2002)

Fenolik bileşiklerin, üretildikleri bitkilerde iki ana işlevi vardır. Bunlar fenolik asitlerde olduğu gibi patojen, böcek ve herbivor saldırısına karşı korunma ve flavonoidlerde olduğu gibi özellikle polen dağılımını sağlamak için çekicilik görevleridir. Bunların yanı sıra lignin de üç ayrı fenilpropanoit alkolden; yani koniferil, kumaril ve sinapil alkollerden kökenlenen bir fenolik polimerdir. Bitkilerdeki en önemli yapısal destek maddesidir. Lignin, hem yerçekimine karşı büyümeyi hem de topraktan su ve suda erimiş minerallerin bitkinin üst kısımlarına iletilmesini sağlar (Taiz ve Zeiger, 2002).

Bitki kökenli fenolik bileşikler, buldukları bitkilerden beslenebilecek diğer canlılar (böcekler, memeliler ve diğer herbivorlar) için caydırıcı etkilerde bulunurlar. Tanenler bunların en tipik örneğidir. İlginç olanı, insanların tadı yeterince buruk olan, elma, böğürtlen ve kırmızı şarap gibi tanen içeren yiyecekleri çoğu kez tercih etmeleridir. Son zamanlarda, kırmızı şaraptaki polifenollerin (tanenlerin) kan damarlarını daraltan bir sinyal molekül olan endotelin-1'in oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Corder ve ark., 2001). Şarap tanenlerinin bu etkisi sıkça sözü edilen kırmızı şarabın sağlık açısından yararlarının ve özellikle ölçülü kırmızı şarap tüketimine bağlı olarak kalp hastalığı riskinde görülen azalmanın nedenini açıklayabilir (Taiz ve Zeiger, 2002).

Kimyasal yapısı aydınlatılmadan önce rozmarinik asit ve benzeri birçok bileşik, *Labiatae* familyasına ait türlerden elde edilen ve bir çeşit tanen olarak bilinen "Labiatergerbstoffe" adıyla anılıyordu (Scarpate ve Oriente, 1958). *Melisa officinalis*'ten elde edilen tanen benzeri bir bileşik, ne bir kondanse tanen ne de bir gallo- ya da elagi-tanen olarak tanımlanabilmişti. Bu bileşiğin muhtemelen kafeik asit içerdiği öne sürülüyordu. Bu gelişmeden kısa bir süre sonra iki İtalyan kimyacı ilk defa rozmarinik asiti saf bir bileşik olarak izole ettiler (Scarpate ve Oriente, 1958). Araştırmacılar bu bileşiğe, elde edildiği bitki olan *Rosmarinus officinalis*'e ithafen rozmarinik asit adını verdiler (Şekil 1.4). Bir kafeik asit esteri olan bu bileşiğin yapısı 3,4-dihidroksi fenil laktik asit olarak aydınlatıldı (Scarpate ve Oriente, 1958). Ellis ve Towers'in (1970) radyoaktif işaretli amino asitler ile *Mentha* türleri üzerinde yaptığı biyogenetik çalışmalarda, rozmarinik asidin yapısına katılan iki amino asit (fenilalanin ve tirozin) belirlenmiş oldu. Yapılan

ayrıntılı çalışmalar sonrasında, bu bileşiğin kafeik asit kısmının fenilalaninden köken aldığı saptanırken, tirozinin ise 3,4-dihidroksi fenil laktik asit kısmının yapısına katıldığı belirlendi (Ellis ve Towers, 1970). Bu çalışmalar *Coleus blumei* ile yapılan destekleyici çalışmalar ile de doğrulanmıştır (Razzaque ve Ellis, 1977).



Şekil 1.4. Rozmarinik asit ve bazı türevlerinin kimyasal yapıları (Lu ve Foo, 1999).

Yüksek bitkilerden elde edilen çok sayıda rozmarinik asit türevi (örneğin; izorinik asit = 3'-deoksi rozmarinik asit, Satake ve ark., 1999) tanımlanmıştır (Şekil 1.4). En iyi bilinen rozmarinik asit türevlerinden birisi de bir rozmarinik asit dimeri olan lithospermik asit B'dir (Kelley ve ark., 1975; Tanaka ve ark., 1989).

Rozmarinik asit genellikle *Lamiaceae* familyasının *Nepetoideae* alt familyası ile *Boraginaceae* familyası üyelerinde bulunur (Litvinenko ve ark., 1975). Rozmarinik asite ayrıca diğer bitki familyalarında da rastlanır (Tablo 1.1). Örneğin; *Blechnaceae* familyasına ait eğreltiotlarında (Hausler ve ark., 1992), at kuyrukları gibi daha düşük yapılı bitkilerde (Takeda ve ark., 1990), *Zosteraceae* familyasına ait deniz çimi benzeri monokotiledonlarda (Rawn ve ark., 1994) ve *Potamogetonaceae* ve *Cannaceae* familyasına ait bitkilerde de rozmarinik asit bulunduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Buna göre rozmarinik asidin varlığının kemotaksonomik anlamda bir belirleyici olamayacağı söylenebilir.

Tablo 1.1. Rozmarinik asidin bitkiler alemindeki dağılımı (Mulabagal ve Tsay, 2004)

Familya	Kaynaklar
Dikotiledonlar	
<i>Lamiaceae</i>	Scarpati ve Oriente, 1958; Litvinenko ve ark., 1975
<i>Boraginaceae</i>	Kelley ve ark., 1975
<i>Apiaceae</i>	Hiller, 1965
<i>Araliaceae</i>	Trute ve Nahrstedt, 1986
<i>Cucurbitaceae</i>	De Tommasi ve ark., 1991
<i>Rubiaceae</i>	Aquino ve ark., 1990
<i>Plantaginaceae</i>	Holzmannova, 1995
<i>Sterculiaceae</i>	Satake ve ark., 1999
<i>Tiliaceae</i>	Lasure ve ark., 1994
Monokotiledonlar	
<i>Zosteraceae</i>	Rawn ve ark., 1994
Pteropsida	
<i>Blechnaceae</i>	Hausler ve ark., 1992
Anthocerotopsida	
<i>Anthocerotaceae</i>	Takeda ve ark., 1990

Rozmarinik asit hem farklılaşmamış (dezorganize) ve hem de farklılaşmış (organize) bitki hücre kültürleri ile üretilebilir. Bazı durumlarda bu bileşiğin kültüre alınmış materyallerdeki derişimi ana bitkiden daha fazla olabilmektedir. Rozmarinik asit elde edilebilen ilk bitki hücre kültürü *Coleus blumei*'dir (Razzaque ve Ellis, 1977; Zenk ve ark., 1977). Bu bitkinin hücre süspansiyon kültürleri, rozmarinik asit üretimi için başlatılan ilk biyoteknolojik girişimdir. Yapılan çalışmalara göre *C. blumei* hücre süspansiyon kültürlerinde, kültür kuru ağırlığının %21'ine varan oranlarda rozmarinik asit birikimi sağlanmıştır (Ulbrich ve ark., 1985). Araştırmacılar, kristal haldeki rozmarinik asiti 14 gün boyunca, 32 litrelik biyoreaktörlerde ve iki aşamalı bir süreç sonunda, süspansiyon kültürlerinden elde etmişlerdir. Bu gelişmenin ardından diğer bitki türlerinin hücre kültürleri de rozmarinik asit üretimi için denenmeye başlanmıştır. En yüksek rozmarinik asit verimi (kültür kuru ağırlığının %36'sı), karbon kaynağı olarak %5

oranında sukroz bulunan *Salvia officinalis* hücre süspansiyon kültürlerinden elde edilmiştir (Hippolyte ve ark., 1992). Farklılaşmamış doku ve/veya hücre kültürlerinde rozmarinik asit'in sadece nitel olarak varlığını gösteren ve kültürlerin dikkat çekici antioksidan aktivitesini gösteren bir çalışma da bulunmaktadır (Güllüce ve ark., 2003). Bu çalışmada yararlanılan kallusların kaynağı da burada sunulan kültürlerdir.

Rozmarinik asit'in farklılaşmış (organize) hücre kültürlerinde üretilebileceğine ilişkin bazı çalışmalar mevcuttur. Örneğin, *Ocimum americanum* bitkisinden başlatılan sürgün kültürlerinde rozmarinik asit üretimi etkili bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Rady ve Nazif, 2005). Diğer yandan bir başka *Ocimum* türü olan *O. basilicum* saçak kök kültürlerinde (Tada ve ark., 1996), *Origanum vulgare* (Yang ve Shetty, 1998) ve *Zataria multiflora* (Mohagheghzadeh ve ark., 2004) sürgün kültürlerinde de rozmarinik asit üretimine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Bunlara ilave olarak *Salvia miltiorrhiza* ile yapılan doku kültürü çalışmalarında, kültürde saçak kök oluşumu ile birlikte rozmarinik asit birikiminin gerçekleştirildiği rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2001; Yan ve ark., 2006).

Artan sukroz derişiminin rozmarinik asit birikimi üzerindeki etkisi *C. blumei* hücre süspansiyon kültürlerinde araştırılmıştır (Gertlowski ve Petersen, 1993). Bu çalışma sonucunda rozmarinik asit birikiminin doğrudan sukroz derişimine bağlı olduğu belirtilmiştir. Bazı araştırmacılara göre, ortama bir fungal elisitör (örneğin; *Pythium aphanidermatum*'dan elde edilen maya özütü) veya metil jasmonat ilavesi ile rozmarinik asit birikimi daha da artırılabilir (Szabo ve ark., 1999). Bu bulgudan yola çıkılarak rozmarinik asit'in bitkilerde patojenlere ve herbivorlara karşı korunmada önemli bir savunma ajanı olabileceği sonucu çıkarılabilir.

Rozmarinik asit'in biyolojik aktivitelere dair literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Anti-inflamatuar, anti-mutajen, anti-bakteriyal, anti-oksidan, ve antiviral aktiviteler bunlar arasında sayılabilir (Parnham ve Kesselring, 1985; Deans ve Svoboda, 1989; Exarchou ve ark., 2002; Güllüce ve ark., 2003). Özellikle rozmarinik asit içeren *Melisa officinalis* özütlerinden, *Herpes simplex* kaynaklı infeksiyonların tedavisinde yararlandığı rapor

edilmektedir (Parnham ve Kesselring, 1985). Anti-inflamatuar aktivitenin, lipo-oksigenaz ve siklo-oksigenaz enzimlerinin inhibe edilmesi sonucunda ortaya çıktığı öne sürülmektedir (Parnham ve Kesselring, 1985). Bu enzimler özellikle ekosenoiklerde ve lipid metabolizmasında etkin rol alır. Rozmarinik asit, intravenöz yolla kan dolaşımına verildikten sonra hızla elimine edilmekte ve farelerde intravenöz uygulamadan sonra 561 mg/kg LD₅₀ dozu ile oldukça düşük toksik etki göstermektedir (Parnham ve Kesselring, 1985). Rozmarinik asit benzeri fenolik bileşiklerin kansere karşı koruyucu bir etki sergiledikleri de bilinmektedir. Ayrıca bu bileşik, kozmetik endüstrisinde kullanılan *Rosmarinus officinalis* ve *Sanicula europaea* gibi bitkilerin aktivitelerinde de önemli rol oynamaktadır (D'Amelio, 1999).

Satureja cinsi Türkiye florasında 15 tür ile temsil edilmektedir ve bu türlerin 5'i endemiktir (Davis, 1982; Tümen ve ark., 1998). Bu türlere yetiştikleri bölgelerde değişik ve yerel isimler verilmiştir. Bunlar arasında en iyi bilinenler İskenderun ve çevresinde anılan "kekik" veya "zahter"dir. Bu bitki Mersin civarında "Girit zahteri" veya "kara kekik" olarak da bilinir (Baytop, 1997).

S. hortensis tek yıllık, 10-35 cm yüksekliğinde ve dallanmış gövdeye sahip bir bitkidir. Çiçeklenme dönemi 6-9. aylar arasındadır. Kayalık veya aşınmış erozyonlu yamaçlarda, yol kenarlarında, tarla kenarlarında ve boş alanlarda yetişir. Anadolu'da çok değişik türleri bulunur. Avrupa orijinlidir ve Avrupa'da birçok lokalitede bulunur (Davis, 1982). Bu bitki aynı zamanda kaya kekiği, kekik ve özellikle Sivas-Malatya çevresinde "anık" veya "anuğ" olarak bilinir. Yurdumuzda yetişen tüm *Satureja* türleri başlıca baharat olarak kullanılır. Bu türlerin yine bazı yörelerde çay olarak da tüketildiği bilinmektedir (Başer, 1995). Bununla birlikte bu tür, çeşitli hastalıkların tedavisinde halk arasında şifalı bitki olarak kullanılabilir. Bunlar arasında kramp ve kas ağrıları, mide bulantısı, sindirim bozukluğu, hazımsızlık, ishal ve infeksiyonel hastalıklar sayılabilir (Baytop, 1997).

Satureja cinsine ait türlerin asıl önemi kurutulmuş otsu kısımlarının ülkemizin başlıca bitkisel ihraç ürünü olmasıdır. Zira *Satureja* türleri ve özellikle *S. hortensis* aromatik (kokulu) bitkiler içerisinde özel bir öneme sahiptir (Azaz ve

ark., 2002). *S. hortensis* bitkisinin anti-spazmodik, ishal kesici (anti-diareal), anti-oksidan, sedatif (yatıştırıcı) ve mikrop öldürücü özellikleri bilimsel olarak da kanıtlanmıştır (Deans ve Svoboda, 1989; Leung ve Foster, 1996; Hajhashemi ve ark., 2000; Azaz ve ark., 2002; Güllüce ve ark., 2003).



Şekil 1.5. *Satureja hortensis* L. bitkisinin görünümü

Satureja türlerinin gerek folklorik, gerek ticari ve gerekse akademik anlamda önemi, bu bitkilerin sahip olduğu uçucu (eterik) yağlarına ve fenolik bileşiklere dayanır. Uçucu yağların yanı sıra *Satureja* türlerinden elde edilen özütlerde de aromatik olmayan önemli kimyasal bileşikler bulunur. Bunların başlıcaları alkoller, fenoller ve merkaptanlar'dır ve çoğu kez glikozidik formda bulunurlar. Bu grup içerisinde en dikkat çekici olanlar şüphesiz fenolik bileşiklerdir. Özellikle fenolik asitler (kafeik, sinnamik, labiatik ve rozmarinik asit) ve polifenoller, biyolojik aktiviteleri ile dikkat çekici kimyasallardır (Exarchou ve ark., 2002; Mastelic ve Jerkovic, 2003).

S. hortensis'ten elde edilen doku kültürlerinin anti-mikrobiyal ve anti-oksidan aktiviteleri daha önce rapor edilmiştir (Güllüce ve ark., 2003). Ayrıca

farklı besi ortamlarında kültürü yapılan kalluslarda büyüme, toplam su ve klorofil içerikleri ile antioksidan aktivitede gözlenen değişimler de araştırılmıştır (Alphan-Çevik, 2004). *S. hortensis* dışındaki yakın akraba türlerde, doku kültürlerine dair araştırmalar oldukça sınırlıdır. Literatürde sadece *S. obovata* bitkisinin *in-vitro* koşullarda mikro çoğaltımını gösteren bir çalışmaya rastlanmıştır (Arrebola ve ark., 1997).

Bu çalışmada *S. hortensis* bitkisinden başlatılan kallus kültürlerinde büyüme ve rozmarinik asit birikim düzeyleri üzerine bitki büyüme düzenleyicisi ve sukroz derişimlerinin etkileri araştırılmıştır. Böylelikle, *S. hortensis* kallus kültürlerinde en etkin büyümeyi sağlayan fakat aynı zamanda rozmarinik asit birikimine katkıda bulunan besi ortamı birleşimleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun yanı sıra bu çalışmada bitki doku kültürlerinde gözlenen ve en önemli sorunlardan biri olan hiperhidrisite (yüksek su birikimi) veya vitrifikasyon (camlaşma) olarak bilinen fizyolojik olayın *S. hortensis* doku kültürlerinde için de geçerli olup olmadığı araştırılmıştır. Zira, bu sorun özellikle doku kültürleri ile üretilen bitkilerin dış ortam koşullarına aktarıldığında yeni ortamına alışması anlamında ciddi güçlükler oluşturmaktadır. Ayrıca hedef metabolitlerin üretiminde hem biyokütle hem de ürün miktarında düşüş yaşanabilir. Bu nedenle gerek *S. hortensis* doku ve hücre kültürlerinde rozmarinik asit üretiminin optimizasyonu ve gerekse gelecekte yapılabilecek mikroçoğaltım çalışmalarına yönelik bir ön araştırma olarak kültürlerin su içerikleri belirlenmiştir.

2. MATERİYAL ve METOD

S. hortensis bitkisinden aşağıda belirtilen yöntemler izlenerek kallus kültürleri başlatıldı ve her bir kültürün farklı parametreler altındaki büyüme, su içeriği (%) ve ürettiği rozmarinik asit miktarı araştırıldı.

2.1. Tohumların Toplanması

S. hortensis bitkisine ait tohumların toplanmasında öncelikle bitkinin yetiştiği lokalite belirlendi. Çiçekli formdaki bitkiler Hafik-Zara arası, Emre köy mevkiinden toplandı (07.07.2002). Bitki, Dr. H. Aşkın AKPULAT (Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından teşhis edildi. Toplanan bitkiden bir örnek, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Herbariyumu'nda saklandı (CUFH Herbariyum No: AA 3396). Aynı lokaliteye Ekim 2002 döneminde tekrar gidilerek tohumlar toplandı.

2.2. Kallus Kültürlerinin Başlatılması

Sağlıklı tohumlar % 70'lik etil alkol içerisinde 1 dakika bekletilerek ilk yüzey sterilizasyonuna tabi tutuldu. Bu işlemden sonra tohumlar % 10'luk sodyum hipoklorit (NaOCI) çözeltisinde 15 dakika bekletildi. Tohumlar 3 kez steril distile su ile yıkanarak sterilizasyon işlemi tamamlandı. Daha sonra tohumlar 10'lu gruplar halinde besi ortamları üzerine yerleştirildi. Doku kültürlerinin en yüksek verimde ve doğrudan tohumdan başlatılacağı besi ortamını seçmek amacıyla bitki büyüme düzenleyicisi, karbon kaynağı ve bazal (temel) tuz içerikleri bakımından çeşitlilik gösteren 40 ayrı besi ortamı kullanıldı (Tablo 2.1). Bu besi ortamlarının 20'si Gamborg'un B5 ortamının çeşitli sukroz (sakkaroz) derişimleri ve bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonları içeren besi ortamlarıdır (Gamborg ve ark., 1968). Diğer 20 besi ortamı ise Murashige ve Skoog'un MS besi ortamıdır (Murashige ve Skoog, 1962). Bu ortamda da yine çeşitli sukroz derişimleri ve bitki büyüme düzenleyicisi birleşimleri kullanıldı. Doku kültürlerinin başlatılması aşamasında tüm besi ortamları sürekli karanlık ortamda ve 25°C sıcaklıkta bekletildi. MS ve B5 temel besi ortamlarının içerikleri Tablo 2.2'de verilmektedir.

Tablo 2.1. *S. hortensis* kallus kültürlerinde denenen besi ortamları

No	Besi ortamı	Oksin (ppm)	Sitokinin (ppm)	Karbon kaynağı (% v/w)
1	M&S ¹	2,4-D (1.00)	Kinetin (0.10)	Glukoz (3.00)
2	M&S	2,4-D (1.00)	Kinetin (0.10)	Sukroz (2.50)
3	M&S	NAA (1.00)	Kinetin (0.10)	Sukroz (2.00)
4	M&S	NAA (2.00)	Kinetin (0.20)	Sukroz (2.50)
5	M&S	IBA (1.00)	Zeatin (0.50)	Glukoz (2.00)
6	M&S	NAA (2.00)	6-BA (0.10)	Sukroz (3.00)
7	M&S	2,4-D (0.10)	Kinetin (0.10)	Sukroz (2.00)
8	M&S	NAA (1.00)	6-BA (0.50)	Sukroz (2.00)
9	M&S	NAA (1.00)	6-BA (1.00)	Sukroz (2.50)
10	M&S	2,4-D (1.00)	Zeatin (0.50)	Glukoz (2.00)
11	M&S	NAA (0.80)	6-BA (0.80)	Sukroz (3.00)
12	M&S	NAA (2.00)	6-BA (2.00)	Sukroz (2.50)
13	M&S	2,4-D (2.00)	Kinetin (0.20)	Sukroz (2.50)
14	M&S	IBA (1.00)	6-BA (0.10)	Sukroz (2.50)
15	M&S	IBA (0.10)	6-BA (1.00)	Sukroz (3.00)
16	M&S	IBA (2.00)	6-BA (1.00)	Sukroz (2.50)
17	M&S	IBA (1.00)	6-BA (1.00)	Sukroz (2.50)
18	M&S	NAA (10.00)	-	Fruktoz (2.00)
19	M&S	NAA (10.00)	-	Sukroz (2.00)
20	M&S	2,4-D (2.00)	-	Sukroz (2.00)
21	Gamborg B5	IBA (1.00)	6-BA (1.00)	Sukroz (2.50)
22	Gamborg B5	2,4-D (1.00)	6-BA (1.00)	Sukroz (2.50)
23	Gamborg B5	2,4-D (1.00)	Zeatin (0.50)	Sukroz (2.00)
24	Gamborg B5	NAA (2.00)	Kinetin (0.20)	Sukroz (2.50)
25	Gamborg B5	2,4-D (1.00)	Kinetin (0.10)	Sukroz (2.50)
26	Gamborg B5	NAA (1.00)	6-BA (1.00)	Sukroz (2.50)
27	Gamborg B5	2,4-D (0.10)	Kinetin (0.10)	Sukroz (2.00)
28	Gamborg B5	NAA (1.00)	Zeatin (0.50)	Sukroz (2.00)
29	Gamborg B5	NAA (0.50)	6-BA (0.50)	Sukroz (2.00)
30	Gamborg B5	NAA (5.00)	Kinetin (0.50)	Sukroz (2.00)
31	Gamborg B5	2,4-D (2.00)	Kinetin (0.20)	Sukroz (3.00)
32	Gamborg B5	2,4-D (2.00)	Zeatin (1.00)	Sukroz (2.00)
33	Gamborg B5	NAA (2.00)	Kinetin (0.50)	Sukroz (3.00)
34	Gamborg B5	NAA (2.00)	Kinetin (1.00)	Sukroz (2.50)
35	Gamborg B5	IBA (1.00)	6-BA (0.10)	Sukroz (2.50)
36	Gamborg B5	IBA (0.10)	6-BA (1.00)	Sukroz (3.00)
37	Gamborg B5	IBA (2.00)	6-BA (1.00)	Sukroz (2.50)
38*	Gamborg B5	IBA (1.00)	6-BA (1.00)	Sukroz (2.50)
39	Gamborg B5	NAA (1.00)	Kinetin (0.10)	Sukroz (2.00)
40	Gamborg B5	NAA (2.00)	Kinetin (2.00)	Sukroz (2.00)

¹ M&S: Murashige & Skoog besi ortamı

* Maksimum kallus verimi sağlayan besi ortamı

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan temel besi ortamı içerikleri (mg/l)

Temel besi ortamı bileşenleri	Murashige ve Skoog besi ortamı	Gamborg'un B5 besi ortamı
KNO ₃	1900	2500
NH ₄ NO ₃	1650	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	250
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	150
KH ₂ PO ₄	170	-
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	150
MnSO ₄ .H ₂ O	-	10
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30	-
KI	0.83	0.75
H ₃ BO ₃	6.20	3.00
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	2.00
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80	27.80
Na ₂ EDTA	37.30	37.30
Nikotinic asit	0.50	1.00
Pridoksin-HCl	0.50	1.00
Thiamin-HCl	0.10	10.00
Myo-inositol	100	100
Glisin	2.00	-
Sukroz ¹	30.000	20.000

¹ Sukroz çalışma esaslarına göre modifiye edilmiştir.

2.3. Kùltürlerin Sùrdürùlmesi

Çalışılan tüm besi ortamları içerisinde; karbon kaynağı olarak sukroz (% 2.50, v/w), oksin olarak indol bütirik asit (IBA, 1.00 ppm) ve sitokinin olarak 6-benzil aminopürin (N⁶-benzil adenin, 1.00 ppm) bulunan Gamborg'un B5 besi ortamının (Gamborg *ve ark.*, 1968); biyokùtle verimi, total fenolik birikimi ve özellikle sürdürülebilme, yani alt kùltür yapılabilme potansiyeli bakımından denenen diğeri besi ortamlarına göre daha üstün olduğı saptandı. Dolayısıyla bu besi ortamı, daha sonraki çalışmalar için gerekli olan kallus kùltürlerinin başlatılması için "standart kùltür" ya da "seed-inokulan" (başlatıcı-aşılama) kùltür olarak kullanıldı.

Yukarıda değinilen standart kùltürün alt kùltürleri her 35 günde bir gerçekleştirildi. Ana bitkiden "taşınma"nın önlenmesi amacıyla üç defa alt kùltür yapıldı. Bu işlemin ardından *S. hortensis* kallus kùltürlerinde toplam fenolik bileşik birikimi için ideal sukroz ve bitki büyüme düzenleyicisi derişimlerinin saptanması amacıyla üç alt kùltür daha gerçekleştirildi. Böylelikle kallusların kùltür ortamına uyumları sağlanmış oldu. Bu aşamadan sonra rozmarinik asit üretimi uygulamalarına geçildi.

2.4. Kullanılan Besi Ortamı Parametreleri

Büyüme, su içeriğı (%) ve rozmarinik asit miktarı bakımından farklılıkları saptamak ve böylece optimizasyonu sağlamak amacıyla, Tablo 2.3'de verilen ortamlarda kallus kùltürleri başlatıldı. Tüm uygulamalar sürekli karanlık ortamda ve 25 °C sıcaklıkta gerçekleştirildi.

2.4.1. IBA/6-BA Birleşimleri

Bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanılan IBA ve 6-BA birleşimlerinin; büyüme, su içeriğı (%) ve rozmarinik asit birikimi üzerindeki etkilerini saptamak için Tablo 2.3'de verilen besi ortamları hazırlandı. Her uygulama için 30 kùltür kabı (magenta) kullanıldı. Bu uygulamaların her biri için birer hafta arayla 3 kùltür kabı kullanıldı.

2.4.2. Karbon Kaynağı Derişimleri

Karbon kaynağı olarak kullanılan sukroz derişimlerinin büyüme, su içeriği (%) ve rozmarinik asit birikimi üzerindeki etkilerini saptamak için Tablo 2.3'de verilen besi ortamları kullanıldı. Burada kullanılan ve kültür süresince her hafta değerlendirilen magenta sayısı yukarıdaki gibidir (Bölüm 2.4.1.)

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan Gamborg'un B5 besi ortamı varyasyonları

Uygulamalar	Bitki büyüme düzenleyicileri (ppm)		Karbon kaynağı (%, w/v)
	Oksin (IBA)	Sitokinin (6-BA)	Sukroz
1. uygulama (kontrol)	0.00	0.00	2.50
<i>Artan oksin derişimine karşı sabit sitokinin derişimleri uygulamaları</i>			
2. uygulama	0.00	1.00	2.50
3. uygulama	0.10	1.00	2.50
4. uygulama	0.50	1.00	2.50
5. uygulama	1.00	1.00	2.50
6. uygulama	2.00	1.00	2.50
7. uygulama	5.00	1.00	2.50
8. uygulama	10.00	1.00	2.50
<i>Artan sitokinin derişimine karşı sabit oksin derişimleri uygulamaları</i>			
9. uygulama	1.00	0.00	2.50
10. uygulama	1.00	0.10	2.50
11. uygulama	1.00	0.50	2.50
12. uygulama	1.00	2.00	2.50
13. uygulama	1.00	5.00	2.50
14. uygulama	1.00	10.00	2.50
<i>Sukroz derişimleri uygulamaları</i>			
15. uygulama	1.00	1.00	1.00
16. uygulama	1.00	1.00	2.00
17. uygulama	1.00	1.00	3.00
18. uygulama	1.00	1.00	4.00
19. uygulama	1.00	1.00	5.00

2.5. Farklı Ortamlarda Büyütülen Kallus Kültürlerinde Büyüme Kinetiklerinin Hesaplanması

Bu çalışmada araştırılan çeşitli parametrelerin kallus kültürlerinde büyüme üzerine etkisini araştırmak için aşağıdaki yöntem izlendi.

Stok kültürden alınan 120.00 ± 5.00 mg ağırlığındaki kallus parçaları besi ortamı içeren kültür kaplarına yerleştirildi. Kallus parçalarına agar ile katılaştırılmış besi ortamının bulaşmasının önlenmesi amacıyla madde alışverişine izin veren naylon filtreler kullanıldı. Bütün çalışmalar sürekli karanlık ortamda, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirildi. Bölüm 2.4.1 ve 2.4.2'de belirtildiği gibi her uygulama 30 kültür kabı ile başlatıldı. Böylelikle bulaşma riskine karşı bazı kültürler "güvenlik" amacıyla alıkonuldu. Ayrıca; büyüme, su içeriği ve rozmarinik asit miktarları bakımından ortalamalarda oluşabilecek aşırı sapmaları gidermek için her bir uygulamadan her hafta üçer magenta değerlendirildi. Ortalamaya en yakın değeri taşıyan kültürlerin yaş ve kuru kütleleri ortalama kütle hesabında kullanıldı.¹ Bu işlem üç tekrarlı yapıldı.

Her hafta düzenli olarak inkübasyondan çıkarılan kalluslar steril ortamda tartıldı. Böylece yaş kütledeki değişimler mg olarak hesaplandı. İlerleyen aşamada kültürlerin karşılaştırılabilir sonuçları için standart iki katına çıkış süresi (t_d) ve özgül büyüme oranları (μ) hesaplandı. Büyüme kinetiklerinin yaş kütle bazında hesaplanmasında;

$$t_d = 0.693 \times (t_2 - t_1) / \log (w_2 - w_1)$$

formülü kullanıldı. Burada;

t_d = iki katına çıkış süresi

t_1 = başlangıçta (0. gün) elde edilen ölçüm değeri

$t_2 = 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49.$ ve $56.$ günler için elde edilen her bir ölçüm değeri

$w_1 = 0.$ günde yaş kütle

$w_2 = 7,14, 21, 28, 35, 42, 49.$ ve $56.$ gündeki yaş kütleleri vermektedir.

¹ Tüm uygulamalarda bu kallusların su içerikleri ve rozmarinik asit miktarları göz önüne alınmıştır.

Bu değerlerden yola çıkararak kültürlerin kendine has matematiksel ifadesi olan özgün büyüme oranları (μ) hesaplandı. Bunun için 56. gün sonunda elde edilen t_d değerleri esas alınarak $\mu = 0.693 / t_d$ formülünden her kültürün kendine has büyüme oranları tespit edildi (Allan, 1991).

2.6. Kültürlerde Su İçeriğinin Hesaplanması

56. günden sonra farklı parametreler içeren kültür ortamlarından hasat edilen kallus parçaları tartıldı ve önceden tartılmış plastik kaplara yerleştirildi. -80  C'de donması sağlandıktan sonra liyofilizatre yerleştirilerek su içerikleri uzaklaştırıldı. Su içeriği kültürlerin 100 mg yaş kütlesi esas alınarak ve aşağıdaki formülü kullanılarak hesaplandı (Komali *ve ark.*, 1999).

$$[(\text{yaş kütle} - \text{kuru kütle}) / \text{yaş kütle}] \times 100$$

alışmalar 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.7. Kallus Kültürlerinde Rozmarinik Asit Tayini

2.7.1. Spektrofotometrik Rozmarinik Asit Tayini

Su içeriği uzaklaştırılmış olan kallus parçaları (100.00 mg kuru kütle) rozmarinik asit izolasyonu için öncelikle bir çalkalayıcı etüv yardımı ile 1 saat süre ile 70  C'de % 50'lik etil alkol içerisinde ztlendi. Elde edilen özüt filtre edildi. Sznt kısımlar buharlaştırıldı ve kalıntı kısımlar % 70'lik etil alkolde zndrld ve 24 saat süre ile -10  C'de saklandı. Bu süre sonunda okelti kısımlar filtre edilerek uzaklaştırıldı ve 327 nm'de rozmarinik asit tayini için +4  C'de saklandı (Lopez-Arnaldos *ve ark.*, 1995).

Yukarıda belirlenen tüm parametrelerden elde edilen kallusların yanı sıra, *S. hortensis* bitkisinin taze bir rneği de özütlenerek rozmarinik asit tayini için kullanıldı (100.00 mg zt). Bunun için toz haline getirilmış bitkisel materyal MeOH ile 6 saat Soxhlet'te ztlendi. Bu yöntemle elde edilen özütler yukarıdaki süreç uygulanarak rozmarinik asit tayini çalışmaları için +4  C'de buzdolabında saklandı (Sökmen *ve ark.*, 1999).

Tüm alışmalar üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.7.2. HPLC ile Rozmarinik Asit Tayini

Kallus kültürlerinin, EtOH içerisinde hazırlanmış olan 56. gün örnekleri ve taze bitkiden hazırlanan özütler, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yolu ile analiz edilerek, elde edilen sonuçların spektrofotometrik testlerden elde edilen sonuçlarla tutarlılığı değerlendirildi.

HPLC analizlerinde Waters 2690 Alliance marka HPLC sistemi (Waters Corporation, Milford, MA, USA), 996 fotodiyot array dedektör, online degasser ve otomatik örnekleme ile birlikte Perkin-Elmer marka C-18 kolon (10 µm, 250 x 4.6 mm) kullanıldı. Örnekleme işlemi sırasında injeksiyon hacmi 1.0 µl olarak ayarlandı. Yürütücü sistem olarak % 2'lik asetik asit (A) ve % 2'lik asetik asit/asetonitril (7:3) (B)'den faydalanıldı. Rozmarinik asit tayini sırasında 40 dakika süre ile A çözeltisinde % 70'den % 30'a doğru ilerleyen bir doğrusal bir gradient uygulandı. Yürütücü sistemin kolon içerisindeki akış hızı 1 ml/dk ve UV dalga boyu 320 nm olarak ayarlandı (Ilieva ve Pavlov, 1999).

Yukarıda belirtilen çalışma koşullarında sırasıyla 1, 10, 25, 50 ve 100 µg/ml derişimlerindeki rozmarinik asit standartlarından kolona enjeksiyon yapılarak HPLC standardize edildi. Daha önceki çalışmada (Güllüce ve ark., 2003) rozmarinik asit'in kalitatif olarak kalluslarda varlığı saptanmış olsa da, varlığını onaylamak için ilk çalışmalarda 10 µg/ml'lik iç standart kullanıldı ve böylece oluşan piklerdeki sapmalar saptandı. Kaynak bitkiden en yüksek verimin alındığı uygulamadan elde edilen özütlerin ve saf rozmarinik asit'in HPLC pikleri, bu çalışmanın "Ek" kısmında sunulmuştur.

Tüm çalışmalar üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırmada, bitki büyüme düzenleyicisi birleşimlerinden ve sukroz derişimlerinden elde edilen tüm yaş ve kuru kütle verimleri ile spektrofotometrik ve HPLC yöntemleriyle saptanan rozmarinik asit miktarları Bölüm 3'de tablolar halinde sunulmuştur. Bu verilerden ortalama değerler elde edilerek her grup kendi arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Her bir uygulamadan elde edilen veriler, üç tekrarın uygulaması olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler

için SPSS 10.0 paket istatistik programı kullanılmıştır. Tekrar ve deney ortalamaları arasındaki farkların önem kontrolü, Duncan'ın (1955) Multiple Range Test'ine göre yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki farklar 0.05 olasılık düzeyinde F değerinden daha büyük olduğu zaman önemli kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Bu çalışmada, bitki büyüme düzenleyicisi olarak bir oksin (IBA) ve bir sitokinin'in (6-BA) çeşitli birleşimleri ile farklı sukroz derişimlerinin *S. hortensis* kallus kültürlerinde büyüme, su içeriği (%) ve rozmarinik asit birikimi üzerindeki etkileri araştırıldı.

S. hortensis kallus kültürlerinin başlatılması ve sürdürülmesi ile ilgili ön çalışmalarda, IBA ve 6-BA bitki büyüme düzenleyicileri, diğer düzenleyicilere göre daha iyi büyüme ve alt kültür olanağı sağladı. Ayrıca, bu kültürlerle yapılan bir başka çalışmada diğer büyüme düzenleyicileri ile oluşturulan birleşimlerin büyümeyi teşvik etmediği ve kültürlerde toplam fenolik içeriğinin de düşük miktarda olduğu gösterilmiştir (Alpan-Çevik, 2004). Bu sonuçların teyit edilmesi amacıyla, 3. alt kültürden itibaren kallus kültürlerinde farklı karbon kaynakları, çeşitli oksin/sitokinin birleşimleri ve aydınlık/karanlık uygulamalarının büyüme ve total fenolik birikimi üzerine etkileri araştırıldı.

Sonuç olarak, kallus kültürlerinin sürdürülmesi ve en yüksek biyokütlenin elde edilmesinde, 1.00 ppm indol bütirik asit (IBA), 1.00 ppm 6-benzil aminopurin (6-BA) ve % 2.50 (w/v) sukroz içeren Gamborg'un B5 temel besi ortamının en uygun olduğu belirlendi. Daha sonra IBA, 6-BA ve sukroz derişimlerinde varyasyonlar oluşturularak en uygun büyüme ve rozmarinik asit üretimi sağlayan besi ortamı ya da ortamları belirlendi. Çalışılan parametrelerin hiçbiri kültürlerde kök ve/veya sürgün oluşturmak üzere farklılaşmaya yol açmadı. Kültürlerin yaş ve kuru kütleleri birlikte değerlendirildi. Ayrıca biyokütle'nin toplam su içeriği (%) de belirlendi. Çalışmada uygulanan parametrelerin, büyüme ve rozmarinik asit birikimi üzerine etkileri aşağıda karşılaştırmalı olarak verilmektedir. Tüm uygulamalar sürekli karanlık ortamda ve 25°C'de çalışılmıştır.

3.1. IBA/6-BA Birleşimlerinin Büyüme, Su İçerikleri (%) ve Rozmarinik Asit Birikimi Üzerine Etkileri

Uygulama 1 (0.0 ppm IBA + 0.00 ppm 6-BA)

Bu uygulamada, B5'in temel besi ortamı ve sukrozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı (% 2.50, w/v) ortamda kültür yapıldı. Herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisine yer verilmedi (Bölüm 2, Tablo 2.2). Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri Tablo 3.1'de ve büyüme eğrisi Şekil 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 incelendiğinde kültürlerin, başlangıcından 14. güne kadar geçen süre içerisinde düşük bir büyüme hızı gösterdikleri görülür ($t_d = 9.27$). Bu dönem, kültürlerin besi ortamına uyum göstermeye çalıştıkları lag evresine eşdeğerdir. 14. günden itibaren kültürlerde oldukça hızlı bir büyüme gözlemlendi (log evresi). Şekil 3.1'deki büyüme eğrisi, log evresinin 14 ile 35. günler arasında olduğunu ve bunu 15 günlük bir lineer (doğrusal) artış evresinin izlediğini göstermektedir. 49. günden itibaren kültürün t_d değerinde yeniden artış görüldü (2.25 gün). Bu değer kültürün durağan evreye girdiğini gösterir. Kültürdeki hücrelerin özgül büyüme oranı 0.30 olarak tespit edildi. Bu uygulama sonunda (56. günde) 5066.33 ± 45.24 mg yaş biyokütle elde edildi.

Tablo 3.1. Uygulama 1'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)¹

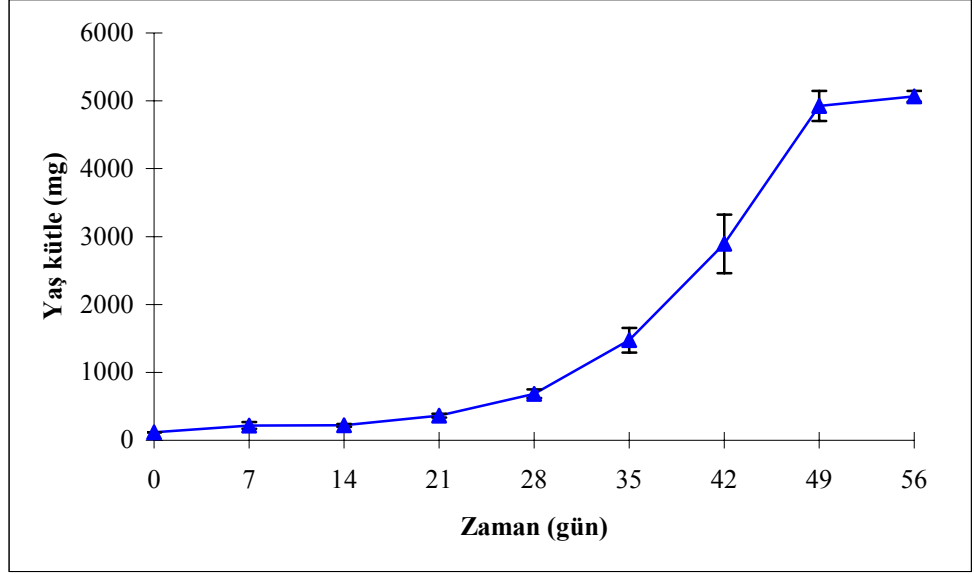
Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 \pm 0.00
7	2.44		94.99 \pm 1.73
14	9.27		91.06 \pm 0.22
21	2.25		94.21 \pm 0.28
28	1.93	0.30	94.62 \pm 0.41
35	1.67		95.40 \pm 0.19
42	1.53		95.93 \pm 1.03
49	1.46		96.35 \pm 0.19
56	2.25		96.35 \pm 0.24

¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

³ μ (Özgül büyüme oranı)

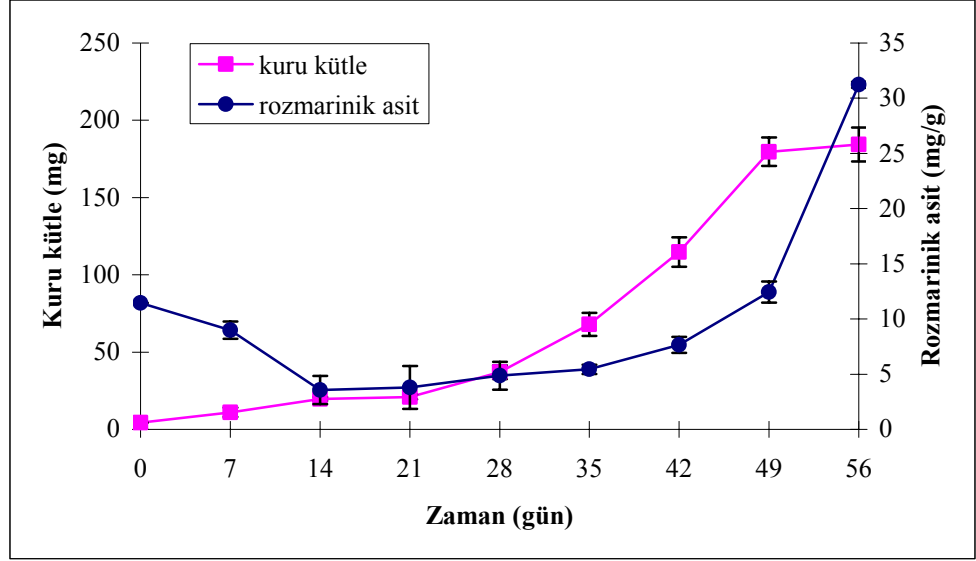
Bu uygulama süresince kültürdeki hücrelerin su içeriği % 91.06 ile % 96.35 arasında değişmektedir (Tablo 3.1.). Özellikle su içeriğinde 14 ile 21. günler arasında göreceli bir düşüş görüldü. Bu olgu hızlı büyümenin gerçekleştiği log evresinde gerçekleştiği saptandı.



Şekil 3.1. Uygulama 1'de büyüme eğrisi

Herhangi bir büyüme düzenleyicisine yer verilmeyen bu uygulama sonucunda kuru kütle ve rozmarinik asit birikiminin zamana karşı değişimi Şekil 3.2' de verilmektedir.

Şekil 3.1 ve 3.2 incelendiğinde, yaş veya kuru kütlelerin benzer büyüme eğrileri verdiği görülür. Ancak kuru kütle esas alındığında, 35. günden sonra başlayan doğrusal artış evresi ile 49. gün sonrasına denk gelen durağan evre daha belirgin hale gelmiştir. Rozmarinik asit derişimi ise tipik “antosiyanın tip” üretimi (ya da birikimi) yansıtır. Zira kültürün başlangıcında, yani 0. günde, rozmarinik asit düzeyi bir önceki kültürden (alt-kültür) gelen düzeyi yansıtır. Bu düzey lag evresi ile birlikte hızlı bir düşüşe geçmiş ve daha sonra, log evresinin tamamında ve doğrusal artış evresinin sonuna kadar uzunca bir süre yatay bir seyir izlemiştir. Özellikle doğrusal artış evresinin sonunda ve durağan evrede rozmarinik asit birikimi (56. gün sonunda) maksimum düzeye ulaşmıştır (31.22 mg/g).



Şekil 3.2. Uygulama 1’de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Uygulama 2 (0.0 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA)

Bu uygulamada, B5’in temel besi ortamı ve sukroz’un karbon kaynağı olarak kullanıldığı (% 2.50, w/v) ortamda kültür yapıldı. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak sadece bir sitokinin, yani 1.00 ppm 6-BA kullanıldı (Bölüm 2, Tablo 2.2). Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri Tablo 3.2’de ve büyüme eğrisi Şekil 3.3’de verilmiştir.

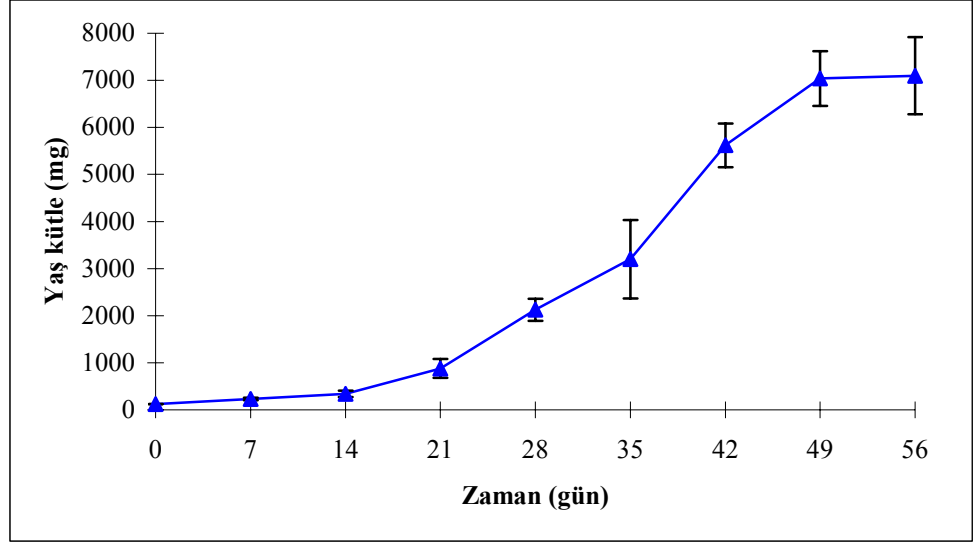
Tablo 3.2. Uygulama 2’de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)¹

Zaman (gün)	t_d ²	μ^3	Su içeriği (%)
0	-		96.33 ± 0.00
7	2.36		92.05 ± 2.88
14	2.39		93.94 ± 2.78
21	1.77		95.77 ± 1.02
28	1.56	0.25	96.28 ± 0.19
35	1.60		96.09 ± 0.39
42	1.43		96.37 ± 0.19
49	1.53		96.42 ± 0.24
56	2.73		96.06 ± 0.05

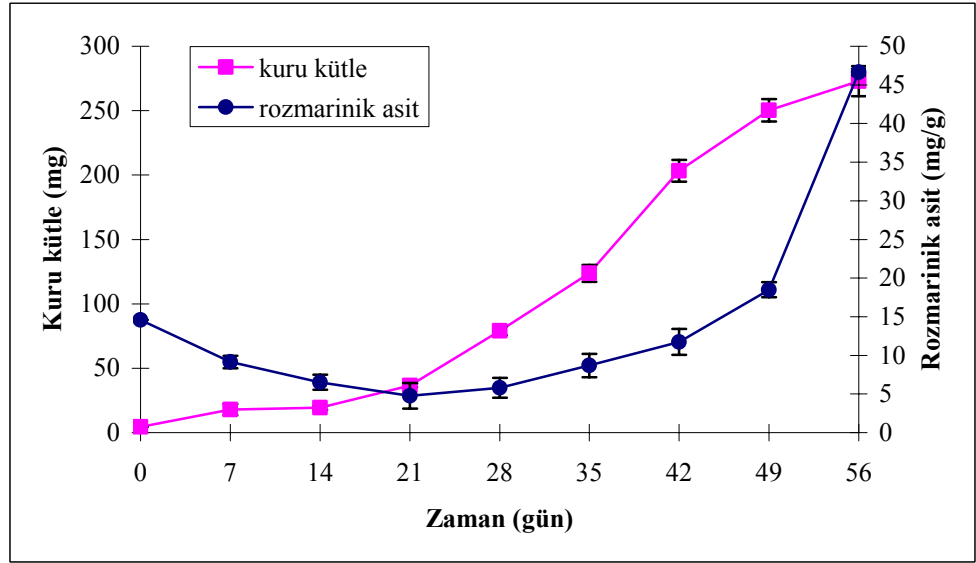
¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

³ μ (Özgül büyüme oranı)



Şekil 3.3. Uygulama 2'de büyüme eğrisi



Şekil 3.4. Uygulama 2'de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Bu uygulamada da kültürler başlangıçta (0-14. günler arası) oldukça yavaş bir büyüme hızına sahiptir. Zira t_d değerleri 2.36 ve 2.39 gün arasındadır. Uygulama 1'de olduğu gibi bu süreç lag evresidir. 14. günden sonra, 35. güne kadar bir log evresi ve ardından 35 ile 49. günler arasında bir doğrusal artış evresi görülür (Şekil 3.3). 49. günden sonra ise t_d değerleri artmış ve kültür durağan

döneme girmiştir. Uygulama 2, bir önceki uygulamaya göre daha yüksek biyokütle verimi sağlamıştır. Ayrıca özgün büyüme oranı da (0.25) bir önceki uygulamadan daha küçüktür. Bu uygulama sonunda (56. günde) elde edilen yaş biyokütle miktarı 7098.66 ± 47.68 mg'dır.

Diğer taraftan hücrelerin su içeriği bir önceki uygulamaya benzerlik göstermektedir. Su içeriği % 92.05 ile % 96.42 arasında değişmektedir (Tablo 3.2.). Bu durum lag sonu veya log başlangıcında göreceli bir azalma olduğunu gösterir.

Uygulama 2'de kültürlerin kuru kütle ve rozmarinik asit birikiminin zamana karşı değişimleri Şekil 3.4'de verilmektedir. Bu ortamda kültürün başlangıç rozmarinik asit derişimi 14.59 mg/g'dır. Bu değer 21. gün sonunda en düşük düzeye yani 4.76 mg/g'a kadar gerilemiştir. Bu düşüş kültürlerin gerek yaş ve gerekse kuru kütlesi esas alındığında lag evresinin tamamına ve log evrelerinin başlangıcına denk gelmektedir. Birikim log evresinin sonuna kadar yatay bir seyir izlemiştir. Özellikle doğrusal artış evresinin sonlarına doğru ise birikimde hızlı bir artış görülmüştür Ancak büyümede durağan evrenin başladığı 49. günden sonra artış daha da artmıştır. 56. gün sonunda rozmarinik asit düzeyi maksimumdur (46.66 mg/g).

Uygulama 3 (0.10 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA)

Bu uygulamada, B5'in temel besi ortamı ve sukroz'un karbon kaynağı olarak kullanıldığı (% 2.50, w/v) ortamda kültür yapıldı. Bitki büyüme düzenleyicileri olarak 0.10 ppm IBA ve 1.00 ppm 6-BA kullanıldı (Bölüm 2, Tablo 2.2). Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri Tablo 3.3'te ve büyüme eğrisi Şekil 3.5'te verilmiştir.

Oksin/sitokininin oranının 1/10 olduğu bu uygulamada kültürlerin 0-14. günler arası oldukça yavaş bir büyüme hızına sahip olduğu görülmektedir. Zira t_d değerleri 2.08 ve 2.68 gün arasındadır (Tablo 3.3). Bu süreç lag evresidir. 14. günden sonra, 28. güne kadar bir log evresi ve ardından 28-49. günler arasında bir doğrusal artış evresi görüldü (Şekil 3.5). 49. günden sonra ise t_d değerleri artmış ve kültür durağan döneme girmiştir. Bu uygulama sonunda (56. günde) $4864.33 \pm$

58.12 mg yaş biyokütle elde edildi. Kültürdeki hücrelerin özgül büyüme oranı 0.32 olarak tespit edildi. Hücrelerin su içeriği % 94.32-97.47 arasındadır.

Tablo 3.3. Uygulama 3’de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)¹

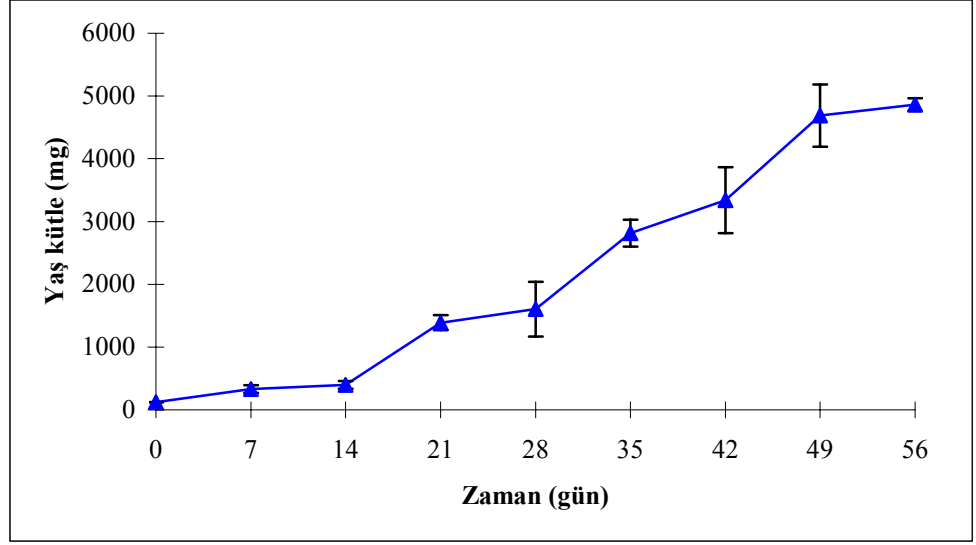
Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 ± 0.00
7	2.08		97.47 ± 0.69
14	2.68		94.32 ± 1.49
21	1.61		96.74 ± 0.63
28	2.07	0.32	96.58 ± 0.63
35	1.57		97.24 ± 0.23
42	1.78		96.99 ± 0.20
49	1.54		96.59 ± 0.28
56	2.16		96.57 ± 0.16

¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

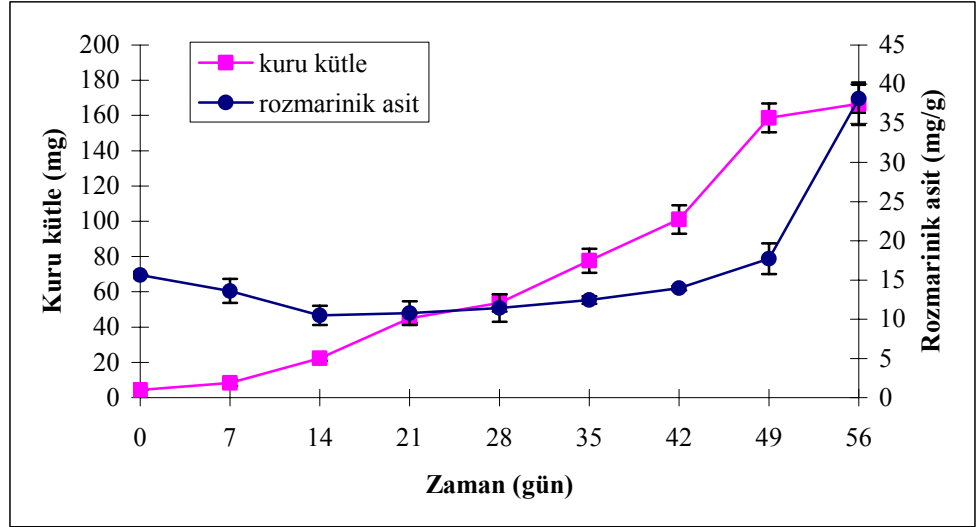
² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

³ μ (Özgül büyüme oranı)

Kuru kütle artışı esas alındığında ise, Şekil 3.5’ de gösterilen ve yukarıda açıklanan büyüme evrelerinin daha netleştiği görülür. Kuru kütle değerleri, lag evresinin daha kısa olduğunu göstermektedir. Diğer evreler ise yaş kültürlerden elde edilen evrelere paralellik göstermektedir (Şekil 3.5. ve 3.6). Uygulama başlangıcından sonraki ilk iki haftada rozmarinik asit miktarı azalmış ve daha sonra 5.15 mg/g’lık bir değişim ile 10.49 mg/g’a ulaşmıştır. Her ne kadar 21. günden itibaren kültür kuru ağırlığı önemli bir artış göstermiş ise de, rozmarinik asit miktarı 35. güne kadar nispeten sabit bir seyir izlemiştir. Rozmarinik asit miktarında 49. güne kadar önemli bir artış görülmemiştir. Ancak, durağan dönemi de içeren haftada ise artış göstererek 38.14 mg/g değerine ulaşmıştır.



Şekil 3.5. Uygulama 3'de büyüme eğrisi



Şekil 3.6. Uygulama 3'de kuru kütlede ve rosmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Uygulama 4 (0.50 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA)

Bu uygulamada, B5'in temel besi ortamı ve sukroz'un karbon kaynağı olarak kullanıldığı (% 2.50, w/v) ortamda kültür yapıldı. Bitki büyüme düzenleyicileri olarak 0.50 ppm IBA ve 1.00 ppm 6-BA kullanıldı (Bölüm 2, Tablo 2.2). Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri Tablo 3.4 ve eğrisi Şekil 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.4. Uygulama 4’de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%) ¹

Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 ± 0.00
7	2.08		95.85 ± 0.96
14	2.10		96.16 ± 0.34
21	1.89		96.63 ± 0.30
28	1.92	0.35	96.48 ± 0.18
35	1.66		95.92 ± 0.27
42	1.67		95.82 ± 0.74
49	1.43		95.82 ± 0.12
56	1.97		95.87 ± 0.12

¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

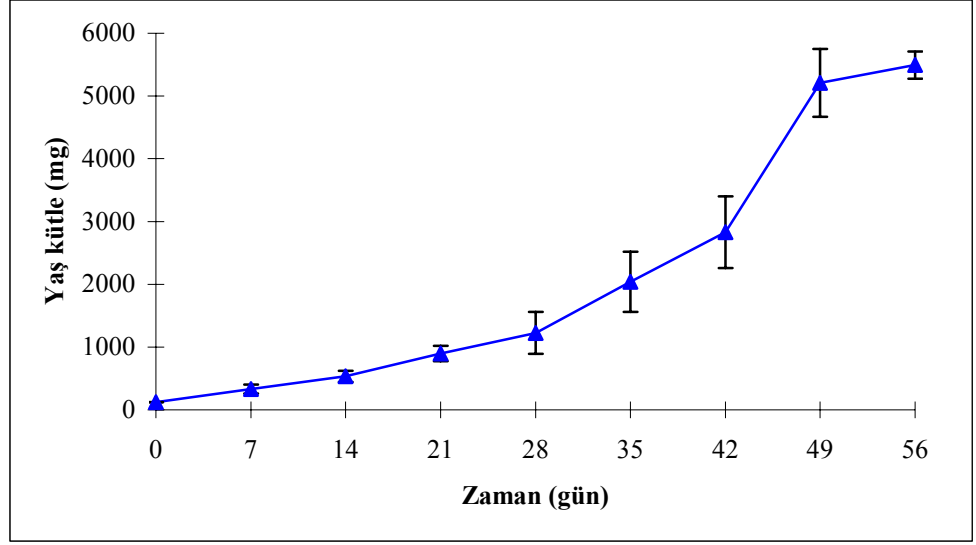
² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

³ μ (Özgün büyüme oranı)

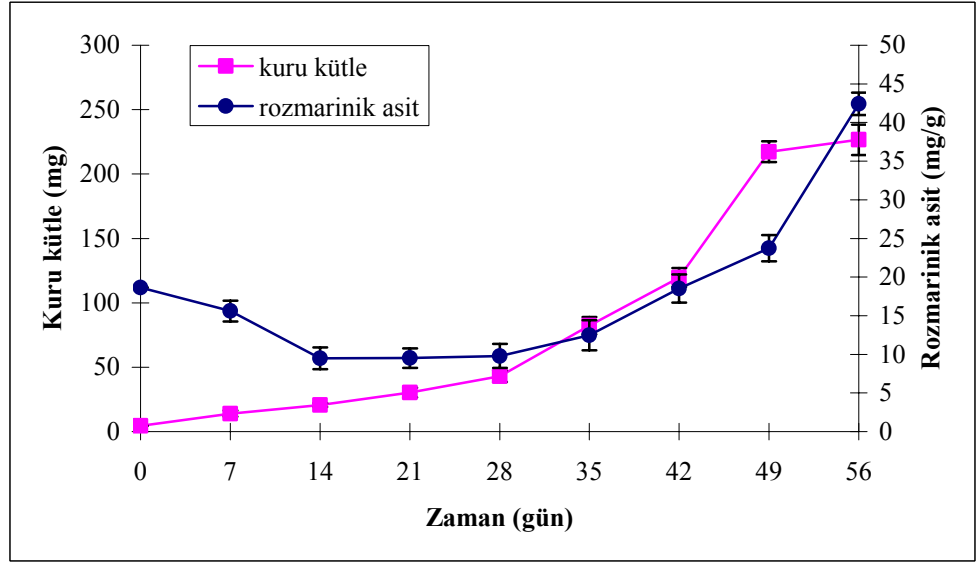
Bu uygulamada oksin/sitokinin oranı 1/ 2’dir. Burada da tipik olarak ilk 14 gün lag evresi, ardından bir log evresi (14-28. günler arası) ve daha sonra bir doğrusal artış (28 ile 49. günler arası) evresi izlendi (Şekil 3.7). 49. günden sonra ise, durağan süreç başladı. Bu uygulama sonunda (56. günde) 5493.66 ± 124.96 mg yaş biyokütle elde edildi. Kültürdeki hücrelerin özgün büyüme oranı 0.35 olarak hesaplandı.

Bu uygulamada da hücrelerin su içeriklerinde herhangi bir artış ya da azalış görülmedi. Su içeriği kültür süresi boyunca % 95.82 ile 96.63 arasında değişmiştir (Tablo 3.4).

Şekil 3.8'den de görüleceği gibi, başlangıç derişimi 18.64 mg/g olan rozmarinik asit miktarı, 0-14. günler arasında 9.49 mg/g’a gerilemiştir. Bu noktadan itibaren iki hafta boyunca sabit bir seyir izlemiştir. Kuru kütle artışının daha büyük bir ivme kazandığı 28-49. günler arasında rozmarinik asit derişimi de kademeli olarak artış göstermiştir. Son evredeki bu değişim, 56. gün sonunda, 42.42 mg/g’lık rozmarinik asit üretimi sağlamıştır.



Şekil 3.7. Uygulama 4'de büyüme eğrisi



Şekil 3.8. Uygulama 4'te kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Uygulama 5 (1.00 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA)

Bu uygulamada, B5'in temel besi ortamı ve sukroz'un karbon kaynağı olarak kullanıldığı (% 2.50, w/v) ortamda kültür yapıldı. Bitki büyüme düzenleyicileri olarak 1.00 ppm IBA ve 1.00 ppm 6-BA kullanıldı (Bölüm 2, Tablo 2.2). Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri (Tablo 3.5) ve eğrisi (Şekil 3.9) aşağıda verilmektedir.

Oksin/sitokinin oranının 1/1 olduğu bu uygulama aynı zamanda pozitif kontrol olarak değerlendirilebilir. Zira, *S. hortensis* doku kültürlerinin başlatılması ve sürdürülmesinde bu besi ortamı kullanıldı ve tüm uygulamalar için kullanılan “başlangıç” kallusları bu kültürlerden alındı.

Burada kültürde lag evresinin biraz daha uzadığı belirlendi. Çünkü kültürün t_d değerleri bu dönemde 2.00 civarındadır (Tablo 3.5). 21. günden sonra t_d değerlerinde bir azalma görüldü ve bu azalma 42. gün sonrasına kadar devam etti (Şekil 3.9). Bu dönem log evresine eşdeğerdir. Bundan sonra izlenen yaklaşık 7 günlük bir doğrusal artış evresinin ardından, hücrelerin büyüme hızında giderek belirginleşen bir azalma görüldü. 49. günden sonra görülen bu süreç durağan evredir. Kültürdeki hücrelerin özgün büyüme oranı 0.31 olarak hesaplandı. Bu daha önceki uygulamalara göre nispeten daha hızlı bir büyümenin gerçekleştiğini gösterir. Zira t_d değeri ile μ değeri arasında matematiksel olarak zıt bir ilişki vardır. Bu uygulama sonunda (56. günde) 5053.00 ± 785.35 mg yaş biyokütle elde edildi.

Tablo 3.5. Uygulama 5’de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)¹

Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 \pm 0.00
7	2.12		95.47 \pm 0.16
14	1.94		95.84 \pm 0.59
21	2.08		96.06 \pm 0.04
28	1.69	0.31	96.33 \pm 0.90
35	1.73		95.99 \pm 0.18
42	1.62		96.02 \pm 0.27
49	1.89		95.90 \pm 0.11
56	2.20		95.75 \pm 0.29

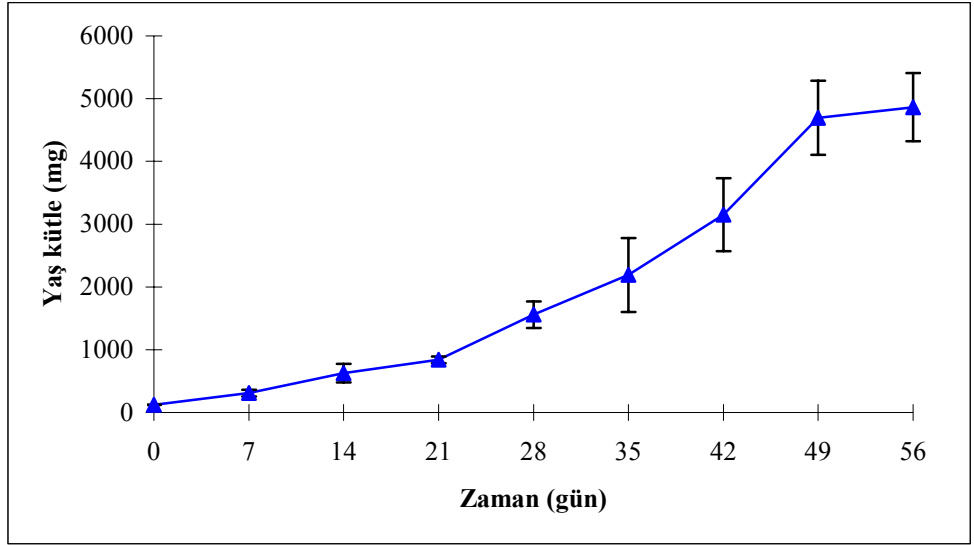
¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

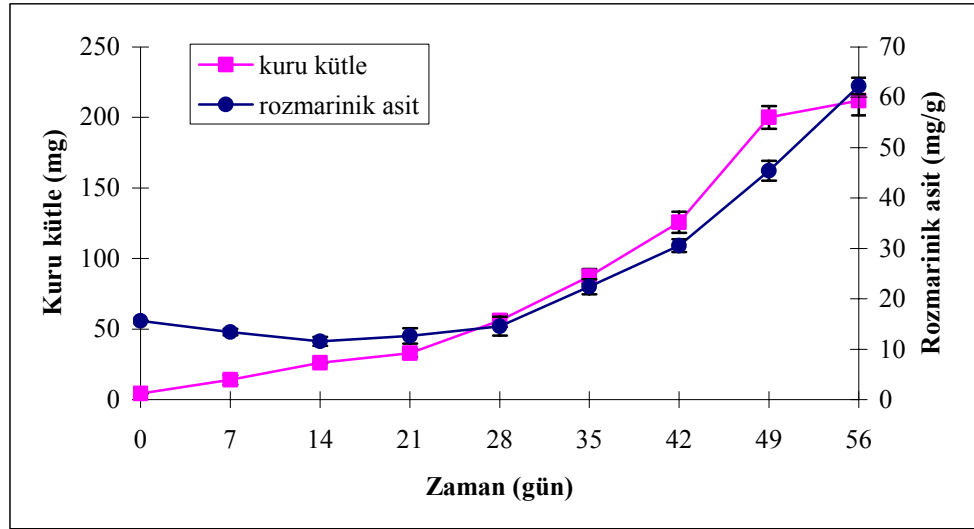
³ μ (Özgün büyüme oranı)

Kültürün başlangıcından itibaren su içeriği % 95.47-96.33 arasında değişmektedir. Bu durum, bu uygulamanın, su içeriğinde herhangi bir değişim sağlamadığı anlamına gelir.

Bu uygulamada da, daha önce değerlendirilen uygulamalarda olduğu gibi, kuru kütle esas alındığında büyüme eğrisi, yaş kütlede elde edilen eğri ile uyumludur. Burada da kuru kütle ile elde edilen grafikteki (Şekil 3.9) lag, log, doğrusal artış ve durağan evrelerin daha belirgin olduğu görülür. Kuru kütlede 0-21. günler arasındaki değişim daha yavaştır. Buna paralel olarak rozmarinik asit birikiminde de azalma görülür. Başlangıç rozmarinik asit derişimi 15.64 mg/g'dan 11.56 mg/g'a kadar gerilemiştir. Kültür kuru ağırlığı 21. günden itibaren daha hızlı artış göstermiştir. 49. güne kadar devam eden bu kütle artışı süresince rozmarinik asit birikimi giderek artmış ve 45.42 mg/g'a ulaşmıştır (Şekil 3.10). Ancak asıl artış 49-56. günler arasında görülmektedir. 56. gün sonunda rozmarinik asit derişimi 62.27 mg/g'a ulaşmıştır. Bu aynı zamanda sabit sitokin oranına karşı artan oksin oranlarının çalışıldığı bu kategori içerisindeki en yüksek rozmarinik asit derişimidir.



Şekil 3.9. Uygulama 5'te büyüme eğrisi



Şekil 3.10. Uygulama 5'te kuru kütle ve rosmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Uygulama 6 (2.00 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA)

Bu uygulamada, B5'in temel besi ortamı ve sukroz'un karbon kaynağı olarak kullanıldığı (% 2.50, w/v) ortamda kültür yapıldı. Bitki büyüme düzenleyicileri olarak 2.00 ppm IBA ve 1.00 ppm 6-BA kullanıldı (Bölüm 2, Tablo 2.2). Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri (Tablo 3.6) ve eğrisi (Şekil 3.11) aşağıda verilmektedir.

Tablo 3.6. Uygulama 6'da büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)¹

Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 ± 0.00
7	2.29		95.45 ± 0.39
14	2.11		95.43 ± 0.49
21	1.77		96.16 ± 0.22
28	1.92	0.35	96.20 ± 0.31
35	1.78		96.37 ± 0.36
42	1.61		96.16 ± 0.31
49	1.83		95.50 ± 0.03
56	1.97		95.43 ± 0.19

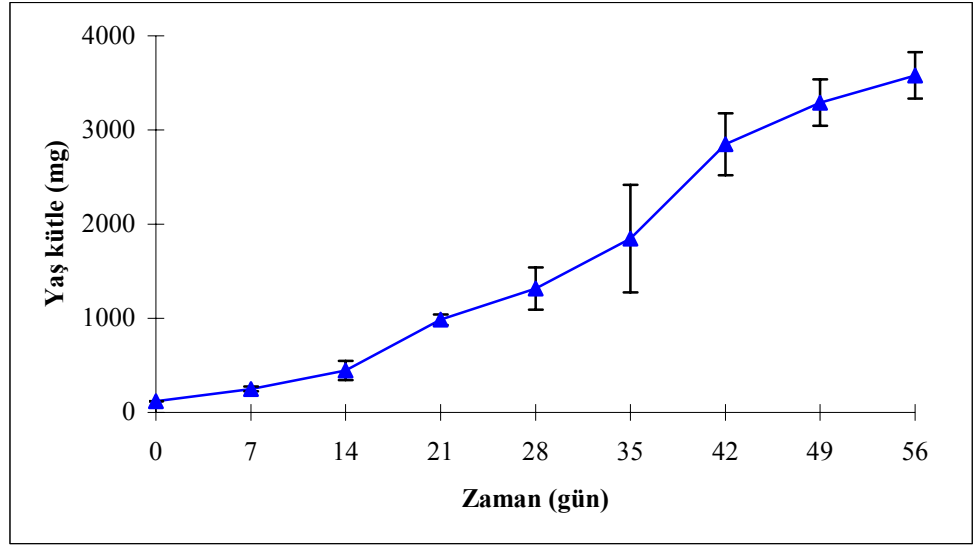
¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

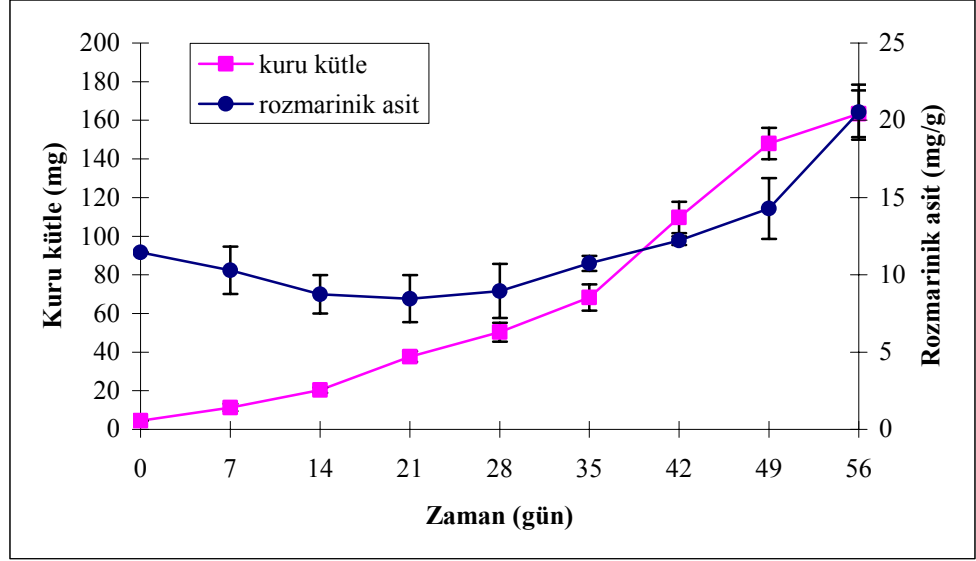
³ μ (Özgün büyüme oranı)

Oksin/sitokinin oranının 2/1 olduğu bu uygulamada da, bundan önce ele alınan uygulamalarda olduğu gibi ilk 14 gün lag evresidir. Bunu takiben bir log evresi (14-35. günler arası) ve 35 ile 42. günler arası bir doğrusal artış evresi izlendi (Şekil 3.11). Her ne kadar tam bir durağan süreç başlamış olmasa da, 42. günden sonra yaş kütle artışı yavaşladı. Bu uygulama sonunda (56. günde) 3579.33 ± 142.10 mg yaş biyokütle elde edildi. Kültürdeki hücrelerin özgül büyüme oranı 0.35 olarak tespit edildi.

Hücrelerin su içeriği % 95.43-96.37 arasındadır.



Şekil 3.11. Uygulama 6'da büyüme eğrisi



Şekil 3.12. Uygulama 6’te kuru kütlede ve rosmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Bu uygulamadan elde edilen kuru kütle, kültür başlangıcından (0. gün) 49. güne kadar kademeli olarak artmıştır (Şekil 3.12). Burada da (Şekil 3.12), yaş kütlede elde edilen grafiğe (Şekil 3.11) benzer bir eğri elde edilmekle beraber, büyüme evreleri daha belirgindir. Başlangıçta rosmarinik asit miktarı 11.46 mg/g’dır, Bu miktar 21. güne kadar azalarak 8.46 mg/g’a gerilemiştir. Bu değer aynı zamanda şimdiye kadar ele alınan ortamlarla karşılaştırıldığında en düşük olanıdır. 28-35. günler arasında yavaş bir değişim gösteren rosmarinik asit miktarı, 49-56. günler arasında 6.23 mg/g’lık bir değişim ile 20.52 mg/g’a ulaşmıştır (Şekil 3.12).

Uygulama 7 (5.00 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA)

Bu uygulamada, B5’in temel besi ortamı ve sukroz’un karbon kaynağı olarak kullanıldığı (% 2.50, w/v) ortamda kültür yapıldı. Bitki büyüme düzenleyicileri olarak 5.00 ppm IBA ve 1.00 ppm 6-BA kullanıldı (Bölüm 2, Tablo 2.2). Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri (Tablo 3.7) ve eğrisi (Şekil 3.13) aşağıda verilmektedir.

Tablo 3.7. Uygulama 7’de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%) ¹

Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 ± 0.00
7	2.40		94.81 ± 0.25
14	2.21		95.40 ± 0.56
21	1.66		95.66 ± 0.27
28	1.83	0.30	95.68 ± 0.38
35	1.78		95.75 ± 0.14
42	1.55		95.60 ± 0.03
49	1.89		95.38 ± 0.21
56	7.25		95.31 ± 0.30

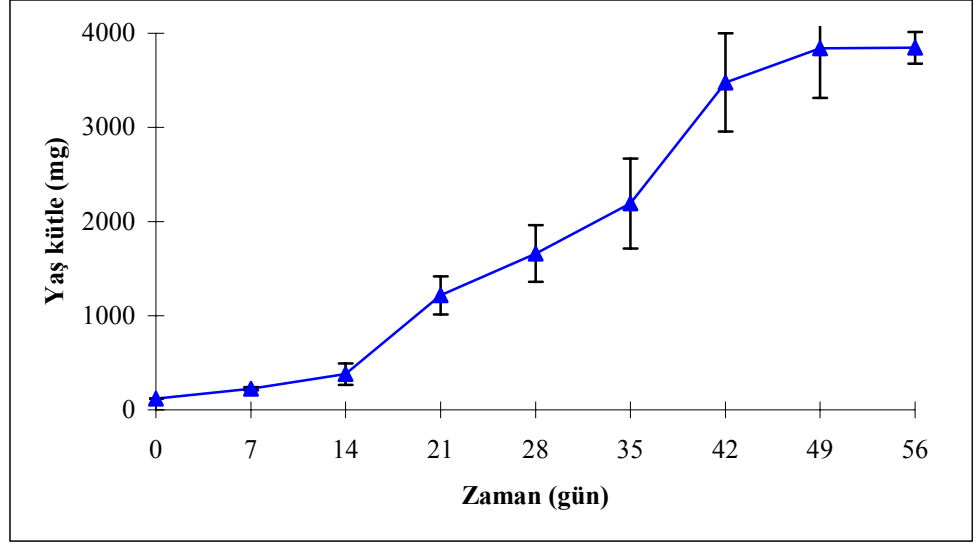
¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

³ μ (Özgün büyüme oranı)

Oksin/sitokinin oranının 5/1 olduğu bu uygulamada, lag evresinin 0-14. günler arasında gerçekleştiği belirlendi. Zira kültürün t_d değerleri bu dönemde 2.21-2.40 arasındadır (Tablo 3.7). 14. günden sonra t_d değerlerinde bir azalma görüldü ve bu azalma 42. gün sonuna kadar devam etti (Şekil 3.13). Bu dönem log evresine eşdeğerdir. Bundan sonra izlenen yaklaşık 7 günlük bir doğrusal artış evresinin ardından, hücrelerin büyüme hızında giderek belirginleşen bir azalma görüldü. 42. günden sonra görülen bu süreç durağan evredir. Kültürdeki hücrelerin özgün büyüme oranı 0.30 olarak tespit edilmiştir. Bu daha önceki uygulamalara göre nispeten daha düşük bir büyümenin gerçekleştiğini gösterir.

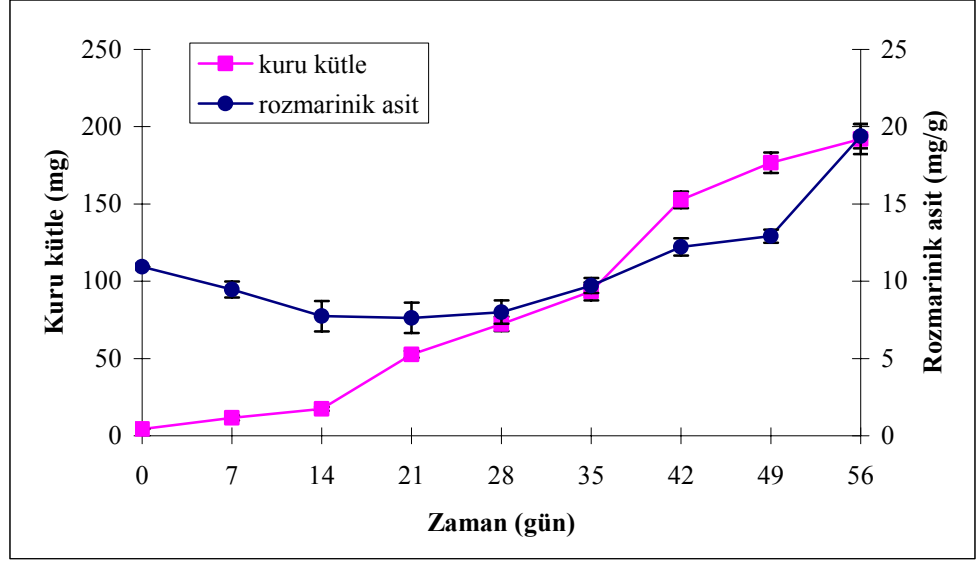
Bu uygulama sonunda (56. günde) 3845.66 ± 97.72 mg yaş biyokütle elde edildi. Hücrelerin su içerikleri % 94.81-96.33 arasındadır.



Şekil 3.13. Uygulama 7’de büyüme eğrisi

Bu uygulamada kültürdeki büyüme evrelerinin daha net belirlenmesi için kuru kütle verileri daha elverişlidir. Şekil 3.14’de görüleceği gibi, kuru kütledeki artış esas alındığında büyüme evreleri çok daha belirgindir. Bu grafiğe göre ilk 14 gün lag, 14 ile 35. günler arasındaki süreç log, 35 ile 49. günler arası doğrusal artış ve sonrası durağan evreleri temsil etmektedir.

Bu uygulamada, 0-14. günler arasında kültürün kuru kütlesi çok yavaş artarken, rosmarinik asit miktarı giderek azalmış ve 14. gün sonunda 7.74 mg/g’a kadar düşmüştür (Şekil 3.14). Log evresinde rosmarinik asit miktarı yatay bir seyir izlemiş ve lineer artış evresinde çok az artmıştır (3.20 mg/g). Son haftada kallusun kuru kütle artışı sabit bir seyir izlerken (durağan evre), rosmarinik asit miktarında hızlı bir artış görülmüş ve 56. günde miktarı 19.39 mg/g’a ulaşmıştır.



Şekil 3.14. Uygulama 7’de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Uygulama 8 (10.00 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA)

Bu uygulamada, B5’in temel besi ortamı ve sukroz’un karbon kaynağı olarak kullanıldığı (% 2.50, w/v) ortamda kültür yapıldı. Bitki büyüme düzenleyicileri olarak 10.00 ppm IBA ve 1.00 ppm 6-BA kullanıldı (Bölüm 2, Tablo 2.2). Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri (Tablo 3.8) ve eğrisi (Şekil 3.15) aşağıda verilmektedir.

Oksin/sitokinin oranının 10/1 olduğu bu uygulamada ilk 21 günlük süreç lag evresine eşdeğerdir. Bunu takiben bir log evresi (21-42. günler arası) ve 42 ile 49. günler arası bir doğrusal artış evresi izlendi (Şekil 3.15). 49. günden sonra ise durağan süreç başladı. Zira bu dönemde iki katına çıkış süresi (t_d) 2.16 gün olarak gerçekleşti. Bu uygulama sonunda (56. günde) 3122.66 ± 475.28 mg yaş biyokütle elde edildi. Kültürdeki hücrelerin özgül büyüme oranı 0.32’dir.

Hücrelerin ortalama su içerikleri % 94.91-96.45 arasındadır.

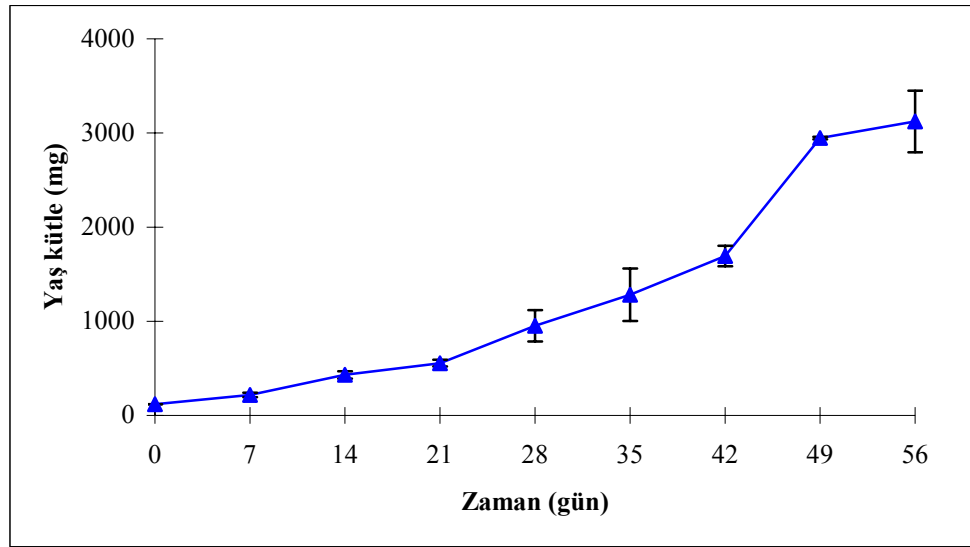
Tablo 3.8. Uygulama 8’de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%) ¹

Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 ± 0.00
7	2.44		94.91 ± 0.83
14	2.08		95.65 ± 0.17
21	2.31		95.86 ± 0.17
28	1.86	0.32	96.45 ± 0.23
35	1.92		95.34 ± 0.99
42	1.85		95.86 ± 0.42
49	1.56		96.13 ± 0.70
56	2.16		95.93 ± 0.86

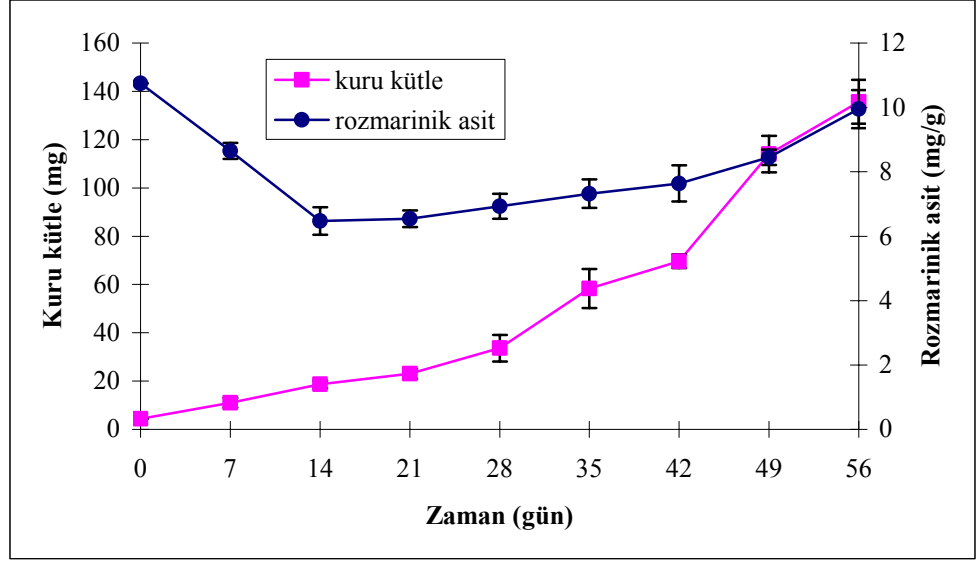
¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

³ μ (Özgün büyüme oranı)

**Şekil 3.15.** Uygulama 8’de büyüme eğrisi

Kültürlerden elde edilen kuru kütlede, ilk 21 gün yavaş bir artış görülmektedir. Bu esnada rosmarinik asit miktarı da 4.28 mg/g’lık bir azalma ile 6.47 mg/g'a düşmüştür. Rosmarinik asit miktarında 14-28. günler arasında çok fazla değişim görülmemiştir. Kuru kütle miktarı 28. günden itibaren daha yüksek artış göstererek 49. gün sonunda 114.00 mg'a yükselmiştir. Bu noktaya kadar yavaş bir artış gösteren rosmarinik asit birikimi, son hafta içerisinde 1.50 mg/g’lık bir değişim göstererek 9.95 mg/g'a ulaşmıştır.



Şekil 3.16. Uygulama 8’de kuru kütlede ve rosmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Uygulama 9 (1.00 ppm IBA + 0.00 ppm 6-BA)

Bu uygulamada, B5’in temel besi ortamı ve sukroz’un karbon kaynağı olarak kullanıldığı (% 2.50, w/v) ortamda kültür yapıldı. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak sadece 1.00 ppm IBA kullanıldı (Bölüm 2, Tablo 2.2). Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri (Tablo 3.9) ve eğrisi (Şekil 3.17) aşağıda verilmektedir.

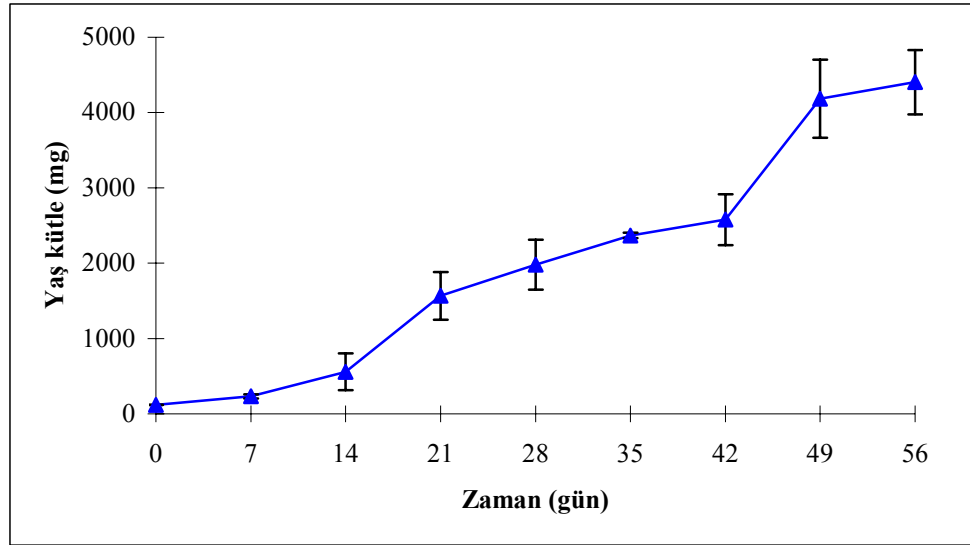
Tablo 3.9. Uygulama 9’da büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%) ¹

Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 ± 0.00
7	2.36		96.33 ± 1.17
14	1.92		94.47 ± 2.86
21	1.61		96.31 ± 0.83
28	1.85	0.33	96.67 ± 0.88
35	1.87		96.50 ± 0.46
42	2.09		96.72 ± 0.19
49	1.51		96.43 ± 0.18
56	2.06		96.19 ± 1.46

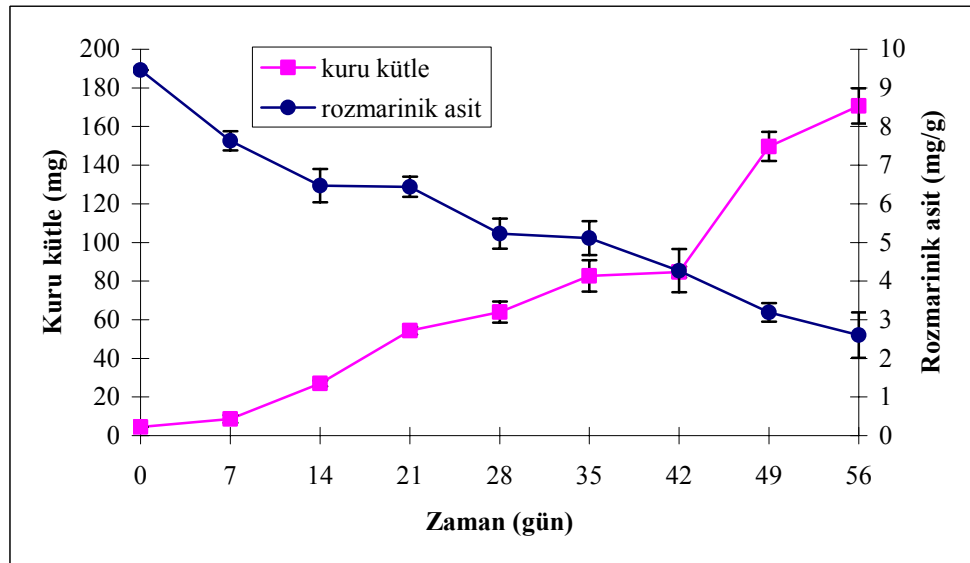
¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

³ μ (Özgün büyüme oranı)



Şekil 3.17. Uygulama 9'da büyüme eğrisi



Şekil 3.18. Uygulama 9'da kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Bu uygulamada da, buraya kadar verilen uygulamaların pek çoğunda olduğu gibi lag evresinin 0-14. günler arasında gerçekleştiği belirlendi. Zira kültürün t_d değerleri bu dönemde 2.36'dır (Tablo 3.9). 14. günden sonra t_d değerlerinde bir azalma görüldü ve bu azalma 42. gün sonrasına kadar devam etti (Şekil 3.17). Bu dönem log evresine eşdeğerdir. Bundan sonra izlenen yaklaşık 7 günlük bir

doğrusal artış evresinin ardından, hücrelerin büyüme hızında giderek belirginleşen bir azalma görüldü. 49. günden sonra görülen bu süreç durağan evredir. Kültürdeki hücrelerin özgün büyüme oranı 0.33 olarak tespit edildi. Bu uygulama sonunda (56. günde) 4404.33 ± 703.65 mg yaş biyokütle elde edildi.

Bu uygulama hücrelerin ortalama su içeriği % 94.47-96.72 arasındadır.

Sadece 1.00 ppm IBA kullanıldığı ve sitokinin olarak 6-BA'nın yer almadığı bu uygulamada kuru kütle esas alındığında, lag süresinin daha kısa (7-8 gün) olduğu görülecektir. Diğer evreler ise yaş kütledeki gibidir (Şekil 3.17). Ancak diğer uygulamalardan farklı olarak, asıl çarpıcı gelişme rozmarinik miktarda görülen sürekli azalıştır.

Bu uygulamada, başlangıçtan 35. güne kadar kuru kütlede bir sürekli artış gözlenmiştir (Şekil 3.18). 35-42. günler arasında sabit bir seyir izleyen kuru kütle artışı 49. güne kadar oldukça hızlı değişim sergilemiştir. Diğer yandan rozmarinik asit miktarı 0. günde 9.46 mg/g iken, kültür periyodunun sonuna kadar düzenli bir şekilde düşüş göstermiştir. Özellikle 3. ve 5. haftalarda miktarda durağanlık tespit edilmiştir. Sekiz haftalık kültür periyodu tamamlandığında, rozmarinik asit miktarı 6.86 mg/g azalarak 2.60 mg/g'a gerilemiştir.

Uygulama 10 (1.00 ppm IBA + 0.10 ppm 6-BA)

Bu uygulamada, B5'in temel besi ortamı ve sukroz'un karbon kaynağı olarak kullanıldığı (% 2.50, w/v) ortamda kültür yapıldı. Bitki büyüme düzenleyicileri olarak 1.00 ppm IBA ve 0.10 ppm 6-BA kullanıldı (Bölüm 2, Tablo 2.2). Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri (Tablo 3.10) ve eğrisi (Şekil 3.19) aşağıda verilmektedir.

Uygulama 8'de olduğu gibi, bu uygulamada da oksin/sitokinin oranı 10/1'dir. Burada gerek oksin (IBA) ve gerekse sitokinin derişimleri 10 kat azaltılarak, sırasıyla 1.00 ve 0.10 ppm'e, düşürülmüştür.

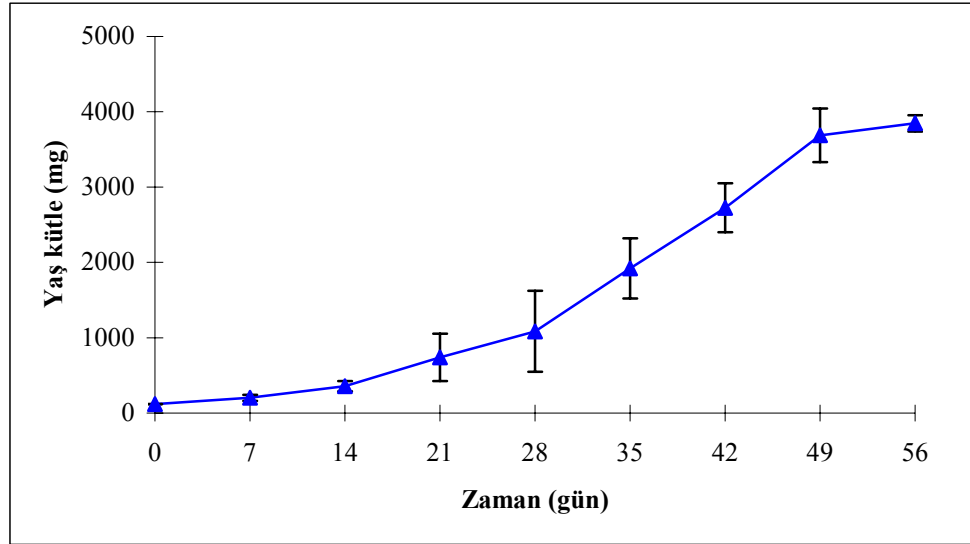
Tablo 3.10. Uygulama 10'da büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%) ¹

Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 ± 0.00
7	2.53		96.12 ± 1.58
14	2.21		95.96 ± 2.32
21	1.88		95.87 ± 2.60
28	1.91	0.31	96.54 ± 0.64
35	1.66		96.46 ± 0.57
42	1.66		96.83 ± 0.18
49	1.62		97.51 ± 0.07
56	2.20		97.48 ± 0.20

¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

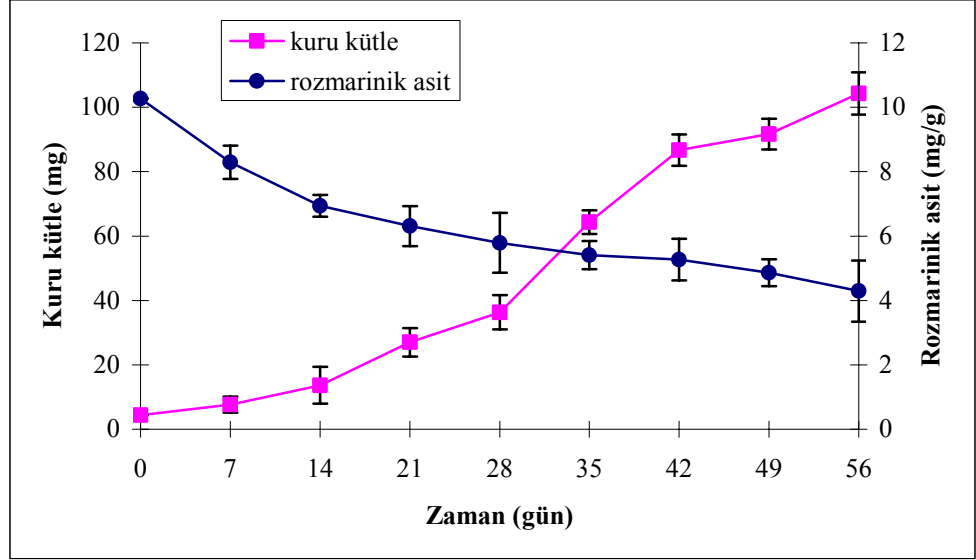
² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

³ μ (Özgün büyüme oranı)

**Şekil 3.19.** Uygulama 10'da büyüme eğrisi

Diğer uygulamalarda da görüldüğü gibi, bu uygulamada kültürler 0-14. günler arasında düşük bir büyüme hızı gösterdi ($t_d = 2.53$). Bu dönem, kültürlerin besi ortamına uyum göstermeye çalıştıkları lag evresine eşdeğerdir. 14. günden itibaren kültürlerde oldukça hızlı bir büyüme gözlemlendi (log evresi). Şekil 3.19'daki büyüme eğrisi, log evresinin 14 ile 28. günler arasında olduğunu ve bunu 21 günlük bir doğrusal (doğrusal) artış evresinin izlediğini göstermektedir. 49. günden itibaren kültürün t_d değerinde artış görüldü (Tablo 3.10). Bu değer

kültürlerin durağan evreye girdiğini göstermektedir. Kültürdeki hücrelerin özgül büyüme oranı 0.31 olarak tespit edildi. Bu uygulama sonunda (56. günde) 3847.00 ± 61.53 mg yaş biyokütle elde edildi. Hücrelerin su içeriği bu ortamda daha önce ele alınan ortamlara göre artış gösterdi (% 95.87-97.51).



Şekil 3.20. Uygulama 10'da kuru kütle ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Şekil 3.20 de gösterilen rozmarinik asit birikimindeki azalış, bir önceki uygulamada verilen grafiğe (Şekil 3.18) benzerlik göstermektedir. Kuru kütle, kültür başlangıcından 42. güne kadar artış göstermiştir. Bu noktadan kültür periyodunun sonuna kadar kuru kütlede sadece 10.00 mg'lık bir artış meydana gelmiştir. Buna karşılık rozmarinik asit miktarı başlangıçta 10.27 mg/g iken, 56. gün sonunda 5.98 mg/g'lık bir azalma ile 4.29 mg/g' a düşmüştür (Şekil 3.20).

Uygulama 11 (1.00 ppm IBA + 0.50 ppm 6-BA)

Bu uygulamada, B5'in temel besi ortamı ve sukroz'un karbon kaynağı olarak kullanıldığı (% 2.50, w/v) ortamda kültür yapıldı. Bitki büyüme düzenleyicileri olarak 1.00 ppm IBA ve 0.50 ppm 6-BA kullanıldı (Bölüm 2, Tablo 2.2). Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri (Tablo 3.11) ve eğrisi (Şekil 3.21) aşağıda verilmektedir.

Oksin/sitokinin oranının 2/1 olduğu bu uygulama, uygulama 6 ile karşılaştırılabilir. Ancak burada her iki büyüme düzenleyicisi de iki kat azaltılmıştır. Burada da ilk 14 günlük süreç lag evresine eşdeğerdir. Bunu takiben bir log evresi (14-42. günler arası) ve 42 ile 49. günler arası kısa bir doğrusal artış evresi izlendi (Şekil 3.21). 49. günden sonra ise durağan süreç başladı. Zira bu dönemde iki katına çıkış süresi (t_d) 1.84 gün olarak gerçekleşti (Tablo 3.11). Kültürdeki hücrelerin özgün büyüme oranı 0.37'dir. Bu değer buraya kadar verilen uygulamalar göz önüne alındığında oldukça yüksektir. Çünkü bu uygulama sonunda (56. günde) 9293.66 ± 983.66 mg yaş biyokütle elde edildi. Bu uygulamada, hücrelerin su içeriği % 96.20-97.42 arasındadır.

Tablo 3.11. Uygulama 11'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%) ¹

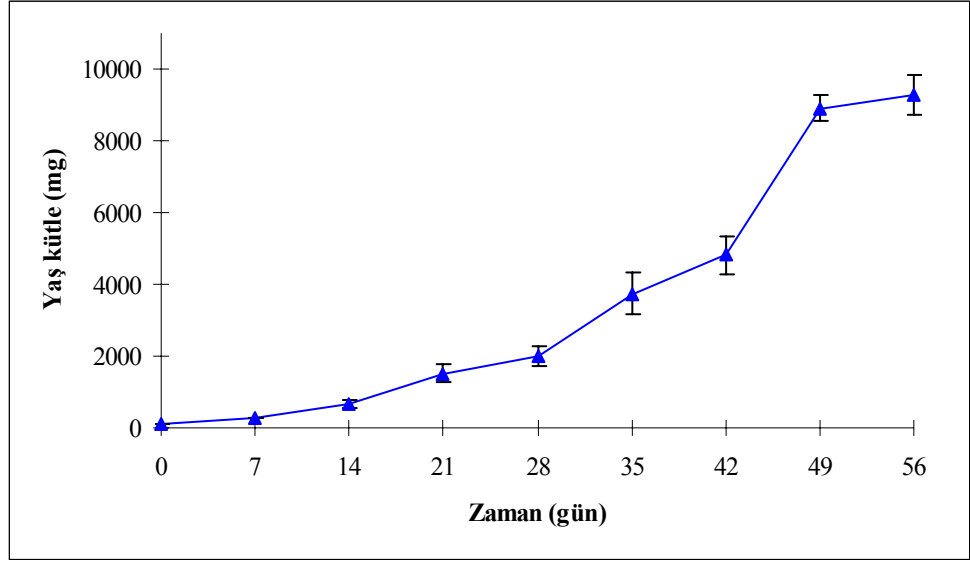
Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 \pm 0.00
7	2.20		96.20 \pm 0.65
14	1.86		96.62 \pm 0.50
21	1.65		96.81 \pm 0.39
28	1.82	0.37	96.66 \pm 0.27
35	1.49		96.58 \pm 0.22
42	1.60		96.51 \pm 0.25
49	1.40		97.38 \pm 0.33
56	1.84		97.42 \pm 0.27

¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

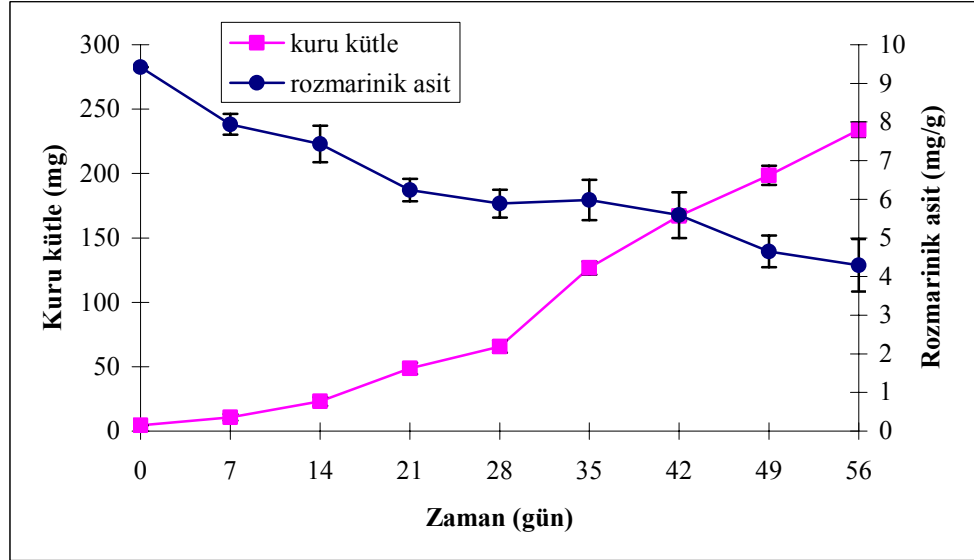
² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

³ μ (Özgün büyüme oranı)

Kuru kütle verileri esas alındığında da benzer bir büyüme eğrisi görülmektedir (Şekil 3.22). Kuru kütle 49. gün sonunda 198.66 mg'a ulaşmıştır. Kuru kütledeki artış son hafta içerisinde oldukça düşük seyretmiştir. Buna karşılık, rosmarinik asit miktarı başlangıçta 9.42 mg/g iken, 21. günde 5.89 mg/g'a düşmüştür. 21-35. günler arasında birikimde nispeten yavaş bir değişim görülmüş, 35. günden itibaren tekrar düşüşe geçmiş ve sonuçta 4.29 mg/g'lık bir verim elde edildi.



Şekil 3.21. Uygulama 11'de büyüme eğrisi



Şekil 3.22. Uygulama 11'de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Uygulama 12 (1.00 ppm IBA + 2.00 ppm 6-BA)

Bu uygulamada, B5'in temel besi ortamı ve sukroz'un karbon kaynağı olarak kullanıldığı (% 2.50, w/v) ortamda kültür yapıldı. Bitki büyüme düzenleyicileri olarak 1.00 ppm IBA ve 2.00 ppm 6-BA kullanıldı (Bölüm 2, Tablo 2.2). Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri (Tablo 3.12) ve eğrisi (Şekil 3.23) aşağıda verilmektedir.

Oksin/sitokinin oranının 1/2 olduğu bu uygulama, daha önce değerlendirilen uygulama 4 ile karşılaştırılabilir. Ancak uygulama 12’de her iki büyüme düzenleyicisinin de derişimi artmıştır. Burada da kültürler, diğer uygulamalarda olduğu gibi, 0-14. günler arasında düşük bir büyüme hızı gösterdi ($t_d = 2.21$). Bu dönem, kültürlerin besi ortamına uyum göstermeye çalıştıkları lag evresine eşdeğerdir. 14. günden itibaren kültürlerde oldukça hızlı bir büyüme gözlendi (log evresi). Şekil 3.23’deki büyüme eğrisi, log evresinin 14 ile 35. günler arasında olduğunu ve bunu 15 günlük bir doğrusal (doğrusal) artış evresinin izlediğini göstermektedir. 49. günden itibaren kültürün t_d değerinde artış görüldü (Tablo 3.12). Bu değer kültürlerin durağan evreye girdiğini göstermektedir. Kültürdeki hücrelerin özgün büyüme oranı 0.36 olarak tespit edildi. Bu uygulama sonunda (56. günde) 8572.66 ± 1023.65 mg yaş biyokütle elde edildi. Hücrelerin su içeriği % 95.40-97.59 arasında değişim gösterdi.

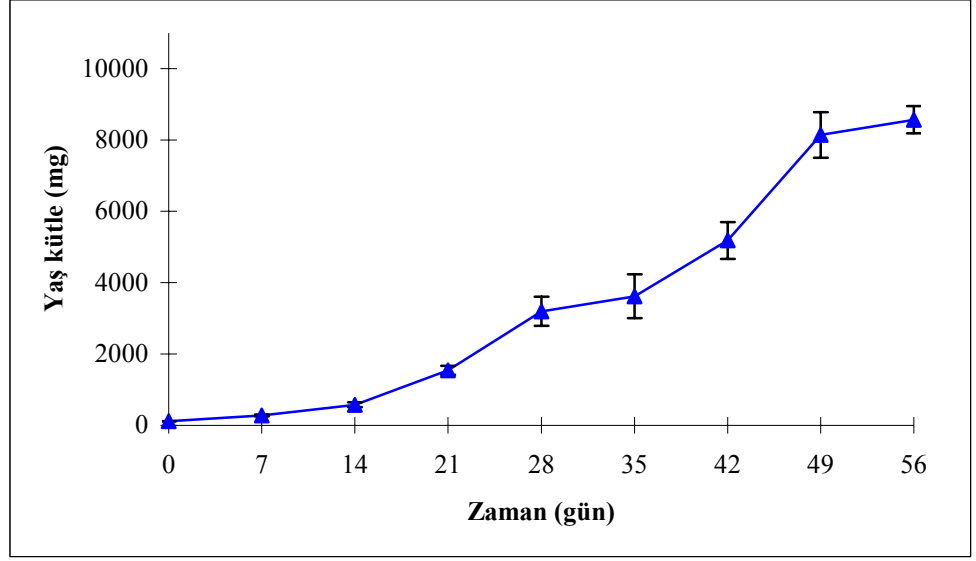
Tablo 3.12. Uygulama 12’de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%) ¹

Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 \pm 0.00
7	2.21		95.40 \pm 0.92
14	1.95		96.00 \pm 0.28
21	1.62		96.99 \pm 0.26
28	1.50	0.36	97.16 \pm 0.08
35	1.84		96.91 \pm 0.23
42	1.51		97.09 \pm 0.07
49	1.49		97.59 \pm 1.03
56	1.91		97.59 \pm 0.24

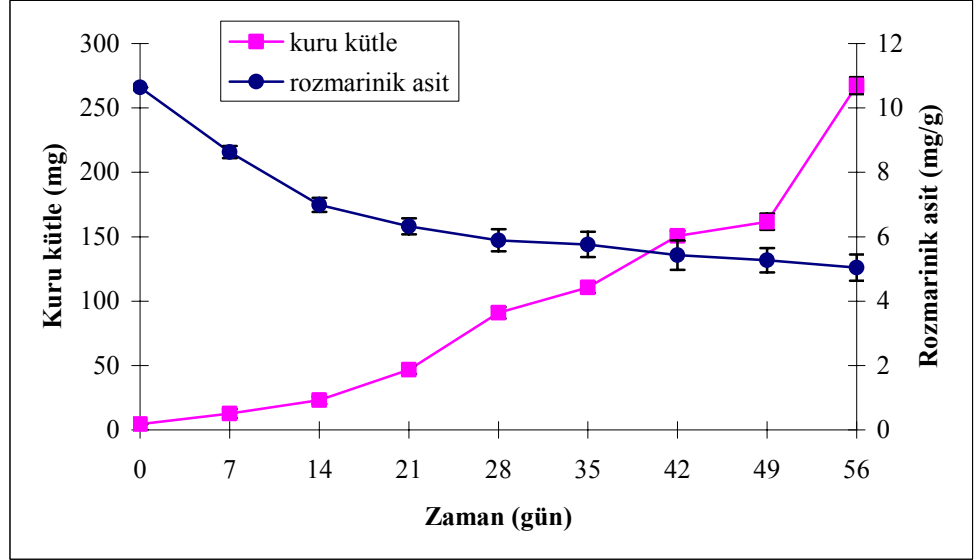
¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

³ μ (Özgün büyüme oranı)



Şekil 3.23. Uygulama 12’de büyüme eğrisi



Şekil 3.24. Uygulama 12’de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Şekil 3.24'den de görülebileceği gibi, kuru kütle miktarı 28. ve 42. günlerde direnç noktaları ile karşılaşmıştır. Kuru kütle değişim grafiğinin tümü birlikte değerlendirilecek olursa, kültür periyodunun başlangıcından sonuna kadar geçen süre içerisinde sürekli artış kaydedildiği söylenebilir. Bu uygulamada da, son üç uygulamada olduğu gibi, rozmarinik asit miktarı zamana bağlı olarak azalma

eğilimindedir. 0. günde 10.64 mg/g olan miktar, 56. gün sonunda 5.04 mg/g olarak hesaplanmıştır.

Uygulama 13 (1.00 ppm IBA + 5.00 ppm 6-BA)

Bu uygulamada, B5'in temel besi ortamı ve sukroz'un karbon kaynağı olarak kullanıldığı (% 2.50, w/v) ortamda kültür yapıldı. Bitki büyüme düzenleyicileri olarak 1.00 ppm IBA ve 5.00 ppm 6-BA kullanıldı (Bölüm 2, Tablo 2.2). Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri (Tablo 3.13) ve eğrisi (Şekil 3.25) aşağıda verilmektedir.

Tablo 3.13. Uygulama 13'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%) ¹

Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 ± 0.00
7	2.15		96.09 ± 1.35
14	2.39		95.78 ± 0.12
21	1.77		96.18 ± 0.41
28	1.52	0.34	97.21 ± 0.26
35	1.43		97.54 ± 0.15
42	1.49		97.46 ± 0.10
49	1.38		97.35 ± 0.17
56	1.99		97.20 ± 0.20

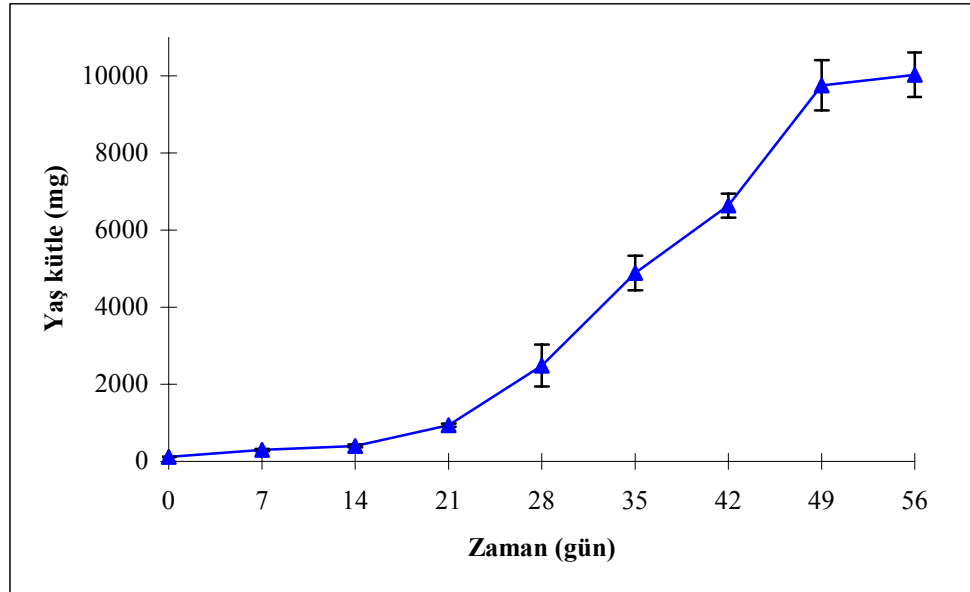
¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

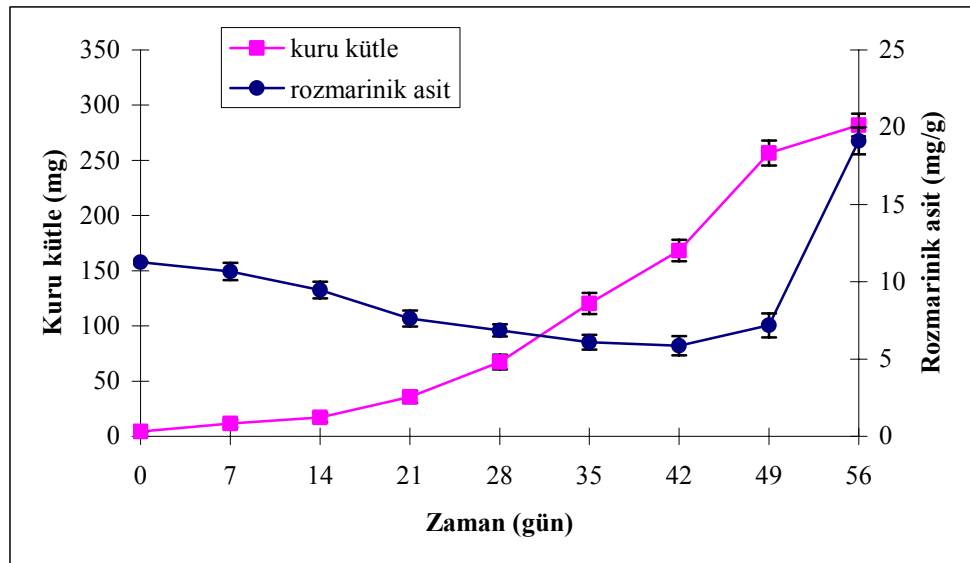
³ μ (Özgün büyüme oranı)

Oksin/sitokinin oranının 1/5 olduğu bu uygulamada ilk 14 günlük süreç lag evresine eşdeğerdir. Bunu takiben bir çok kısa bir log evresi (14-21. günler arası) ve 21 ile 49. günler arası bir doğrusal artış evresi izlendi (Şekil 3.25). 49. günden sonra ise durağan süreç başladı. Zira bu dönemde iki katına çıkış süresi (t_d) 1.99 gün olarak gerçekleşti (Tablo 3.13). Kültürdeki hücrelerin özgün büyüme oranı 0.34'tür. Bu uygulama sonunda (56. günde) 10023.33 ± 927.86 mg yaş biyokütle elde edildi.

Diğer ortamlarda olduğu gibi bu ortamda da hücrelerin su içeriği oldukça yüksektir (% 95.78-97.54).



Şekil 3.25. Uygulama 13'de büyüme eğrisi



Şekil 3.26. Uygulama 13'de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Kuru kütle değişimi de benzer büyüme eğrisi vermektedir (Şekil 3.26). Bu kültür ortamında 0-14. günler arasında kuru kütle değişimi 12.60 mg olarak gerçekleşmiştir. Ancak asıl değişim 14-49. günler arasında görülmektedir. Son hafta içerisinde durağan döneme girildiği görülmektedir. Bu uygulamada asıl ilgi

çekici gelişme rozmarinik asit miktarındaki değişimdir. Sabit oksin (IBA-1.00 ppm) derişimine karşı giderek artan sitokinin (6-BA) derişimlerinin uygulandığı son üç uygulamanın aksine, rozmarinik asit 0-42. günler arasında giderek azalmış ve daha sonra, yani 42-56. günler arasında ise 13.25 mg/g'lık bir artış göstermiştir. Rozmarinik asit birikimindeki en hızlı artış 49-56. günler arasında gerçekleşmiştir. Diğer taraftan, sabit oksin derişimine karşı giderek artan sitokinin derişimlerinin uygulandığı bu grup içerisinde en yüksek rozmarinik asit miktarı bu uygulamadan elde edilmiştir (19.11 ± 0.39 mg/g).

Uygulama 14 (1.00 ppm IBA + 10.00 ppm 6-BA)

Bu uygulamada, B5'in temel besi ortamı ve sukroz'un karbon kaynağı olarak kullanıldığı (% 2.50, w/v) ortamda kültür yapıldı. Bitki büyüme düzenleyicileri olarak 1.00 ppm IBA ve 10.00 ppm 6-BA kullanıldı (Bölüm 2, Tablo 2.2). Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri (Tablo 3.14) ve eğrisi (Şekil 3.27) aşağıda verilmektedir.

Tablo 3.14. Uygulama 14'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%) ¹

Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 \pm 0.00
7	2.36		94.79 \pm 0.53
14	4.49		94.43 \pm 0.51
21	1.95		94.87 \pm 0.39
28	1.91	0.36	95.54 \pm 0.61
35	1.95		95.74 \pm 0.77
42	1.83		95.62 \pm 0.65
49	1.79		95.46 \pm 1.01
56	1.92		95.96 \pm 0.52

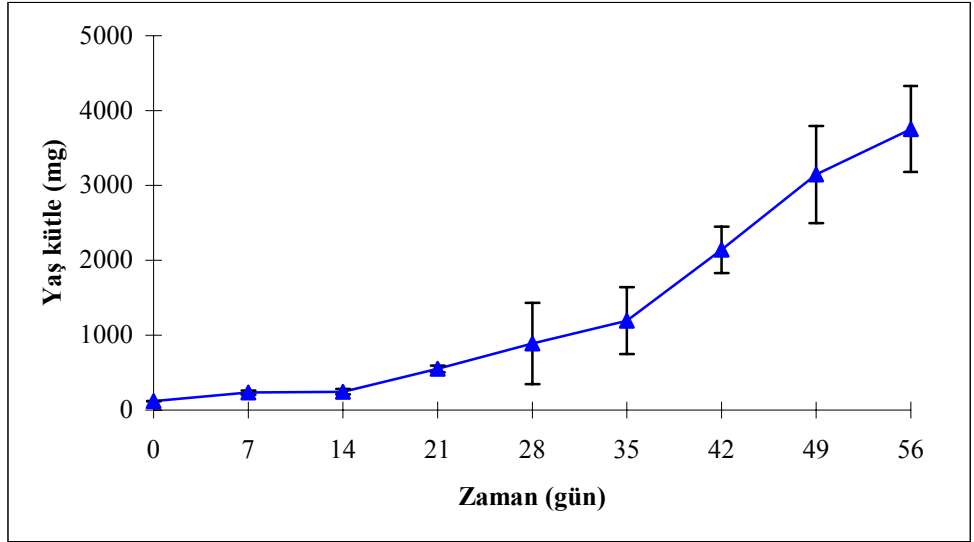
¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

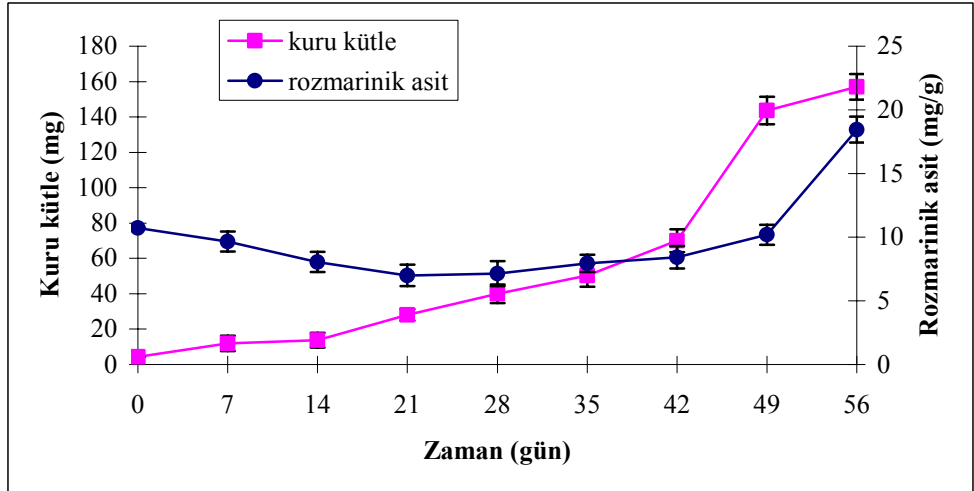
³ μ (Özgün büyüme oranı)

Oksin/sitokinin oranının 1/10 olduğu bu uygulama, daha önce değerlendirilen uygulama 3 ile karşılaştırılabilir. Ancak uygulama 14'te her iki büyüme düzenleyicinin derişimi de 10 kat artırılmıştır. Şekil 3.27'de, yaş kütle esas alınarak elde edilen büyüme grafiği oldukça yayvan bir plato çizmektedir. Bu

evrelerin daha net değerlendirilebilmesi için zamana bağlı olarak kuru kütledeki değişimleri gösteren Şekil 3.28'deki büyüme eğrisi esas alınmıştır. Burada ilk 14 günlük süreç lag evresidir. Bunu bir log evresi (14-35. günler arası) ve bir doğrusal artış evresi (35 ile 49. günler arası) izlemiştir. Her ne kadar durağan evre net olarak görülemese de 49. günden sonra ise büyüme yavaşlamıştır. Bu uygulama sonunda (56. günde) 3753.33 ± 278.12 mg yaş biyokütle elde edildi. Kültürdeki hücrelerin özgün büyüme oranı 0.36'dır. Bu ortamda hücrelerin su içeriği % 94.43-96.33 arasındadır.



Şekil 3.27. Uygulama 14'te büyüme eğrisi



Şekil 3.28. Uygulama 14'te kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Başlangıçta 10.72 mg/g olan rozmarinik asit miktarı 21. güne kadar giderek azalmıştır. 21-35. günler arasında miktarda fazla bir değişim görülmemiş, ancak bu noktadan kültür periyodunun sonuna kadar 10.51 mg/g'lık bir değişim ile 18.45 mg/g'a ulaşmıştır. Bu değer aynı zamanda bu kategoride 13 no'lu uygulamadan sonra elde edilen ikinci en yüksek değerdir (Şekil 3.28).

3.2. Farklı Sukroz Derişimlerinin Büyüme, Su İçeriği (%) ve Rozmarinik Asit Birikimi Üzerine Etkileri

Sukroz derişimlerinin etkilerinin araştırıldığı aşağıdaki uygulamalarda, büyüme düzenleyicilerinin derişimi sabit kalacak şekilde, sukroz derişimleri artırıldı. Büyüme düzenleyicileri olarak 1.00 ppm IBA ve 1.00 ppm 6-BA kullanıldı. Burada da kallus kültürü sürekli karanlık ortamda yapıldı.

Uygulama 15 (1.00 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA + % 1.0 sukroz)

Bu uygulamada karbon kaynağı olarak % 1.0 (w/v) sukroz kullanıldı. Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri Tablo 3.15'te ve büyüme eğrisi ise Şekil 3.29'da verilmektedir.

Tablo 3.15. Uygulama 15'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%) ¹

Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 ± 0.00
7	2.51		94.20 ± 0.73
14	2.34		94.13 ± 0.89
21	1.93		95.35 ± 0.35
28	1.71	0.34	96.21 ± 0.22
35	1.96		96.75 ± 0.16
42	2.07		96.87 ± 0.99
49	2.51		96.73 ± 0.88
56	1.86		97.05 ± 0.30

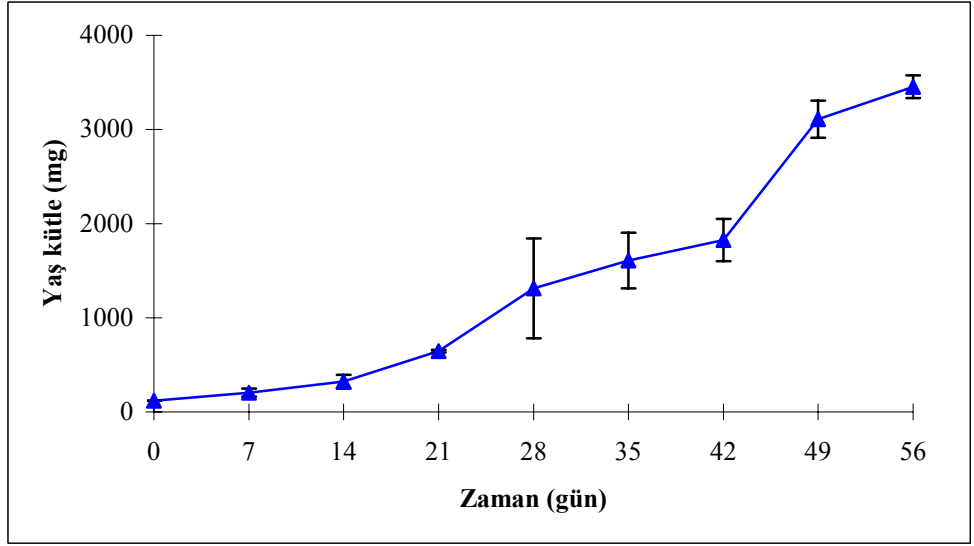
¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

² t_d (İki katna çıkış süresi, gün)

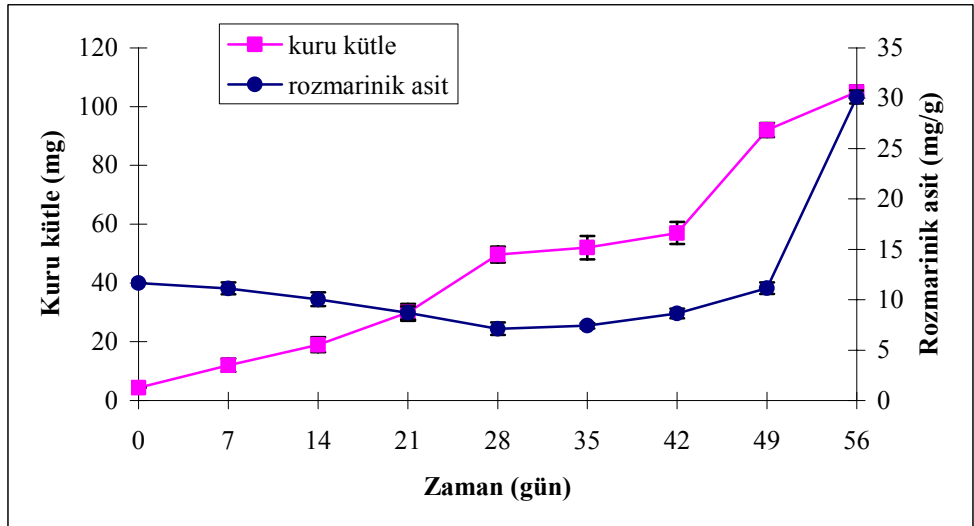
³ μ (Özgün büyüme oranı)

Yaş kütle değerleri esas alındığında, 0-14. günler arasında gerçekleşen bir lag evresini takiben 14-42. günler arasında log ve 42-49. günler arasında lineer

artış evreleri gerçekleşmiştir. 49. günden itibaren durağan süreç başlamıştır (Şekil 3.29). Kültürdeki hücrelerin özgül büyüme oranı 0.34'tür. Bu uygulamanın son gününde 3454.00 ± 41.18 mg yaş biyokütle elde edildi. Bu uygulamada hücrelerin su içeriği % 94.13 ile 97.05 arasındadır.



Şekil 3.29. Uygulama 15'de büyüme eğrisi



Şekil 3.30. Uygulama 15'de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Bu uygulamada zamana bağılı olarak kuru kütle ve rozmarinik asit birikimindeki değişim Şekil 3.30' da gösterilmektedir. İlk 28 günde kuru kütle 45.26 mg'lık bir artışla 49.66 mg'a ulaşmış, ancak daha sonra artışta önemli bir yavaşlama görülmüştür. 56. gün sonunda 105.00 mg'lık bir kuru kütle değerine ulaşılmıştır. Diğer taraftan rozmarinik asit miktarı 28. gün sonuna kadar hızlı bir düşüş göstererek 7.13 mg/g'a gerilemiş ve sonraki günlerde yeniden artış göstererek 56. günde 30.12 mg/g'a ulaşmıştır.

Uygulama 16 (1.00 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA + % 2.0 sukroz)

Bu uygulamada karbon kaynağı olarak % 2.0 (w/v) sukroz kullanıldı. Kültürlerin zamana bağılı büyüme kinetikleri Tablo 3.16'da ve büyüme eğrisi ise Şekil 3.31'de verilmektedir.

Bu uygulamada da kültürlerde 0-14. günler arasında yavaş bir büyüme görüldü ($t_d = 2.70$). Bu dönem, lag evresidir. Yaş kütleinin zamana karşı değişimini gösteren ve Şekil 3.31'de verilen büyüme eğrisinde log evresinin 14 ile 42. günler arasında olduğu, bunu bir haftalık bir doğrusal (doğrusal) artış evresinin izlediği belirlendi. 49. günden itibaren kültürün t_d değerindeki artış (Tablo 3.16) kültürlerin durağan evreye girdiğini gösterdi. Kültürdeki hücrelerin özgün büyüme oranı 0.37 olarak hesaplandı. Bu uygulama sonunda (56. günde) 5445.66 ± 524.37 mg yaş biyokütle elde edildi. Uygulama süresince hücrelerin su içeriği % 91.37 ile 96.43 arasında değişmiştir.

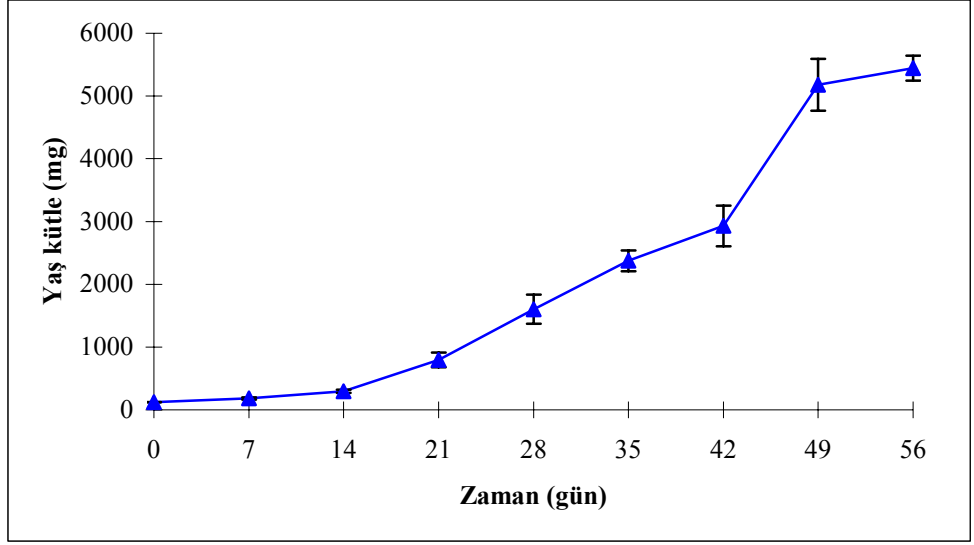
Tablo 3.16. Uygulama 16'da büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%)¹

Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 \pm 0.00
7	2.70		91.37 \pm 0.70
14	2.35		93.43 \pm 1.29
21	1.79		95.96 \pm 0.36
28	1.66	0.37	96.25 \pm 0.48
35	1.68		96.03 \pm 0.54
42	1.76		96.21 \pm 0.07
49	1.77		96.32 \pm 0.06
56	1.98		96.43 \pm 0.63

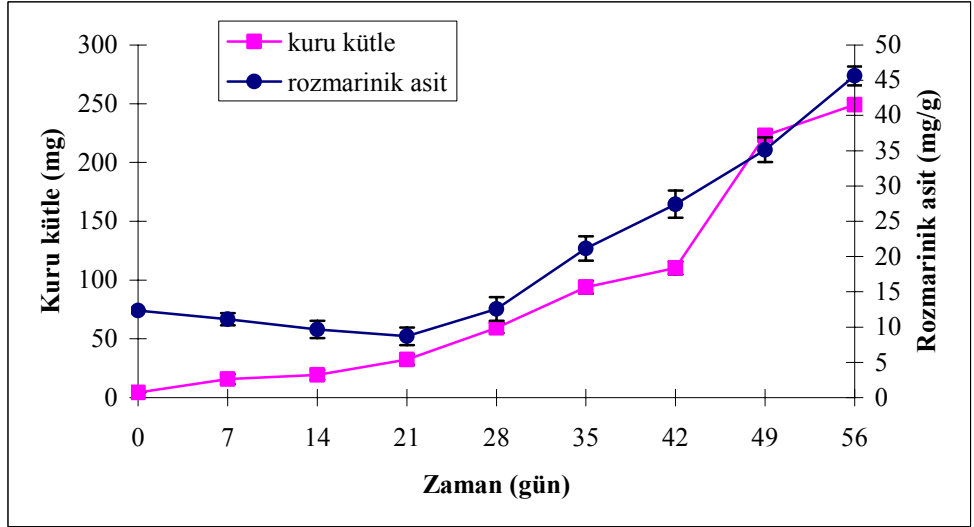
¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

³ μ (Özgün büyüme oranı)



Şekil 3.31. Uygulama 16'da büyüme eğrisi



Şekil 3.32. Uygulama 16'da kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

% 2.0 oranında sukroz bulunan bu kültür ortamında kuru kütle miktarı ilk iki hafta içerisinde durağan bir seyir izlemiştir (Şekil 3.32). Ancak 14. günden itibaren 56. gün sonuna kadar 249.00 mg'a ulaşmıştır. Rozmarinik asit miktarı kültür başlangıcından 3. haftanın (21. gün) sonuna kadar geçen süre içerisinde azalma eğilimine girmiştir. Bu noktada birikim miktarı 8.69 mg/g olarak bulunmuştur. 21-49. günler arasında sürekli artış gösteren rozmarinik asit birikimi, en hızlı değişimi kültür periyodunun son haftası içerisinde göstermiştir.

Uygulamanın sona erdiği 56. gün rozmarinik asit miktarı 45.43 mg/g olarak bulundu.

Uygulama 17 (1.00 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA + % 3.0 sukroz)

Bu uygulamada karbon kaynağı olarak % 3.0 (w/v) sukroz kullanıldı. Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri Tablo 3.17’de ve büyüme eğrisi ise Şekil 3.33’de verilmektedir.

% 3.0 sukroz bulunan bu besi ortamında hücrelerin, 14 günlük bir lag evresi geçirdikleri gözlemlendi. Bu aşamada 2.16-2.31 günler arasında değişen t_d değerleri kaydedildi. Şekil 3.33’deki büyüme eğrisi, log evresinin 14 ile 42. günler arasında olduğunu ve bunu 7 günlük bir doğrusal (doğrusal) artış evresinin izlediğini göstermektedir. 49. günden itibaren kültürün t_d değerinde artış görüldü (Tablo 3.17). Bu değer kültürlerin durağan evreye girdiğini göstermektedir. Hücrelerin özgün büyüme oranı diğer kültür ortamlarına göre oldukça yüksektir (0.40). Bu uygulama sonunda (56. günde) 6867.00 ± 331.99 mg yaş biyokütle elde edildi. Hücrelerin su içeriğinin kültür süresince % 93.37-96.33 arasında değişmiştir (Tablo 3.17).

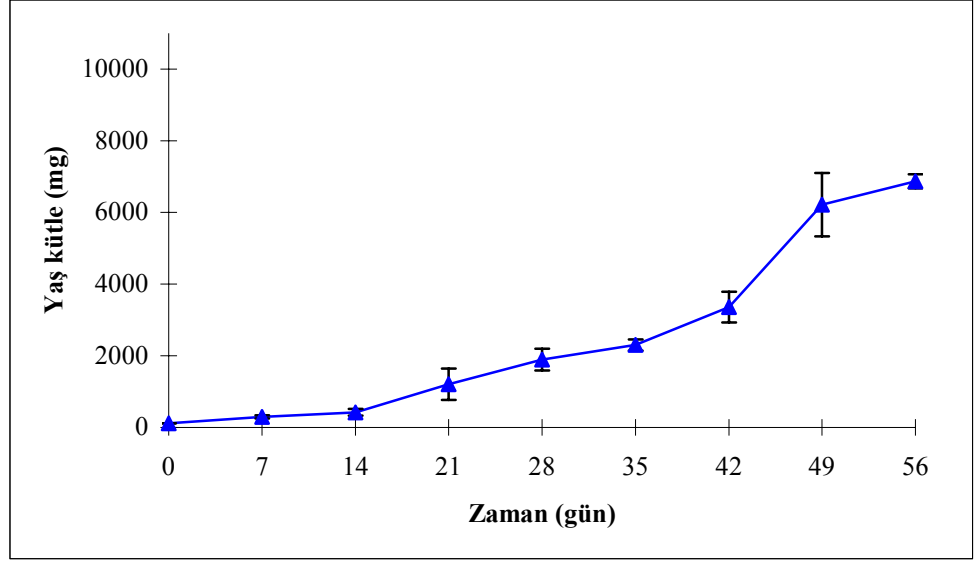
Tablo 3.17. Uygulama 17’de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%) ¹

Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 ± 0.00
7	2.16		93.37 ± 2.38
14	2.31		94.29 ± 0.30
21	1.67		95.39 ± 0.22
28	1.71	0.40	95.84 ± 0.40
35	1.85		95.88 ± 0.23
42	1.60		95.97 ± 0.74
49	1.54		95.60 ± 0.27
56	1.72		95.95 ± 0.66

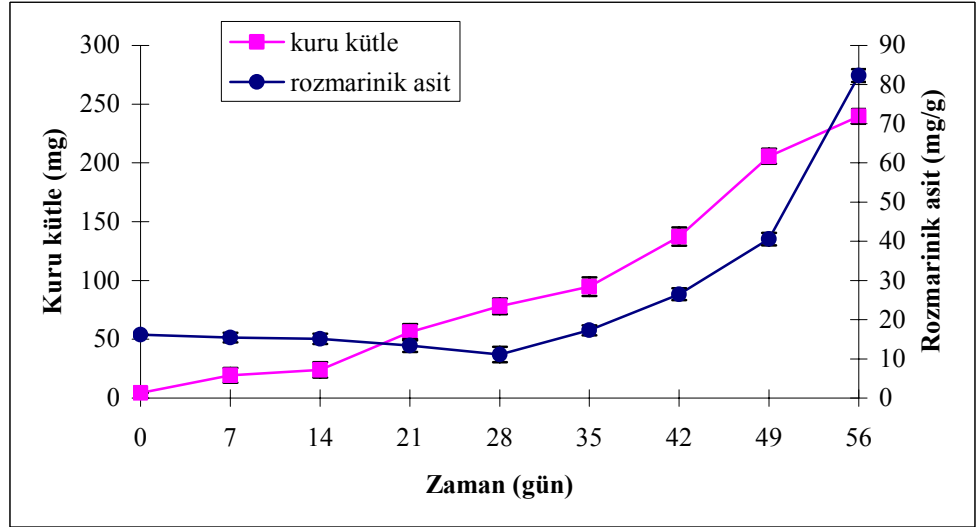
¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

³ μ (Özgün büyüme oranı)



Şekil 3.33. Uygulama 17'de büyüme eğrisi



Şekil 3.34. Uygulama 17'de kuru kütle ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Şekil 3.34'de kuru kütle esas alınarak verilen büyüme grafiğinde bu evreler daha net görülmüştür. Kuru kütle miktarı ilk 14 gün 19.60 mg'lık bir değişim göstermiş, daha sonraki günlerde ise bu artış çok daha hızlı gerçekleşmiştir. Son hafta kuru kütle 239.66 mg'a ulaşmıştır. Öte yandan kuru ağırlığın yavaş değişim gösterdiği ilk 14 günlük dönemde, rozmarinik asit miktarı da nispeten sabit kalmıştır. 14-28. günler arasında rozmarinik asit birikiminde bir azalma görülmüş

ve miktarı 11.14 mg/g'a kadar gerilemiştir. Bu noktadan itibaren tekrar yükselmeye başlayan rozmarinik asit miktarı 56. gün sonunda 82.34 mg/g olmuştur. Bu değer, diğer tüm uygulamalar göz önünde bulundurulduğunda elde edilen en yüksek rozmarinik asit miktarıdır.

Uygulama 18 (1.00 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA + % 4.0 sukroz)

Bu uygulamada karbon kaynağı olarak % 4.0 (w/v) sukroz kullanıldı. Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri Tablo 3.18'de ve büyüme eğrisi ise Şekil 3.35'de verilmektedir.

Tablo 3.18. Uygulama 18'de büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%) ¹

Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 ± 0.00
7	2.73		91.84 ± 0.68
14	2.20		92.36 ± 1.30
21	1.69		94.30 ± 0.48
28	1.73	0.40	93.16 ± 0.32
35	1.48		95.38 ± 0.78
42	1.59		95.42 ± 0.58
49	1.63		95.15 ± 0.11
56	2.17		95.18 ± 0.77

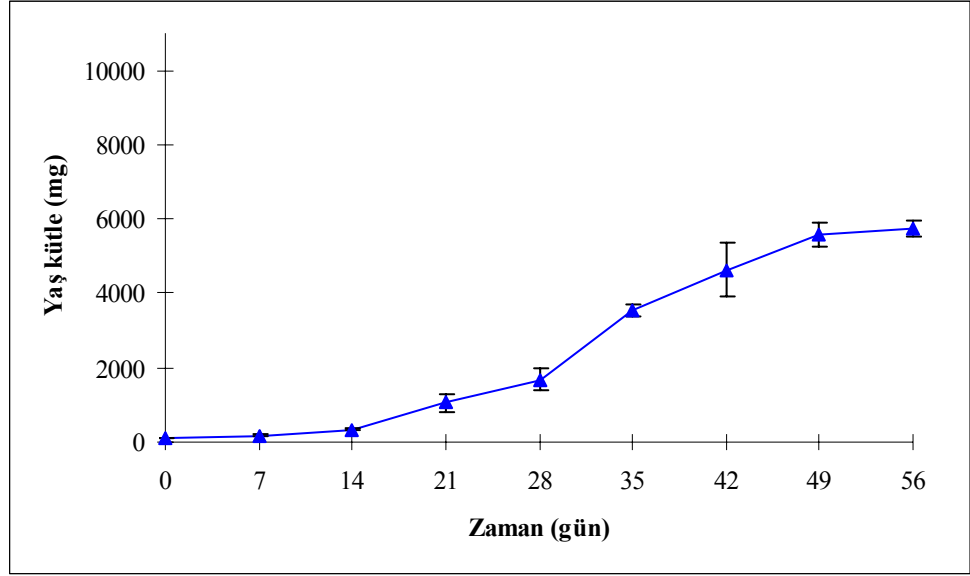
¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

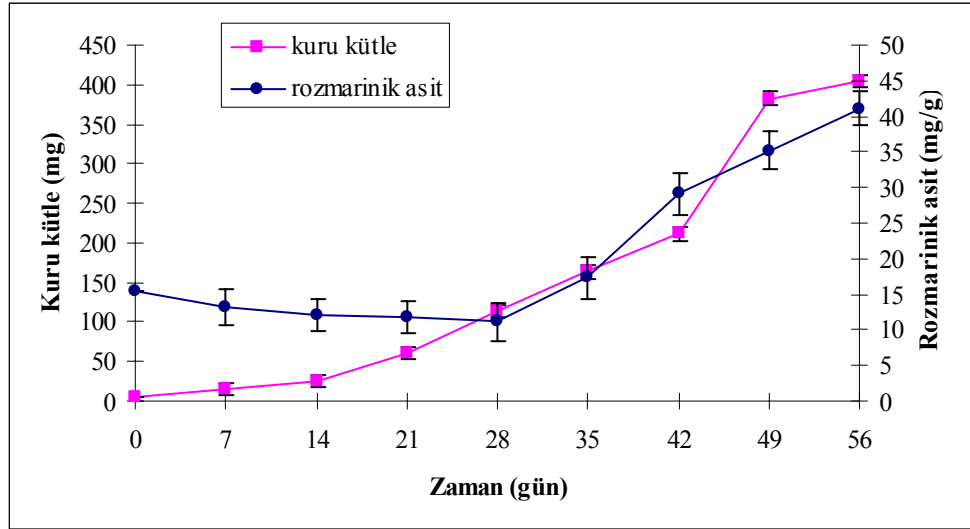
³ μ (Özgün büyüme oranı)

Bu uygulamada ilk 14 günlük bir lag evresi görülmüştür. Bunu 21 günlük bir log evresi ve 14 günlük bir doğrusal artış evresi izlemiştir. 49. günden sonra kültürler durağan sürece girmiştir (Şekil 3.35). Bu uygulama sonunda yani 56. günde, 7783.33 ± 628.28 mg yaş biyokütle elde edildi. Özgün büyüme oranı ise 0.40 olarak hesaplandı (Tablo 3.18).

Hücrelerin su içeriği % 91.84 ile 96.33 arasındadır.



Şekil 3.35. Uygulama 18’de büyüme eğrisi



Şekil 3.36. Uygulama 18’de kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Şekil 3.36’den de görüleceği üzere, bu uygulamada kuru kütle miktarı 0-14. günler arasında yavaş bir artış göstermiştir. 14. gün sonunda kuru kütle miktarı 25.66 mg olarak tespit edilmiştir. Ancak 14-49. günler arasında kuru kütle miktarında çok hızlı bir artış gerçekleşmiştir. 8. hafta (49-56. günler arası), durağan dönemin başladığına işaret etmektedir. Rozmarinik asit miktarı 0 ile 28. günler arasında 4.40 mg/g’lık bir azalma ile 11.14 mg/g’a gerilemiştir. Rozmarinik

asit miktarı 28-35. günler arasında tekrar artmaya başlamış ve 56. gün sonunda 41.14 mg/g'a ulaşmıştır.

Uygulama 19 (1.00 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA + % 5.0 sukroz)

Bu uygulamada karbon kaynağı olarak % 5.0 (w/v) sukroz kullanıldı. Kültürlerin zamana bağlı büyüme kinetikleri Tablo 3.19'da ve büyüme eğrisi ise Şekil 3.37'de verilmektedir.

Tablo 3.19. Uygulama 19'da büyüme kinetikleri ve su içerikleri (%) ¹

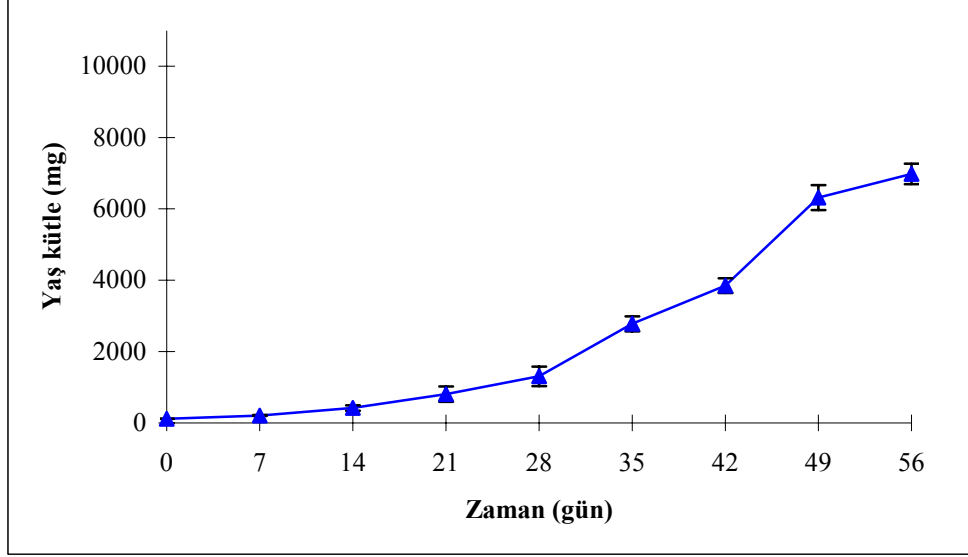
Zaman (gün)	t_d ²	μ ³	Su içeriği (%)
0	-		96.33 ± 0.00
7	2.50		89.33 ± 1.93
14	2.08		91.72 ± 0.50
21	1.87		91.39 ± 0.38
28	1.79	0.41	92.34 ± 0.44
35	1.53		93.16 ± 0.02
42	1.60		93.25 ± 0.30
49	1.49		94.51 ± 0.10
56	1.68		93.27 ± 0.62

¹ Tüm sonuçlar 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

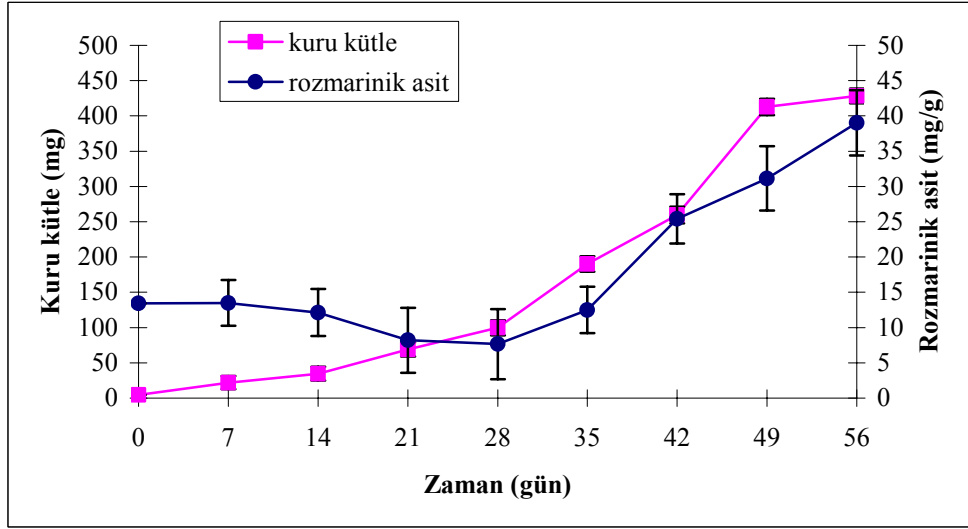
² t_d (İki katına çıkış süresi, gün)

³ μ (Özgün büyüme oranı)

Bu uygulamada da ilk 14 günün lag evresine ait olduğu bulunmuştur. Çünkü, gerek iki haftada elde edilen iki katına çıkış süreleri ($t_d = 2.08-2.50$ gün arası) ve gerekse zamanla yaş kütledeki değişimin esas alındığı Şekil 3.37'deki büyüme eğrisi başlangıçtaki çok yavaş büyümeyi göstermektedir. Sonrasında kısa bir log evresi gözlemlendi. Şekil 3.37'deki büyüme eğrisine göre, log evresi 14 ile 28. günler arasındadır ve bunu üç haftalık bir doğrusal (doğrusal) artış evresinin izlediğini görülmektedir. 49. günden itibaren kültürün t_d değerinde artış tespit edilmiştir (Tablo 3.19). Bu değer kültürlerin durağan evreye girdiğini göstermektedir. Kültürdeki hücrelerin özgün büyüme oranı 0.41 olarak tespit edildi. Bu uygulama sonunda (56. günde) 6979.66 ± 560.92 mg yaş biyokütle elde edildi. Bunun yanı sıra hücrelerin su içeriği % 89.33 ile 96.33 arasındadır.



Şekil 3.37. Uygulama 19’da büyüme eğrisi



Şekil 3.38. Uygulama 19’da kuru kütlede ve rozmarinik asit birikiminde zamana karşı değişimler

Şekil 3.38’de verilen ve kuru kütlede zaman karşı değişiminin grafiğe geçirildiği büyüme eğrisi de bu bulguları doğrulamaktadır. Kuru ağırlık, 0-28. ve 28-49. günler arasında iki farklı artış dönemi sergilemiştir. 49 günlük dönemde kuru kütle toplam 303.26 mg’lık bir değişim göstermiştir. Rozmarinik asit miktarı ise ilk 14 günlük dönemde sabit kaldıktan sonra, 28. güne kadar giderek azalmış

ve burada 7.65 mg/g değerine ulaşmıştır. 28-35. günler arasında nispeten yavaş bir değişim gösteren birikim, 56. gün sonunda 39.02 mg/g'a ulaşmıştır (Şekil 3.38).

3.3. Uygulamalardan elde edilen yaş ve kuru biyokütle ile rozmarinik asit birikiminin karşılaştırmalı analizi

Şimdiye kadar farklı IBA/6-BA birleşimlerinin (Bölüm 3.1) ve sukroz derişimlerinin (Bölüm 3.2) kültür süreci boyunca zamana karşı biyokütle ve rozmarinik asit miktarı üzerinde yaptıkları değişiklikler analiz edildi. Biyokütlerdeki değişikliklerin analizi için hem yaş hem de kuru kütle verileri değerlendirildi.

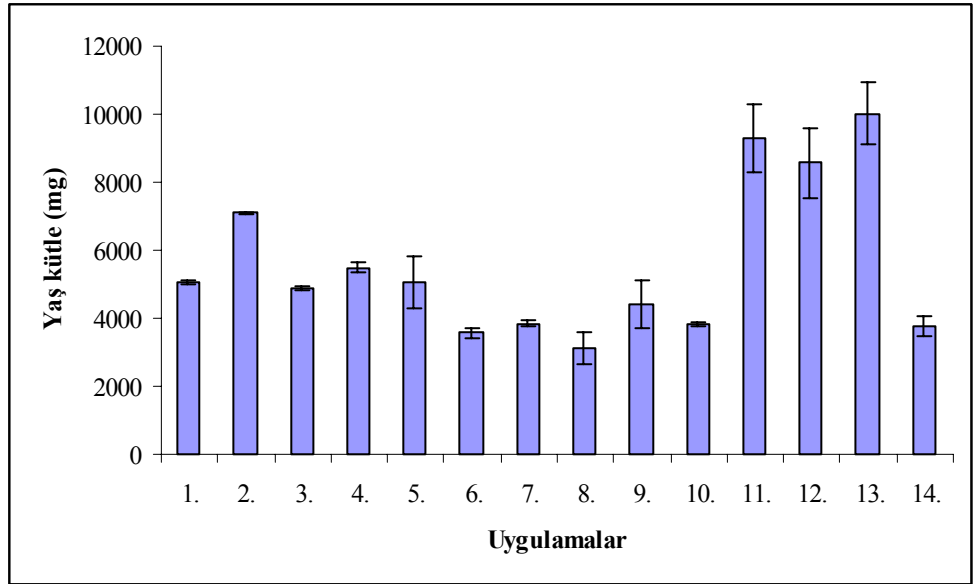
Bu bölümde ise farklı IBA/6-BA birleşimlerini içeren uygulamaların son gününden elde edilen yaş ve kuru biyokütle ile rozmarinik asit düzeyleri istatistiksel olarak analiz edildi. Aynı değerlendirme daha sonra, farklı sukroz derişimleri için de yapılmıştır.

3.3.1. Farklı IBA/6-BA birleşimlerinin yaş ve kuru biyokütle ile rozmarinik asit birikimi üzerine etkileri

Yaş kütle açısından en yüksek verim, uygulama 13'den elde edilmiştir (10023.33 ± 927.86 mg) (Tablo 3.20). Bunu, uygulama 11 ve 12'deki veriler izlemektedir (Şekil 3.39). Bu uygulamalarda, sabit oksin (1.00 ppm IBA), değişken sitokinin (6-BA) derişimleri bulunmaktadır. Yaş kütle baz alındığında her üç uygulamadan (11, 12 ve 13) elde edilen yaş kütle verileri sırasıyla; 10023.33 ± 927.86 , 9293.66 ± 983.66 , 8572.66 ± 1023.65 mg'dır. Bu değerler arasında istatistiksel açıdan fark bulunmamıştır ($P>0.05$). Sadece IBA'nın kullanıldığı uygulama 9, 6-BA'nın düşük derişimde denendiği (0.10 ppm) uygulama 10 ve 6-BA'nın yüksek derişimde denendiği (10.00 ppm) uygulama 14'deki veriler ise kendi aralarında istatistiksel açıdan farklılık göstermemiştir ($P>0.05$). İlk grup (uygulama 11, 12 ve 13) ile ikinci grup (uygulama 9, 10 ve 14) arasında yaş kütle verimi açısından istatistiksel fark vardır ($P<0.05$). Deneylerde standart kültür olarak değerlendirilen uygulama 5'den elde edilen yaş kütle verimi, ikinci grup uygulamalarla istatistiksel açıdan fark göstermemiştir

($P>0.05$). Herhangi bir büyüme düzenleyicisinin yer almadığı uygulama 1’de de yaş kütle verimi benzer şekilde bir eğilim göstermiştir. Özetle, 1, 5, 9, 10 ve 14 numaralı uygulamalardan elde edilen yaş kütle verimleri kendi aralarında bir grup oluşturacak şekilde benzerlik göstermiştir ($P>0.05$). Aynı durum yüksek verimin alındığı 11, 12 ve 13 numaralı uygulamalar için de geçerlidir (Tablo 3.20).

Sitokinin derişiminin sabit (1.00 ppm), oksin derişiminin değişken olduğu uygulamalar arasında ise en yüksek yaş kütle verimi uygulama 4’ten elde edilmiştir. Ancak bu kategoride yer alan uygulamalardan elde edilen yaş kütle verimleri istatistiksel anlamda farklılık göstermemiştir ($P>0.05$). Bu kategoride yer alan uygulama 3-8’deki verimler, 3122.66 ± 475.28 mg ile 5493.66 ± 124.96 mg arasında değişkenlik göstermektedir. Bu veriler uygulama 2’den elde edilen yaş kütle verimi (7098.66 ± 47.68 mg) ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel açıdan önemli bir fark olduğu görülmektedir ($P<0.05$). Diğer taraftan, büyüme düzenleyicilerinin bulunmadığı uygulama 1 ile bu gruptaki uygulamalar arasında istatistiksel açıdan fark bulunmamıştır ($P>0.05$) (Tablo 3.20).



Şekil 3.39. Bitki büyüme düzenleyicisi derişimlerinin *S. hortensis* callus kültürlerinde yaş kütle verimleri üzerine etkisi

Sadece bir oksin'in kullanıldığı uygulama 9 ile sadece bir sitokin'in kullanıldığı uygulama 2'deki yaş kütle verimleri karşılaştırıldığında, istatistiksel bir fark görülmektedir ($P<0.05$).

Oksin/sitokin, yani IBA/6-BA oranının 1:2 olduğu iki uygulamadan (Uygulama 4 ve 12) elde edilen yaş kütle verimleri farklıdır ($P<0.05$). Ancak kuru kütle verileri değerlendirildiğinde ise iki uygulama arasında fark bulunmamıştır ($P>0.05$). Standart kültür (Uygulama 5) ile karşılaştırıldığında ise Uygulama 12'nin yaş ve kuru kütle açısından daha yüksek verim sağladığı ve bu farkın önemli olduğu bulunmuştur.

IBA/6-BA oranının 1:10 olduğu iki uygulama (Uygulama 3 ve 14) değerlendirildiğinde ise gerek yaş ve gerekse kuru kütle verimlerin arasında bir fark olmadığı görüldü. Ayrıca her iki uygulamadan elde edilen yaş ve kuru kütle verimleri ile standart kültürden (Uygulama 5) elde edilen verimler arasında istatistiksel açıdan bir fark bulunmamıştır.

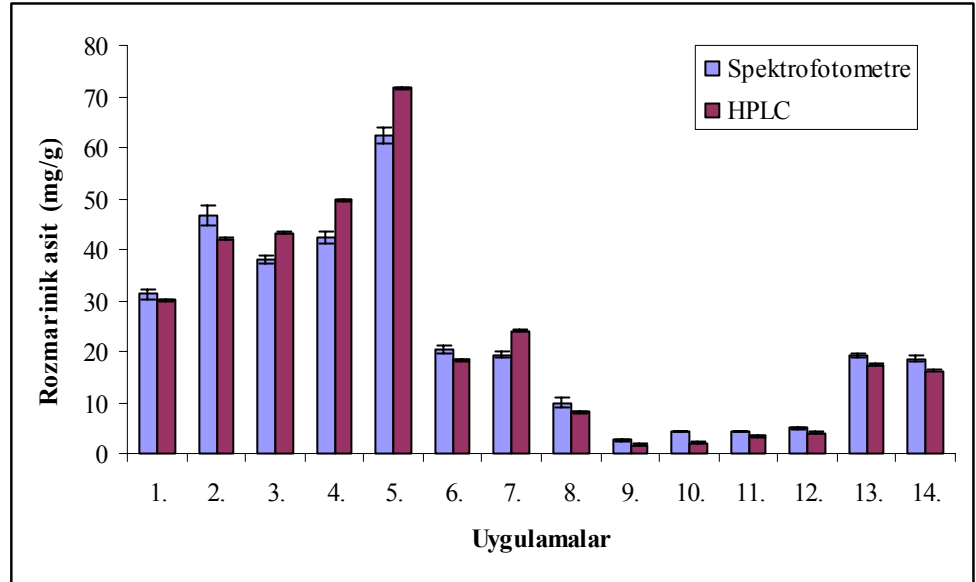
Sabit oksin derişimine karşı (1.00 ppm) değişen sitokin derişimlerinin denendiği kategorideki kuru kütle verimleri göz önünde bulundurulduğunda, en yüksek verimin yine uygulama 13'den elde edildiği görülmektedir (282.00 ± 59.90 mg). Bunu, sırasıyla uygulama 12 (267.33 ± 32.04 mg) ve 11'deki (234.00 ± 5.29 mg) veriler izlemektedir. 11, 12 ve 13 numaralı uygulamalarda kuru kütle verimleri açısından istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir ($P>0.05$). Sadece IBA'nın kullanıldığı uygulama 9 ile 6-BA'nın yüksek derişimde denendiği (10.00 ppm) uygulama 14'deki veriler ise kendi aralarında istatistiksel açıdan farklılık göstermemiştir ($P>0.05$). Diğer taraftan Uygulama 10, kuru kütle olarak en az verimin alındığı uygulamadır ve diğerlerinden farklıdır ($P<0.05$).

Sabit sitokin derişimine karşı değişen oksin derişimlerinin ele alındığı kategorideki kuru kütle verimleri göz önünde bulundurulduğunda ise, en yüksek verimin, sadece 1.00 ppm 6-BA bulunan 2 numaralı uygulamadan elde edildiği görülmektedir (273.00 ± 5.03 mg). Bunu sırasıyla 4 (226.66 ± 8.41 mg) ve 5 (212.00 ± 23.79 mg) numaralı uygulamalar izlemektedir. 2, 4 ve 5 numaralı uygulamalar arasında kuru kütle verimleri açısından istatistiksel bir fark bulunmamaktadır ($P>0.05$). Diğer yandan bu kategoride bulunan 3, 6, 7 ve 8

numaralı uygulamaların kuru kütle verimlerinde de kendi aralarında istatistiksel açıdan fark bulunmamaktadır ($P>0.05$). Ancak bu iki grup arasında istatistiksel bir fark görülmüştür ($P<0.05$).

Sadece bir oksin'in kullanıldığı uygulama 9 ile sadece bir sitokin'in kullanıldığı uygulama 2'deki kuru kütle verimleri karşılaştırıldığında, bu iki uygulama arasında istatistiksel bir fark bulunduğu görülmektedir ($P<0.05$).

Sabit oksin derişimine karşı (1.00 ppm) değişen sitokin derişimlerinin denendiği kategorideki spektrofotometrik rozmarinik asit verileri göz önünde bulundurulduğunda, en yüksek verim uygulama 13'den elde edilmiştir (19.11 ± 0.39 mg/g). Bunu 14 numaralı uygulama izlemektedir (18.45 ± 0.58 mg/g) (Şekil 3.40). 13 ve 14 numaralı uygulamalar arasında istatistiksel açıdan herhangi bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$). Diğer yandan sadece 1.00 ppm oksin'in kullanıldığı uygulama 9 da dahil olmak üzere 10, 11 ve 12 numaralı uygulamalarda spektrofotometrik rozmarinik asit verilerinde istatistiksel açıdan bir fark söz konusu değildir ($P>0.05$). Ancak sözü edilen bu iki grup arasında istatistiksel bir fark bulunmaktadır ($P<0.05$) (Tablo 3.20).



Şekil 3.40. Bitki büyüme düzenleyicisi derişimlerinin *S. hortensis* kallus kültürlerinde rozmarinik asit birikimi üzerine etkisi

Sabit sitokininin derişimine karşı değişen oksin derişimlerinin ele alındığı kategorideki spektrofotometrik rozmarinik asit verileri değerlendirildiğinde ise, en yüksek verimin uygulama 5'den elde edildiği görülecektir (62.27 ± 1.53 mg/g). Bunu sırasıyla sadece 1.00 ppm sitokin bulunan 2 numaralı uygulama (46.66 ± 1.85 µg/mg) ve 4 (42.42 ± 1.21 µg/mg) numaralı uygulamalar izlemektedir. 2 ve 4 numaralı uygulamalar arasında istatistiksel açıdan fark bulunmazken ($P < 0.05$), 5 numaralı uygulama bunlardan farklıdır ($P > 0.05$). Bu kategoride bulunan 6 ve 7 numaralı uygulamaların da spektrofotometrik rozmarinik asit düzeyleri arasında istatistiksel fark gözlenmemiştir ($P > 0.05$). Bitki büyüme düzenleyicisi bulunmayan 1 numaralı uygulama ile 1/10 oranında oksin-sitokin birleşimi içeren 3 numaralı uygulamalarda rozmarinik asit düzeyleri açısından istatistiksel farklılık bulunmaktadır ($P < 0.05$) (Tablo 3.20).

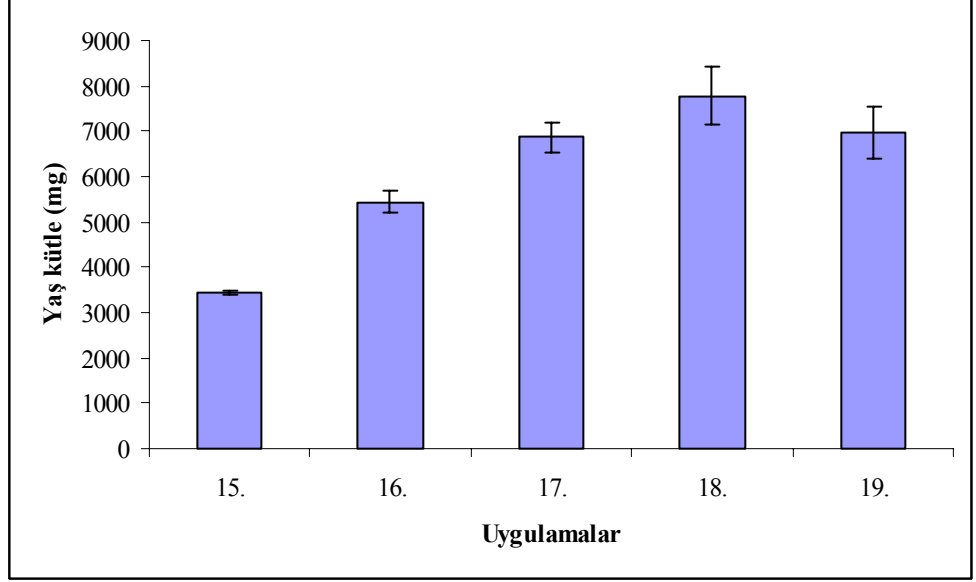
Yalnızca bir oksin'in kullanıldığı uygulama 9 ile yalnızca bir sitokin'in kullanıldığı uygulama 2'deki spektrofotometrik rozmarinik asit düzeyleri karşılaştırıldığında, bu iki uygulama arasında istatistiksel bir fark bulunduğu görülmektedir ($P < 0.05$) (Tablo 3.20).

HPLC yoluyla analiz edilen rozmarinik asit verileri değerlendirildiğinde ise sırasıyla 2 ve 3; 6 ve 13; ve 11 ve 12 numaralı uygulamalar kendi aralarında farklı değilken ($P > 0.05$), diğer tüm uygulamalardan elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur ($P < 0.05$) (Tablo 3.20).

3.3.2. Farklı sukroz derişimlerinin yaş ve kuru biyokütle ile rozmarinik asit birikimi üzerine etkileri

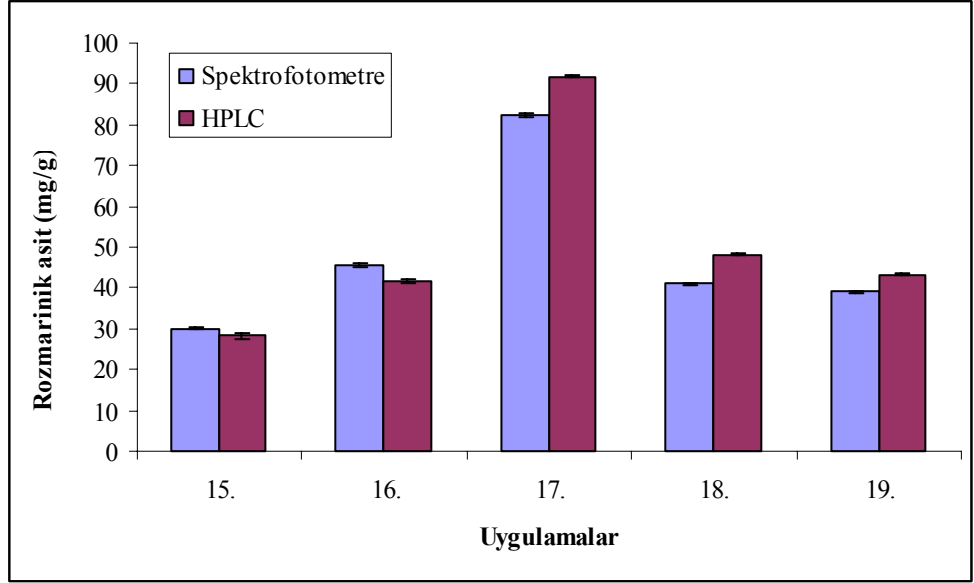
Yaş kütle açısından en yüksek verim, % 4.0 (v/w) oranında sukroz bulunan uygulama 18'den elde edilmiştir (7783.33 ± 628.28 mg) (Tablo 3.21). Bunu % 5.0 (v/w)'lik sukroz oranı içeren 19 (6979.66 ± 560.92 mg) ve 17 numaralı (6867.00 ± 331.99 mg) uygulamalar izlemektedir (Tablo 3.21, Şekil 3.41). 17, 18 ve 19 numaralı uygulamalar arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık bulunmamaktadır ($P > 0.05$). Diğer yandan uygulama 16 ile uygulama 17 arasında da istatistiksel açıdan fark bulunmazken ($P > 0.05$), uygulama 16; 18 ve 19 numaralı uygulamalardan istatistiksel açıdan farklıdır ($P < 0.05$). Yalnızca % 1.0

(v/w) oranında sukroz bulunan 1 numaralı uygulama ise yaş kütle verimi açısından bu kategorideki diğer uygulamalardan farklı bulunmuştur ($P<0.05$).



Şekil 3.41. Sukroz derişimlerinin *S. hortensis* kallus kültürlerinde yaş kütle verimi üzerine etkisi

Tablo 3.21'deki veriler kuru kütle açısından değerlendirildiğinde, en yüksek verimin uygulama 19'dan elde edildiği görülmektedir (428.33 ± 18.02 mg). Bunu uygulama 18 izlemektedir (404.33 ± 41.06 mg). Bu iki uygulama arasında istatistiksel açıdan herhangi bir farklılık bulunmamıştır ($P>0.05$). Bu kategoride, 16 ve 17 numaralı uygulamaların kuru kütle verimleri arasında da istatistiksel bir farklılık bulunmazken ($P>0.05$), uygulama 15, uygulama 16 ve 17'yi içeren grup ve uygulama 18 ve 19'u içeren grupların kuru kütle verimleri kendi aralarında değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan farklılık görülmektedir ($P<0.05$).



Şekil 3.42. Sukroz derişimlerinin *S. hortensis* kallus kültürlerinde rozmarinik asit birikimi üzerine etkisi

Farklı sukroz derişimlerinin denendiği bu kategoriden elde edilen spektrofotometrik rozmarinik asit verimleri değerlendirildiğinde (Tablo 3.21, Şekil 3.42), en yüksek verimin % 3.0 (v/w) oranında sukroz bulunan 17 numaralı uygulamadan elde edildiği görölür (82.34 ± 0.26 mg/g). Bunu, % 2.0 (v/w) oranında sukroz içeren uygulama 16 izlemektedir (45.43 ± 0.42 mg/g). Bu iki grup arasında istatistiksel açıdan farklılık vardır ($P < 0.05$). 18 ve 19 numaralı uygulamalar arasında istatistiksel açıdan fark bulunmamıştır ($P < 0.05$). Yalnızca % 1.0 (v/w) oranında sukroz içeren 1 numaralı uygulamadan elde edilen rozmarinik asit verileri ise bu kategorideki diğer uygulamalardan istatistiksel açıdan farklılık göstermektedir ($P < 0.05$).

Bu kategorideki uygulamaların rozmarinik asit düzeylerinin HPLC ile analizi sonucunda elde edilen veriler (Tablo 3.21) göz önünde bulundurulduğunda ise; % 2.00 (v/w) sukroz bulunan 16 no'lu uygulama ile % 5.00 (v/w) sukroz bulunan 19 no'lu uygulamalar arasında istatistiksel açıdan bir fark bulunmamıştır ($P > 0.05$). Öte yandan diğer tüm uygulamaların istatistiksel olarak birbirlerinden farklılık gösterdiği görölmektedir ($P < 0.05$).

Tablo 3.20. Bitki büyüme düzenleyicisi verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi ¹

Uygulama No	Bitki Büyüme Düzenleyicisi Birleşimi	Yaş Kütle (mg) Ort ² ± S.H. ³	Kuru Kütle (mg) Ort ² ± S.H. ³	Rozmarinik asit (mg/g)	
				Spektrofotometrik Ort ² ± S.H. ³	HPLC Ort ² ± S.H. ³
1	BBD yok	5066.33 ± 45.24 ^{b,c,d,f,g,h}	184.33 ± 5.81 ^{a,c,d,e,f,g,i,o}	31.22 ± 0.89 ^a	30.12 ± 0.12 ^a
2	1.00 ppm 6-BA	7098.66 ± 47.68 ^a	273.00 ± 5.03 ^{b,l,m,n}	46.66 ± 1.85 ^b	42.14 ± 0.11 ^b
3	0.10 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA	4864.33 ± 58.12 ^{b,c,d,f,g,i}	166.66 ± 2.72 ^{e,f,g,h,i,o}	38.14 ± 0.77 ^c	42.62 ± 0.14 ^b
4	0.50 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA	5493.66 ± 124.96 ^{b,c,f}	226.66 ± 8.41 ^{d,g,l,m}	42.42 ± 1.21 ^b	49.73 ± 0.20 ^c
5	1.00 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA	5053.00 ± 785.35 ^{b,c,d,f,g,i}	212.00 ± 23.79 ^{c,d,e,g,i,l}	62.27 ± 1.53 ^d	71.67 ± 0.14 ^d
6	2.00 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA	3579.33 ± 142.10 ^{c,d,e,f,g,i}	163.33 ± 6.98 ^{f,g,h,i,o}	20.52 ± 0.78 ^e	18.34 ± 0.16 ^e
7	5.00 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA	3845.66 ± 97.72 ^{d,e,f,g,i}	192.00 ± 11.23 ^{g,i,l,o}	19.39 ± 0.63 ^e	24.07 ± 0.27 ^f
8	10.00 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA	3122.66 ± 475.28 ^{e,f,g,i}	135.66 ± 15.94 ^{h,i,k,o}	9.95 ± 0.87 ^f	8.13 ± 0.11 ^g
9	1.00 ppm IBA	4404.33 ± 703.65 ^{f,g,i}	170.66 ± 2.96 ^{i,o}	2.60 ± 0.12 ^g	1.76 ± 0.14 ^h
10	1.00 ppm IBA + 0.10 ppm 6-BA	3847.00 ± 61.53 ^{g,i}	104.33 ± 4.91 ^k	4.29 ± 0.12 ^g	2.14 ± 0.17 ⁱ
11	1.00 ppm IBA + 0.50 ppm 6-BA	9293.66 ± 983.66 ^h	234.00 ± 5.29 ^{l,m}	4.29 ± 0.14 ^g	3.46 ± 0.13 ^k
12	1.00 ppm IBA + 2.00 ppm 6-BA	8572.66 ± 1023.65 ^{a,h}	267.33 ± 32.04 ^{m,n}	5.04 ± 0.14 ^g	3.97 ± 0.16 ^k
13	1.00 ppm IBA + 5.00 ppm 6-BA	10023.33 ± 927.86 ^h	282.00 ± 59.90 ⁿ	19.11 ± 0.39 ^e	17.43 ± 0.14 ^e
14	1.00 ppm IBA + 10.00 ppm 6-BA	3753.33 ± 278.12 ⁱ	157.00 ± 18.73 ^o	18.45 ± 0.58 ^e	16.14 ± 0.14 ^l

¹ Veriler üç tekrarın ortalamasıdır, ² Ort: Ortalama, ³ S.H.: Standart Hata,

t: Aynı sütunlarda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir

Tablo 3.21. Sukroz derişimi verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi ¹

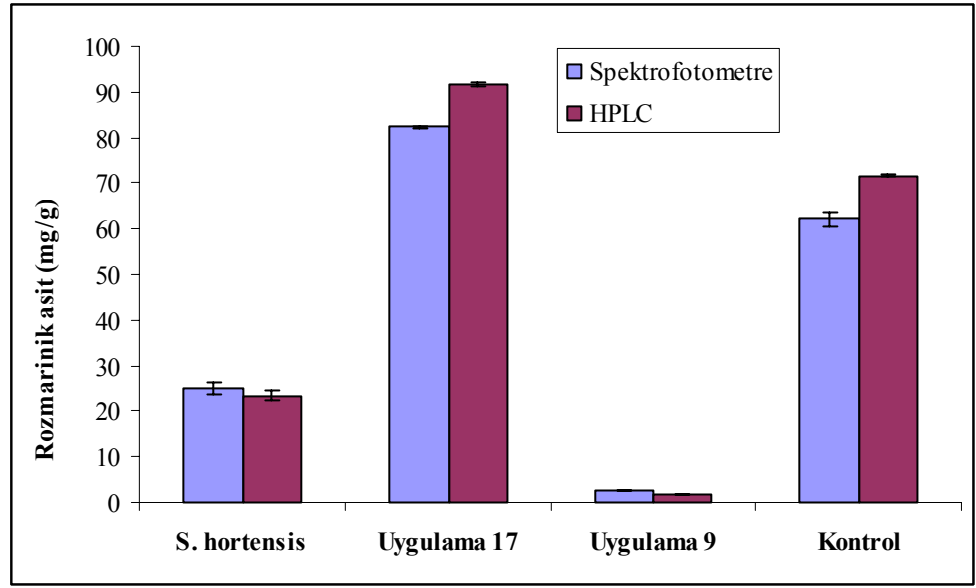
Uygulama No	Sukroz Derişimi (% v/w)	Yaş Kütle (mg) Ort ² ± S.H. ³	Kuru Kütle (mg) Ort ² ± S.H. ³	Rozmarinik asit (mg/g)	
				Spektrofotometrik Ort ² ± S.H. ³	HPLC Ort ² ± S.H. ³
15	1.00	3454.00 ± 41.18 ^a	105.00 ± 1.00 ^a	30.12 ± 0.43 ^a	28.23 ± 0.57 ^a
16	2.00	5445.66 ± 524.37 ^b	249.00 ± 44.61 ^b	45.43 ± 0.42 ^b	41.74 ± 0.51 ^b
Kontrol	2.50	5053.00 ± 785.35 ^b	212 ± 23.79 ^b	62.27 ± 1.53 ^c	71.67 ± 0.14 ^c
17	3.00	6867.00 ± 331.99 ^{b,c}	239.66 ± 28.36 ^b	82.34 ± 0.26 ^d	91.76 ± 0.33 ^d
18	4.00	7783.33 ± 628.28 ^c	404.33 ± 41.06 ^c	41.14 ± 0.21 ^e	48.12 ± 0.28 ^e
19	5.00	6979.66 ± 560.92 ^c	428.33 ± 18.02 ^c	39.02 ± 0.21 ^e	43.26 ± 0.25 ^b

¹ Veriler üç tekrarın ortalamasıdır, ² Ort: Ortalama, ³ S.H.: Standart Hata,

t: Aynı sütunlarda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir

3.4. *S. hortensis* bitkisinden elde edilen rozmarinik asit miktarı

Yukarıda verilen tüm kallus kültürü uygulamalarına paralel olarak *S. hortensis* bitkisinin herbal kısımlarından elde edilen özütte de rozmarinik asit miktarını belirlemek için spektrofotometrik ve HPLC analizleri yapıldı. Sonuçlar Şekil 3.43’de verilmektedir.



Şekil 3.43. *S. hortensis*'den elde edilen rozmarinik asit düzeyinin, en yüksek ve en düşük verim sağlayan uygulamalarla karşılaştırılması

S. hortensis bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol (MeOH) özütünün rozmarinik asit içeriği de hem spektrofotometrik hem de HPLC analizleri ile belirlendi. Spektrofotometrik analizler sonucunda özütün 25.02 ± 1.21 mg/g rozmarinik asit içerdiği tespit edildi. HPLC analizleri sonucunda ise bu özütün 23.44 ± 1.14 mg/g rozmarinik asit içerdiği saptandı.

Şekil 3.43'den de görüleceği gibi, kallus kültürleri başlatılması için kaynak kültür ortamı olarak kullanılan kontrol grubundan spektrofotometrik ve HPLC analizleri sonucunda sırasıyla 62.27 ± 1.53 mg/g ve 71.67 ± 0.14 mg/g düzeylerinde rozmarinik asit elde edildi. En yüksek rozmarinik asit miktarı, % 3.0 sukroz bulunan uygulama 17'den elde edilirken (sırasıyla 82.34 ± 0.26 mg/g ve 91.76 ± 0.33 mg/g), bu miktar, yalnızca 1.00 ppm IBA'nın kullanıldığı 9

numaralı uygulamada sırasıyla 2.60 ± 0.12 mg/g ve 1.76 ± 0.14 mg/g düzeylerine kadar gerilemiştir.

En yüksek rozmarinik asit veriminin elde edildiği 17 numaralı uygulama göz önünde bulundurulduğunda, kallus kültürleri yolu ile elde edilen rozmarinik asit miktarı, *S. hortensis* bitkisi özütünden elde edilene oranla 3.92 kat daha fazladır.

S. hortensis MeOH özütünün ve en yüksek rozmarinik asit düzeyine sahip olan uygulama 17'nin HPLC kromatogramları bu çalışmanın ekler bölümünde sunulmuştur (Ek-1 ve Ek-2). Ayrıca 50 µg/ml düzeyinde standart rozmarinik asit çözeltisinin HPLC kromatogramı da bu ekler arasında yer almaktadır (Ek-3).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitki doku ve hücre kültürleri ile doğal ürünlerin (sekonder metabolitlerin) üretimi bitki biyoteknolojisinin ilgi çekici konularından birisidir. Özellikle kallus ve hücre süspansiyon kültürleri ile çok çeşitli sekonder metabolitlerin üretilebileceği belirtilmektedir (Sökmen ve Gürel, 2001).

Bitki biyoteknolojisinde sıkça karşılaşılan “kallus” terimi esasen doğada sıkça görülen bir olgudur ve bitkilerin yaralanmaya karşı verdiği bir tepkidir. Herhangi bir etki sonucu gelişen dokuda yaralanma bölgesinde hızlı ve düzensiz hücre bölünmeleri görülür ve bunu bu bölgede hızlı bir fenolik bileşik üretimi izler. Bu olgu kallus kültürlerinde fenolik bileşiklerin üretilmesi hususunda potansiyel bir kaynak olabileceğini gösterir.

Lignin biyosentezi ve sonrasında ligninleşme için fenolik bileşiklerin (fenilpropanoitlerin) üretimi gerekir (Stafford ve Warren, 1991). Bitkilerde *in vivo* ve *in vitro* koşullarda fitoaleksin-elisitör ilişkisinde de fenolik bileşikler önemli rol oynarlar (Sökmen ve Gürel, 2001). Elisitör bir çeşit sinyal görevi görür, fenilpropanoitlerin üretimi teşvik edilir ve bu maddeler de hücre çeperinde birikir (Barz ve ark., 1988).

Doğada fenolik bileşiklerin bitkilere sağladığı avantajlardan birisi de rekabet gücünü artırmasıdır. Bitkilerin, çevresindeki diğer bitkilere ve canlılara etkileri, “allelopati”nin araştırma kapsamındadır. Bu olayda da fenolik bileşiklerin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bitkinin toprağa yüksek miktarlarda saldığı benzoik asit ve türevleri, kafeik ve ferulik asitler diğer bitkilerin çimlenmesini veya büyümesini engeller (Taiz ve Zaiger, 2002). Bu, bitkilerin çok farklı ve çeşitli fenolik bileşik üretimi nedenlerinden sadece birisidir.

Diğer taraftan, insanoğlu bu metabolitleri değişik amaçlarla kullanır (ilaç, besin katkı maddeleri, parfüm ve kozmetik, zirai mücadele gibi). Bu bileşiklerin birçoğu, kimyasal olarak sentezi zor ya da üretilmeleri veya miktarlarının artırılması genetik mühendislik müdahaleleri ile dahi büyük çabalar gerektirir (Zhong ve ark., 2001). Son yıllarda ticari anlamda bitkisel ürünlere duyulan ilgi artmış ve dolayısıyla bu bileşiklerin piyasa değerleri de yükselmiştir. Örneğin, bitkisel bir sekonder metabolit olan rozmarinik asit, çeşitli biyolojik aktivitelere

sahiptir. Son yıllarda rozmarinik asit konserve ve besin katkı maddelerinde doğal antioksidan olarak kullanılmaya başlanmış ve buna bağlı olarak piyasa değeri de artmıştır (Wu ve Zhong, 1999).

Ancak ekonomik değer taşıyan doğal ürünlerin kaynak bitkiden doğrudan elde edilmesi her şeyden önce bu bitkiler üzerinde tahribatı da gündeme getirmektedir. Bu tahribatın önlenmesi hususunda bitki biyoteknolojisinden yararlanma olanağı güncel bir yaklaşımdır. Bunun yanı sıra bu teknik başka avantajları da beraberinde getirir (Sökmen ve Gürel, 2001).

Bununla beraber, doku ve hücre kültürü tekniklerini kullanarak sekonder metabolit üretimi gerçekleştirme süreci de yoğun emek gerektirir. Kaynak bitkinin seçimi, bitkinin uygun kısımlarından doku ve/veya hücre kültürlerinin başlatılması, kültürlerin sürdürülebilmesi, hedef ürünün kültürler tarafından üretilip üretilmediğinin tespit edilmesi, eğer üretilebiliyorsa ürünün miktarının artırılması, yani kültürü optimize etme olanağının araştırılması evrelerinin her biri bu süreçte dönüm noktalarıdır.

S. hortensis tohumlarından başlatılan kallus kültürleri de bu bağlamda özgün bir çalışmadır. Çünkü bu bitkiden başlatılmış ve literatüre kazandırılmış sadece bir araştırma mevcuttur (Güllüce ve ark., 2003). Ancak bu çalışmada, güçlü bir antioksidan aktivite gösterdiği ve bu aktivitenin fenolik bileşiklerden kaynaklandığı rapor edilen kallus kültürleri de burada sunulan çalışmadaki kaynak ya da standart kültürdür.

Bu çalışmada neden sadece IBA/6-BA birleşimlerinin ve artan sukroz derişimlerinin çalışıldığı sorusu akla gelebilir. Yukarıda da değinildiği gibi, kültürleri başlatma ve sürdürme araştırmalarında öncelikle temel besi ortamı bileşenleri içinde Gamborg'un B5 besi ortamının (Gamborg ve ark., 1968), Murashige ve Skoog'a (Murashige ve Skoog, 1962) göre daha uygun olduğu, sürekli karanlık ortamdaki kültürün sürekli aydınlık ortamdaki kültüre göre daha avantajlı olduğu görüldü. Daha sonra yapılan bir çalışmada ise farklı karbon kaynaklarının ve IBA/6-BA dışındaki tüm büyüme düzenleyicileri birleşimlerinin kültürün sürdürülmesinde uygun olmadığı ya da en azından düşük biyokütle verimi elde edildiği görüldü. Ayrıca aynı çalışmada total fenolik birikimi

açısından en verimli ortamın da 1.00 ppm IBA ve 1.00 ppm 6-BA içeren ve % 2.50 sukroz bulunan B5 besi ortamı olduğu belirlendi (Alpan-Çevik, 2004).

Bitki doku ve hücre kültürlerinde büyüme kinetiklerinin hesaplanmasına farklı yaklaşımlar getirilebilir. Bunlar arasında; yaş ve/veya kuru kütle, hücre sayısı, hücre canlılığı, paketlenmiş hücre hacmi, hücresel protein ve/veya DNA içeriği, mitotik indeks, kültür ortamı bileşenleri (örneğin; karbonhidratlar, nitrat, fosfat v.b.) ve iletkenliği sayılabilir. (Stafford ve Warren, 1991). Bu çalışmada büyüme kinetiklerinin hesaplanmasında yaş kütlede faydalanılmıştır.

Yaş kütle ölçümü, büyümenin ölçülmesinde karşılaşılan en yaygın parametredir. Bu parametre, yaş kütleinin belirli aralıklarla doğrudan tayinine dayanır ve özellikle biyokütle üretimi için tasarlanmış doku ve hücre kültürü sistemleri için idealdir (Stafford ve Warren, 1991). Yaş kütle ölçümüne dayalı büyümenin hesaplanmasında, kültür ortamından periyodik aralıklarla biyokütle tartımı yapılır. Biyokütleinin tartımı için öngörülen tartım aralığı, uygulanan kültür çeşidine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Örneğin; hücre süspansiyon kültürleri ile çalışılırken tartım üç günde bir yapılırken, bu süre kallus kültürleri için daha uzundur. Kültürün log evresine girmesi ile birlikte tartım aralıkları da kısalsabilir. Ancak, özellikle hücre süspansiyon kültürlerinde, kuru biyokütle ile verim hesaplanması daha uygun bir yaklaşımdır. Zira, biyokütleinin besi ortamından uzaklaştırılması esnasında yapılan filtrasyon işleminde sıvı kısım tam olarak uzaklaştırılmayabilir ve bu güvenli sonuç veremeyebilir (Sökmen, 1997).

Hangi parametre esas alınır alınsın bitki doku ve hücre kültürlerinde, büyümenin zamana karşı grafiği ele alındığında sigmoidal bir eğri ile karşılaşılır. Bu mikrobiyal kültürlerde olduğu gibidir ve dört ana evre göze çarpar Bunlar; lag (gecikme ve uyum), log (üssel artış), lineer (doğrusal) artış ve durağan evreleridir. Gerek büyüme modeli ve gerekse her safhanın uzunluğu, alt kültür süresine ve alt kültür için kullanılan ekim miktarına bağlıdır. Örneğin; ekim için kullanılan hücreler durağan evrede ise alt kültür; lag, log ve lineer artış evrelerinden geçerek tekrar durağan evreye ulaşır. Log evresinde yeni ortama alınan (alt kültürü yapılan) hücrelerde ise lag evresi gözlenmemektedir. Yine ekim miktarı da kültürlerin büyümesinde etkili bir faktördür. Az miktarda hücre ile ekim yapılırsa

alt kültür ortamında lag evresi çok uzun olmakta ve sonuçta eğrideki logaritmik evreye ait açığı küçülmektedir. Buna karşılık, yüksek hücre yoğunluğuna sahip alt kültürlerde durağan evreye geçmeden önce sınırlı sayıda hücre bölünmesi olmaktadır. İdeal ekim hacmi kültürler arasında farklılık göstermekte ve kültürü yapılan türe ve kültür koşullarına göre değişmektedir (Sakuta ve Komamine, 1987).

Bölüm 3’de verilen yaş kütle grafikleri dikkate alındığında, uygulamaların pek çoğunda yukarıda belirtilen dört ana evrenin gerçekleştiği görülmektedir. Ancak bazı uygulamalarda tam bir durağan evre izlenmemiştir (uygulama 6, 14 ve 15). Bu uygulamalarda durağan evrenin izlenebilmesi için birkaç haftalık bir periyoda daha ihtiyaç bulunmaktadır.

Mikrobiyal sistemlerdeki sigmoidal eğrinin yanı sıra, kültürde bulunan hücrelerin iki katına çıkış süreleri (t_d) ve özgül büyüme oranları (μ) da bitki doku ve hücre kültürleri ile benzerlik göstermektedir. Kültürde bulunan hücre sayısının iki katına ulaşması için gerekli süre t_d değeri olarak bilinir. Bir başka deyişle bu değer, bir hücrenin mitoz bölünme geçirerek kendi benzeri iki hücreyi oluşturması için geçen süre olarak da ifade edilebilir. İki katına çıkış süresi ile kültürde bulunan hücrelerin büyüme hızı arasında matematiksel olarak zıt bir ilişki bulunmaktadır. Bu sürenin kısa olması, hücrelerin daha kısa sürede bölünüp çoğaldıklarını ifade ederken, t_d ’nin büyük olması kültürün büyüme hızında yavaşlamaya işaret etmektedir. Yukarıda da belirtildiği üzere kültürde bulunan hücreler, büyüme açısından dört ana evreden geçmektedir. Bunların ilki olan lag (gecikme) evresinde hücrelerin iki katına çıkış süreleri yüksek seyrederek. İkinci aşama olan log (üssel artış) evresinde ise bu değer gecikme evresine göre daha düşüktür. Ancak kültürün lineer (doğrusal) artış evresinde iki katına çıkış süreleri daha da kısalmıştır ve kültür boyunca karşılaşılan en düşük değerler elde edilir. Bu dönem, hücrelerin en hızlı çoğaldığı evreye işaret eder. Durağan evrede ise tıpkı gecikme evresinde olduğu gibi iki katına çıkış sürelerinde tekrar artış görülür. Bölüm 3’de verilen uygulamaların çoğunda, iki katına çıkış sürelerinin ilk iki ya da üç haftalık periyot süresince yüksek seyrettiği, ancak bu noktadan itibaren 42-49. günlerin sonuna doğru düzenli bir şekilde azalma eğiliminde olduğu

görülmektedir. t_d değerleri, son iki hafta içerisinde tekrar artış göstermiştir. Bu olgu, kültürlerin durağan evreye girdiğine işaret etmektedir. Ancak, yukarıda da ifade edildiği gibi, bazı uygulamaların son haftalarında iki katına çıkış sürelerinin belirgin bir şekilde azalma göstermediği görülmüştür (uygulama 6, 14 ve 15). Bu durum, söz konusu ortamlardaki hücrelerin üssel artış evresini tamamlayamadıklarını ya da durağan evrenin henüz başladığını göstermektedir. Bu uygulamalarda durağan evreye ait t_d değerlerinin izlenebilmesi için yaklaşık iki ya da üç haftalık ilave bir kültür periyodunun uygulanması gerekmektedir.

Özgün büyüme oranları (μ), kültürde bulunan hücre popülasyonlarındaki değişikliğin matematiksel ifadesinde oldukça önemli bir unsurdur. Özellikle bazı sekonder metabolitlerin ve/veya enzimlerin üretimi söz konusu olduğunda hem en yüksek biyokütle veriminin hesaplanması hem de özgün büyüme oranının tespit edilmesi hayati önem taşımaktadır. Bölüm 3’de verilen özgün büyüme oranlarına bakıldığında bitki büyüme düzenleyicisi bulunmayan ortamdaki hücrelerin büyüme oranının 0.30 olduğu görülmektedir. Bu değer, yalnızca 1.00 ppm sitokinin bulunan ortamda 0.25’dir. Ancak sabit sitokinin derişimine karşı artan oksin derişimlerinin uygulandığı 3-8. uygulamalarda μ değerleri 0.30 ile 0.35 arasında değişim göstermektedir. Özellikle 4 (0.50 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA) ve 6 (2.00 ppm IBA + 1.00 ppm 6-BA) numaralı uygulamalarda özgün büyüme oranı, bu kategorideki en yüksek değerlerdir.

Diğer taraftan yalnızca 1.00 ppm oksin bulunan ortamdaki hücrelerin μ değeri 0.33 olarak gerçekleşirken, sabit oksin derişimine karşı artan sitokinin derişimlerinin uygulandığı 10-14. uygulamalarda 0.31 ile 0.37 arasında değişim göstermiştir. Özellikle büyüme düzenleyicileri olarak 1.00 ppm IBA ve 0.50 ppm 6-BA’nın kullanıldığı uygulama 11’de bu değer maksimumdur.

Sabit oksin derişimine karşı sitokinin derişimlerinde uygulanan değişiklikler, özgün büyüme değerinde ilk kategoriye göre daha fazla artış sağlamıştır. Bu da, sitokinin derişimlerinde uygulanan değişikliklerden bazılarının, hücrelerin büyümesi üzerine daha etkili olduğu sonucunu doğrulamaktadır. Özellikle ortamda % 2.50 (v/w) oranında sukroz bulunması

durumunda, 0.50 ppm düzeyindeki sitokin, hücrel artışı daha kuvvetli teşvik etmiştir.

Sukroz derişimlerinin % 1.00 (v/w) ile % 5.00 (v/w) arasında değişim gösterdiği 15-19. uygulamalarda ise, özgün büyüme oranının düzenli bir artış gösterdiği görülmüştür. % 1.00 (v/w) oranında sukroz bulunan 15 numaralı uygulamada μ değeri 0.34 iken, % 5.00 (v/w) oranında sukroz bulunan uygulama 19'da bu oran 0.41'dir. Buradan da anlaşılacağı üzere, büyüme düzenleyicileri olarak 1.00 ppm IBA ve 1.00 ppm 6-BA bulunması durumunda, sukroz derişiminin artırılması kültürdeki hücrelerin büyümesi üzerinde olumlu etki meydana getirmiştir.

Bölüm 3'de sunulan tüm uygulamalar göz önünde bulundurulacak olursa, en düşük yaş kütle veriminin 10.00 ppm IBA ve 1.00 ppm 6-BA'nın kullanıldığı 8 numaralı uygulamadan elde edildiği görülmektedir (3122.66 ± 475.28 mg).

Herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisinin bulunmadığı 1 numaralı uygulamadan 5066.33 ± 45.24 mg yaş kütle elde edildi. Bu değer, sabit sitokin derişimine karşı artan oksin derişimlerinin kullanıldığı kategorideki uygulamaların birçoğundan daha yüksek bir değerdir. Bu olgu, oksin derişimindeki varyasyonların, yaş kütle artışında etkili olmadığı sonucunu doğurmaktadır. Bu ortamdan elde edilen kuru kütle miktarı ise 184.33 ± 5.81 mg'dır.

Sabit sitokin derişimlerine karşı değişen oksin derişimlerinin kullanıldığı uygulamalarda (uygulama 3 ile 8 arası) yaş kütle verimleri yaklaşık olarak 3122.66 mg ile 4864.33 mg arasında değişmiştir. Sabit oksin derişimlerine karşı değişen sitokin derişimlerinin kullanıldığı uygulamalarda (Uygulama 10 ile 14 arası) ise bu değerler 3753.33 mg ile 10023.33 mg arasındadır. İlk kategoride oksin derişiminin 0.50 ppm'e kadar çıkarılması, yaş kütle verimini de artırmıştır. Ancak oksin derişiminde bu değerin üzerine çıkılması durumunda yaş kütle verimi olumsuz yönde etkilenmiştir. İkinci kategoride ise, sitokin derişiminin 5.00 ppm'e kadar artırılması ile yaş kütle veriminde de bir artış gözlenmiştir. Ancak sitokin derişiminin bu değerin üzerine çıkması ile birlikte yaş kütle veriminde ciddi bir düşüş gerçekleşmiştir. Yaş kütle verimi ile sitokin derişimi

arasındaki ilişkinin daha sağlıklı ortaya konulabilmesi için 5.00-10.00 ppm arasındaki sitokin derişimlerinin de uygulanması gerekmektedir. 13 numaralı uygulamadan elde edilen yaş kütle verimi (10023.33 ± 927.86), uygulamaların tümünden elde edilen en yüksek değerdir.

Yukarıda sözü edilen uygulamalardaki kuru kütle verimleri göz önünde bulundurulacak olursa, sabit sitokin derişimine karşı değişen oksin derişimlerinin kullanıldığı kategoride en yüksek verimin büyüme düzenleyicisi olarak sadece 1.00 ppm 6-BA bulunan ortamdan elde edildiği görülmektedir (273.00 ± 5.03 mg). Bunu, 0.50 ppm oksin içeren uygulama 4 izlemiştir. Sabit oksin derişimine karşı değişen sitokin derişimlerinin denendiği kategoride ise en yüksek kuru kütle verimi 282.00 ± 59.90 mg ile 13 numaralı uygulamadan elde edilmiştir.

Literatürde, farklı bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak kültür ortamındaki hücrelerin büyüme oranlarının değerlendirildiği çok sayıda çalışma mevcuttur. Kintzios ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada *Salvia officinalis* kallus kültürlerinde eşit derişimlerde oksin ve sitokin kullanımının, en yüksek yaş kütle verimi sağladığı belirtilmiştir (1.80 veya 18.00 μm 2,4-D ve kinetin). *Agastache rugosa* kallus ve hücre süspansiyon kültürleri ile yapılan bir başka çalışmada (Kim ve ark., 2001), 0.5 mg/l 2.4-D ve 0.1 mg/l kinetin içeren besi ortamının yüksek verim sağladığı bildirilmiştir. Karam ve ark. (2003) tarafından yapılan bir başka çalışmaya göre ise, oksin veya sitokin hormonlarının her birinin tek başına kullanılması, *Salvia fruticosa* kallus, hücre süspansiyon ve kök kültürlerinin gelişimi için yeterli olamamıştır.

Sukroz derişimlerinde değişiklikleri içeren uygulamalardaki (uygulama 15 ile 19 arası) yaş kütle verimleri ise 3454.00 mg ile 7783.33 mg arasında değişim göstermektedir. Sukroz derişiminin % 1.00 (v/w)'den % 4.00 (v/w)'e kadar artırılması ile birlikte yaş kütle verimi de düzenli olarak artmaktadır. Ancak bu noktadan sonra sukroz derişiminin artırılması, yaş kütle verimi düşürmüştür.

Bu kategoride en yüksek kuru kütle verimi ise yukarıdakinin aksine % 5.0 (w/v) oranında sukroz bulunan 5 numaralı uygulamadan elde edilmiştir. Bunu uygulama 4 izlemektedir.

Literatürde, artan sukroz derişimi ile kallus veya hücre süspansiyon kültürlerinde yaş ağırlık artışı arasında pozitif ilişkinin olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Kim ve ark. (2001) tarafından *Agastache rugosa* kallus ve hücre süspansiyon kültürleri ile yapılan bir çalışmada % 3.0 (w/v) oranında sukroz kullanılması durumunda 24.80 ± 5.20 mg/g rozmarinik asit elde edilirken, bu değer % 6.0 (w/v) oranında sukroz varlığında 31.40 ± 3.69 mg/g'a yükselmektedir. Karam ve ark. (2003)'a göre, *Salvia fruticosa* kallus, hücre süspansiyon ve kök kültürlerinde % 4.0 (w/v) sukroz, en yüksek rozmarinik asit birikimi sağlamaktadır. Bauer ve ark. (2004) tarafından yapılan bir başka çalışmada, ortamda % 4.0 ya da % 5.0 (w/v) oranında sukroz bulunması durumunda % 3.0 (w/v) sukroz'a göre daha yüksek rozmarinik asit birikimi gerçekleşmiştir. Gertlowski ve Petersen'e göre (1993) *Coleus blumei* hücre süspansiyon kültürlerinde % 1.0 (w/v) sukroz kullanılması durumunda dikkate değer bir rozmarinik asit birikimi gerçekleşmezken, % 5.0 (w/v) sukroz kullanıldığında kuru kütle ağırlığının % 12'si oranında rozmarinik asit elde edilebilmektedir. Diğer yandan Ilieva ve Pavlov (1997) tarafından *Lavandula vera* MM hücre süspansiyon kültürlerinde yapılan bir başka araştırmaya göre ise, kültür ortamında % 7.0 (w/v) oranında sukroz bulunması, 507.50 mg/l rozmarinik asit üretimi ile sonuçlanmıştır.

Karanlık ortamda kültüre alınan bitkisel hücreler, metabolik aktivitenin devamlılığı için dışardan karbon kaynağına gereksinim duymaktadırlar. Bitki doku kültürlerinde en çok gereksinim duyulan karbon kaynağı sukrozdur. Sukroz, kültür ortamındaki hücreler tarafından metabolize edilerek glukoz ve fruktoza dönüştürülmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda ortamda bulunan glukozun, fruktoza göre daha aktif kullanıldığı tespit edilmiştir (Kim ve ark., 2001). Ayrıca sukroz, fotosentez sonucunda oluşan glukozun gerekli bölgelere taşınmasında kullanılan indirgenmeyen bir disakkarittir (Gözükara, 1997; Fowler ve Stepan-Sarkissian, 1985).

Hücre kültürlerinde sekonder metabolit birikimi ile büyüme arasındaki ilişki değerlendirilerek iki ana model oluşturulabilir. Bunlar antosiyanin ve betasiyanin tip metabolit üretim modelleridir. Birinci model (antosiyanin tip) pek çok hücre

kültürü için geçerlidir. Burada büyüme ile metabolit birikimi arasında zıt ilişki bulunmaktadır (Lindsey ve Yeoman, 1983; Tal ve ark., 1984; Steffens ve ark., 1985; Sökmen ve Gürel, 2001). Noe ve ark. (1980) tarafından havuç (*Daucus carota*) hücre süspansiyon kültürlerinde yapılan bir çalışmada, lag (gecikme) ve log (üssel artış) evrelerinde antosiyanin birikimi gerçekleşmemiştir. Birikim, ancak lineer (doğrusal) artış evresinin sonlarına doğru artmış ve durağan safhada en yüksek düzeye ulaşmıştır. Bu durum, pek çok sekonder metabolitin (diosgenin, fenolik bileşikler, berberin v.b.) üretimi için geçerlidir. Antosiyanin tip üretimde, gerek öncül maddelerin birikimindeki artış veya azalış ve gerekse biyosentez mekanizmalarında işlev gören enzimlerin seviyelerine paralel olarak sekonder metabolit birikimi de değişmektedir. Primer metabolizmanın akışı, belli bir noktada yol ayırımına gelmektedir. Bu yol ayırımında birinci yol farklılaşmamış büyümede rol oynamakta, ikincisi ise farklılaşmayı sağlamaktadır. Betasiyanin tip birikim birinci yolun sonunda, antosiyanin tip birikim ise ikinci yolun sonunda oluşmaktadır. Pek çok bitki hücre kültüründe, farklılaşma ile metabolit üretimi arasında doğrusal bir ilişki vardır.

Fenolik asitlerin üretimi ile büyüme arasındaki zıt ilişki özetlenecek olursa: Fenolik asitlerin biyosentezi, şikimik asit ve malonik asit yolları üzerinden gerçekleştirilmektedir. Özellikle şikimik asit sentez yolu, birçok bitkisel fenolik için en sık kullanılan biyosentez yoludur. Şikimik asit metabolik yolu, glikoliz ve pentoz fosfat yolunda oluşan basit karbonhidrat öncüllerini aromatik amino asitlere dönüştürür (Hermann ve Weaver, 1999). Bitkilerde en sık rastlanan sekonder fenolik bileşik grupları fenilalanin'den köken alır. Fenilalanin'den amonyum molekülünün uzaklaşmasıyla sinamik asit oluşur (Şekil 1.3). Bu tepkimeyi katalizleyen fenilalanin amonyum liyaz (PAL), bitkisel sekonder metabolizmada en çok çalışılan enzimlerden birisidir. PAL, primer ve sekonder metabolizmanın tam ayrılma noktasında bulunduğundan, birçok fenolik bileşiğin oluşumunda önemli bir düzenleyici basamağı katalizler (Taiz ve Zeiger, 2002).

Bölüm 3'deki kuru kütle/rozmarinik asit değişimi grafikleri incelendiğinde, 9-12. uygulamalar haricindeki tüm veriler, antosiyanin tip rozmarinik asit üretimi ile tutarlı olduğunu göstermektedir. Özellikle durağan evrenin başladığı 42-49.

günler, aynı zamanda rozmarinik asit birikiminin de ivme kazandığı dönemlerdir. Bu bulgu, yapılan bazı çalışmalar ile de paralellik arz etmektedir. Karam ve ark. (2003)'a göre kallus, hücre süspansiyon ve kök kültürlerinde kültür periyodu boyunca yavaş bir değişim gösteren rozmarinik asit miktarı, bu periyodun son iki haftası içerisinde en yüksek artışı göstermiştir. Bauer ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmaya göre ise rozmarinik asit miktarı 58 günlük kültür periyodu boyunca sürekli değişim göstermesine rağmen, durağan evrenin başladığı 43. günden itibaren maksimum seviyeye ulaşmıştır. Gertlowski ve Petersen (1993)'e göre, 14 günlük periyot boyunca *Coleus blumei* hücre süspansiyon kültürlerinde en yüksek rozmarinik asit verimi, durağan evrenin hakim olduğu 8-14. günler arasında elde edilmiştir.

Ancak büyüme düzenleyicisi olarak yalnızca 1.00 ppm IBA'nın kullanıldığı uygulama 9 ile sabit oksin derişimlerine karşı sırasıyla 0.10, 0.50 ve 2.00 ppm sitokinin derişimlerinin kullanıldığı 10, 11 ve 12 numaralı uygulamalarda rozmarinik asit düzeyi, kültür başlangıcından son haftaya kadar düzenli olarak azalma eğilimindedir. Buradan, 2.00 pm'e kadar artırılan 6-BA derişimlerinin, rozmarinik asit miktarında artışa yol açmadığı anlaşılmaktadır. Bu kategorideki 5.00 ve 10.00 ppm'lik sitokinin derişimlerinin uygulanması durumunda (uygulama 13 ve 14), rozmarinik asit birikiminin, antosiyanin tip sekonder metabolit birikim modeli ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Bu uygulamalardan elde edilen rozmarinik asit miktarı hemen hemen eşit düzeydedir. Bu bulgu, 1.00 ppm IBA derişimine karşı uygulanan 5.00 ve 10.00 ppm'lik 6-BA derişimlerinin, rozmarinik asit miktarında önemli bir değişiklik meydana getirmediği sonucunu doğurmaktadır.

Sabit sitokinin derişimine karşı değişen oksin derişimlerinin uygulandığı ilk kategoride rozmarinik asit miktarları 9.95 ± 0.87 mg/g ile 62.27 ± 1.53 mg/g arasında değişim göstermektedir. Bu kategorideki en yüksek rozmarinik asit miktarı, aynı zamanda kallus kültürlerinin başlatılması için de kaynak besi ortamı olarak kullanılan 5 numaralı uygulamaya aittir. Burada oksin derişiminin 1.00 ppm'e kadar artırılması ile birlikte rozmarinik asit miktarı da düzenli olarak artma

eğilimindedir. Ancak, bu noktanın üzerindeki IBA derişimleri, rozmarinik asit miktarında düzenli bir azalma meydana getirmiştir.

Literatürde rozmarinik asit'in, değişik bitkilerin kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde üretildiği çok sayıda çalışma mevcuttur (Zenk ve ark., 1977; De-Eknamkul ve Ellis, 1984; Hippolyte ve ark., 1992; Petersen ve ark., 1994).

Literatür verilerine dayalı olarak her bitki için farklı bitki büyüme düzenleyicisi birleşimleri ve derişimlerinin optimum olduğunu söylemek doğaldır. Nitekim, Kintzios ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada *Salvia officinalis* ve *S. fruticosa* yaprak kallus kültürlerinin, eşit ve yüksek oranda oksin ve sitokin kullanılması durumunda maksimum rozmarinik asit biriktirdiği rapor edilmiştir. Kim ve ark. (2001) tarafından yapılan bir başka çalışmaya göre ise, *Agastache rugosa* hücre süspansiyon kültürlerinde 5:1 oranında 2,4-D ve kinetin kullanılması durumunda maksimum rozmarinik asit miktarı elde edilebilmiştir.

Ancak, bitki büyüme düzenleyicisi kullanılmayan ortamlarda hedef metabolitin üretiminde sorunlar yaşanmaktadır. Nitekim uygulama 1'den de görüleceği gibi, rozmarinik asit birikimi oldukça düşük seviyededir. Buna benzer sonuçlar, Karam ve ark. (2003) tarafından *S. fruticosa* kallus, hücre süspansiyon ve kök kültürü ile yapılan çalışmalarda da görülmektedir.

Sukroz derişimlerinde değişikliklerin denendiği 15-19. uygulamalarda, rozmarinik asit miktarı 30.12 ± 0.43 mg/g ile 82.34 ± 0.26 mg/g değişim göstermiştir. Özellikle sukroz derişiminin % 3.00 (v/w)'e kadar artırılması ile birlikte rozmarinik asit miktarı da doğrusal olarak artmıştır. Ancak, sukroz derişiminin bu oranın üzerine çıktığı 18 ve 19 numaralı uygulamalarda rozmarinik asit miktarı tekrar düşmüştür.

Literatürde sukroz derişimlerinin, rozmarinik asit birikimi üzerine etkisinin incelendiği çok sayıda çalışma mevcuttur (Gertlowski ve Petersen, 1993; İlieva ve Pavlov, 1997; Kim ve ark., 2001; Pavlov ve ark., 2002; Karam ve ark., 2003; Bauer ve ark., 2004).

Bir kafeik asit ve 3,4-dihidro fenil laktik asit esteri olan rozmarinik asit, ilk defa *Coleus blumei* hücre süspansiyon kültürleri yoluyla üretilmiştir (Zenk ve ark., 1977; Razzaque ve Ellis, 1977). Bu gelişmenin ardından, yüksek sukroz

derişiminin rozmarinik asit birikimi üzerideki olumlu etkisi ilk defa Ulbrich ve ark. (1985) tarafından ortaya konulmuştur. Bu araştırcılara göre *C. blumei* hücre kültürlerinde % 7.00 (w/v) oranında sukroz bulunması durumunda maksimum rozmarinik asit birikimi sağlanabilmektedir.

İlieva ve Pavlov (1997) da % 7.00 (w/v) oranında sukroz kullanarak *Lavandula vera* MM hücre süspansiyon kültürlerinde, % 3.00 sukroz içeren kültürlerle göre yaklaşık 200 kat daha fazla rozmarinik asit elde etmeyi başarmışlardır. Karam ve ark. (2003) tarafından *Salvia fruticosa* kallus, hücre süspansiyon ve kök kültürleri ile yapılan bir başka çalışmaya göre ise, % 4.00 (w/v) oranında sukroz kullanılması durumunda yüksek rozmarinik asit verimi elde edilmiştir. Yine bu araştırmacıya göre, ortamda yüksek sukroz bulunması durumunda ozmotik potansiyel artacağından dolayı su alımı azalmasına bağlı olarak hücrel gelişim ve organ oluşumu yavaşlayacaktır.

Gertlowski ve Petersen (1993) tarafından *Coleus blumei* hücre süspansiyon kültürleri ile yapılan diğer bir çalışmada ise rozmarinik asit üretimi için en uygun sukroz derişiminin % 4.00 olduğu belirtilmiştir.

Yukarıda belirtilen ifadelerden de anlaşılacağı üzere, her bitkinin karbon kaynağı ve derişimi gereksiniminin, rozmarinik asit üretimi açısından farklılık arz ettiği görülmektedir. *S. hortensis* kallus kültürleri ile yapılan ve burada sunulan çalışma sonucunda rozmarinik asit üretimi için en ideal sukroz derişiminin % 3.00 (v/w) olduğu söylenebilir. Ancak % 3.00 ile % 4.00 arasındaki sukroz derişimlerinin, rozmarinik asit birikimi üzerindeki etkilerinin daha sağlıklı anlaşılabilmesi için sözü edilen derişimler için daha ayrıntılı bir çalışmanın yapılması gerekmektedir.

Bitki doku kültürlerinde gözlenen en önemli sorunlardan birisi de hiperhidrisite (yüksek su birikimi) veya vitrifikasyon (camlaşma) adı verilen fizyolojik olaydır. Bu genel sorun, özellikle doku kültürleri ile üretilen bitkilerin dış ortam koşullarına aktarıldığında yeni ortamlarına alışmasında ciddi güçlükler çıkarmaktadır (Bela ve ark., 1998; Ueno ve ark., 1998). Bu sorunun giderilmesi yönünde değişik bitkilere ait doku kültürlerinde farklı uygulamalar rapor edilmektedir. Örneğin; polisakkarit üreten bir *Pseudomonas* türünün

hiperhidrisiteyi önlediği görülmüştür. Bu bakteri ile aşıl原因an doku kültürlerinde bir taraftan hiperhidrisite önlenirken, diğer taraftan bitki için fizyolojik yönden önemli olan pek çok fenolik bileşiğin endojen düzeylerinde artış sağlanmıştır (Shetty ve ark., 1996; Kwok ve Shetty, 1997; Strycharz ve Shetty, 2002). Hiperhidrisitenin önlenmesinde farklı kaynaklardan elde edilen çeşitli organik maddelerin diğer doku kültürlerindeki etkileri araştırılmıştır. *Origanum* doku kültürlerinde balık protein hidrolizatlarının asetil salisilik asit ile farklı birleşimler halinde verilmesi sonucunda hem hiperhidrisitenin önlendiği hem de toplam fenolik bileşik sentezi ve birikiminde artış sağlandığı tespit edilmiştir (Andarwulan ve Shetty, 1999).

Hiperhidrisiteli kültürlerde biyokütle verimi düşebilir. Biyokütle verimindeki düşüş de hedef metabolitin üretiminde azalmayı beraberinde getirecektir. Ancak hiperhidrisitenin getireceği asıl risk kültürlerin devamlılığında, yani alt-kültür yapılabirliğinde (sub-culturability) yatmaktadır. Zira, kültürdeki hücrelerin aşırı su içeriği, morfolojik olarak bozuk hücrelerin oluşmasına yol açabilir ve bu olay hücrelerin alt-kültür potansiyelini düşürebilir. Ayrıca bu hücrelerin mikroçoğaltımda kullanılması da zorlaşabilir (Kwok ve Shetty, 1997; Strycharz ve Shetty, 2002).

Bulgular kısmındaki veriler değerlendirildiğinde, sabit sitokinin derişimine karşı değişen oksin derişimlerinin kullanıldığı uygulamalarda su içeriğinin % 92.05 ile 97.47 arasında değişim gösterdiği görülmektedir. Özellikle, sadece 1.00 ppm sitokinin içeren 2 numaralı uygulamanın su içeriği, bu kategoriden elde edilen en düşük değerdir. Oksin derişiminin 0.50 ppm düzeyine kadar artırılması ile su içeriğinde de bir artış gözlenirken, bu derişimin üzerindeki oksin değerleri su içeriğini tekrar düşürmüştür.

Sabit oksin derişimine karşı değişen sitokinin derişimlerinin denendiği ikinci kategoride ise su içerikleri % 94.43 ile % 97.59 arasında değişim göstermiştir. Yukarıdaki duruma benzer şekilde, sitokinin derişiminin 0.50 ppm düzeyine kadar çıkarılması ile birlikte su içeriği de yükselmekte, fakat bu derişimin üzerinde su içeriklerinde % 1-2 oranında azalma görülmektedir.

Sukroz derişimlerinin denendiği 15-19. uygulamalarda ise sukroz derişimi artışı ile birlikte su içeriğinde de azalma gözlenmektedir. Özellikle % 5.00 (v/w) oranında sukroz bulunan 19 numaralı uygulamada su içeriği % 89.33 olarak tespit edilmiştir. Bu değer aynı zamanda tüm uygulamalardan elde edilen en düşük su içeriğidir. Sukroz derişiminin ortamda ozmotik stres meydana getirdiği bilinmektedir. Artan ozmotik potansiyel, hücrelerin dış ortamdaki su almaları karşısında bir kuvvet oluşturmakta ve kültür ortamındaki hücrelerin su içeriğinin azalmasına neden olmaktadır (Pierik, 1987).

S. hortensis doku kültürlerinde herhangi bir uygulama yapılmaksızın sadece temel besi ortamı tuzlarının kullanılması ile hiperhidrisitenin önlenemeyeceği görülmektedir. Bölüm 3'deki tablolarda verilen sonuçlar incelendiğinde dokuların su içeriklerinin oldukça yüksek olduğu yani kültürlerin hiperhidrik olduğu görülmektedir. Bu durum, *Lamiaceae* familyası üyeleri için yukarıda özetlenen bazı önlemlerin, *S. hortensis* kallus kültürleri için de uygulanması gerektiğini göstermektedir.

Fenolik bileşiklerin *in vitro* üretimi hususunda önemli bir noktayı belirtmekte fayda vardır. Bitkiler doğada savunma ve rekabet amacıyla yüksek miktarda fenolik bileşik üretebilir. Ancak *in vitro* koşullarda, yüksek oranda fenolik bileşik üretimi ve sonuçta oluşabilecek birikim, bizzat o kültür için toksik etkide bulunabilir. Özellikle hücre süspansiyon kültürlerinde karşılaşılan bu sorunu gidermek amacıyla kültür ortamına aktif karbon veya polivinilprolidan ilave edilir (Sökmen, 1997; Babaoğlu *ve ark.*, 2001).

Sonuç olarak kallus ve/veya hücre süspansiyon kültürlerinde fenolik bileşiklerin (özellikle fenolik asitlerin) üretiminde "toksisite" faktörünün de göz önüne alınması gerekir. Burada sunulduğu gibi rozmarinik asit birikimi ile birlikte diğer fenoliklerin miktarı da artabilir.

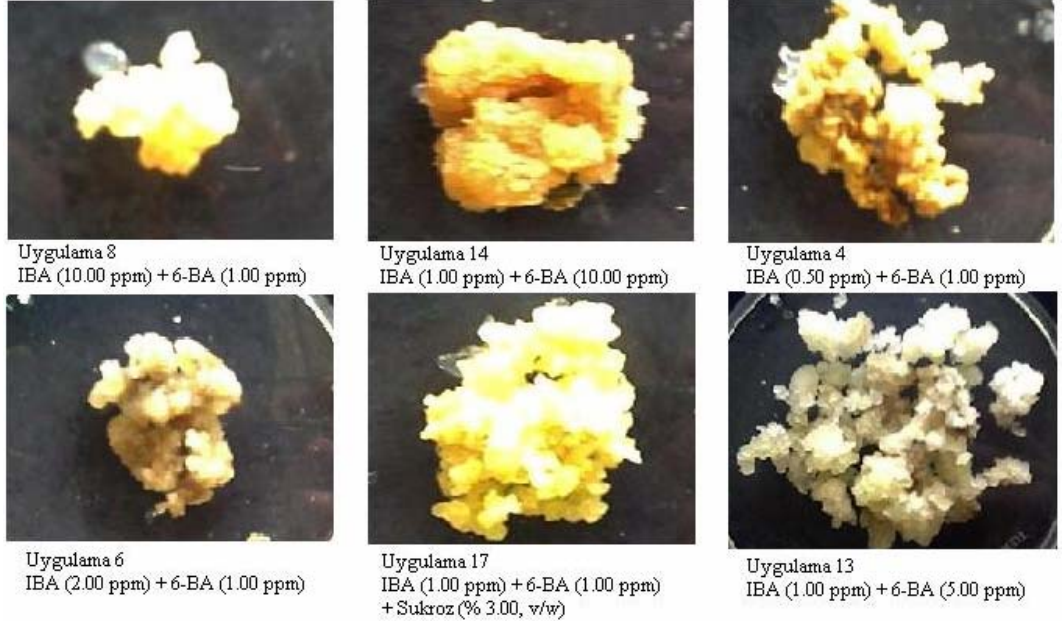
Yapılan gözlemler sonucunda, kallus dokularında son haftadan itibaren kahverengi nekrotik lekelerin oluşmaya başladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Kim *ve ark.* (2001) tarafından öne sürülen bir hipoteze göre, kahverengi nekrotik lekelerin oluşması, kallus dokusundaki rozmarinik asit miktarının azalmasına yol açmaktadır. Bu araştırmacılara göre kahverengileşmeden sorumlu olan reaksiyon,

peroksidaz benzeri enzimler tarafından rozmarinik asidin oksidatif yıkımıdır. Bu olay kültürlerde yaşlanma süreci boyunca meydana gelmekte ve hücrenin daha ileri aşamada dejenere olmasına yol açmaktadır (Lopez-Arnaldos *ve ark.*, 1994). Ancak Kintzios *ve ark.* (1999)'a göre, durağan dönemde kahverengi nekrotik lekeler oluşmaya başlamış kallus ortamına dışarıdan askorbik asit ilavesi ile bu oluşumun önüne geçilebilmekte ya da geciktirilebilmektedir. Uygulamaların bazılarında elde edilen kallus görünüşleri Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *S. hortensis* kallus kültürlerinde kahverengi nekrotik lekelerin görünümü

Taze *S. hortensis* bitkisinin, spektrofotometrik ve HPLC analizleri sonucunda sırasıyla 25.02 ± 1.21 mg/g ve 23.44 ± 1.14 mg/g rozmarinik asit tespit edilmiştir. Tablo 3.20 ve 3.21'deki veriler incelendiğinde, spektrofotometrik ve HPLC analizleri arasında yüksek tutarlılık olduğu görülmektedir. Rozmarinik asit veriminin en yüksek olduğu 17 no'lu uygulamadan yola çıkılarak, *S. hortensis* bitkisinde kallus kültürleri yolu ile doğal şartlara göre 3.92 kat daha fazla üretim sağlandığı söylenebilir.



Şekil 4.2. *S. hortensis* kallus kültürü uygulamalarından bazı görünümeler

Literatürde değişik doku ve hücre kültürü sistemleri kullanılarak ana bitkiye göre daha yüksek düzeyde sekonder metabolit üretimi yapılabileceğine dair deliller mevcuttur. Bunların en çarpıcı örneği, *C. blumei* hücre süspansiyon kültürlerinde, kültür kuru ağırlığının % 21'ine varan oranlarda rozmarinik asit birikiminin sağlanmasıdır (Ulbrich ve ark., 1985). Ancak bizim çalışmamızda ele alınan bitki türü (*S. hortensis*) üzerinde şimdiye kadar rozmarinik asitin dışında herhangi bir sekonder metabolitin doku ve/veya hücre kültürleri ile üretimi ele alınmadığı için, elde edilen verilerin gelecekte yapılacak çalışmalar için ümit verici olduğu söylenebilir.

Sonuç ve Öneriler

Tıbbi bitkilerin, çevresel ve jeopolitik düzensizliklerden dolayı doğal habitatlarda yetişme şanslarının her geçen gün daha çok kısıtlandığı bilinen bir gerçektir. Böylesi bir durumda, bitkisel kökenli faydalı bileşenlerin üretiminde de gün geçtikçe zorluklar yaşanmaktadır. Bu gelişmeler, bilim insanlarının yanı sıra pek çok endüstriyel kuruluşu, bitkisel farmasötiklerin üretimi için alternatif bir yol olarak hücre kültürlerine yönlendirmektedir. Hücre kültürlerinin başlıca avantajları şöyle sıralanabilir (Mulabagal ve Tsay, 2004):

- i. Biyoaktif sekonder metabolitlerin sentezi kontrollü laboratuvar şartları altında ve iklimsel ve toprak koşullardan bağımsız olarak gerçekleşmektedir.
- ii. Sekonder metabolit üretimini etkileyebilecek mikroorganizma ve insekt saldırıları gibi olumsuz biyolojik etkenler ortadan kaldırılabilir.
- iii. En yüksek sekonder metabolit üretimi sağlayan bitkisel hücre hatlarının seçimi, bu teknikler ile oldukça kolaydır.
- iv. Hücresel gelişim ve metabolik süreçlerin kontrol altında tutulabilmesi, üretimi artırmakla birlikte maliyeti de düşürmektedir.

Bitki hücre kültürleri vasıtasıyla üretilen faydalı fitokimyasallar, genellikle vakuollerde ve diğer organellerde biriktirilmektedir. İdeal olanı, bu bileşenlerin kültür ortamına salgılanmalarının sağlanabildiği bitki hücre kültürü sistemlerinin geliştirilmesidir. Bazı araştırmacılar rozmarinik asidin kültür ortamına salınmasını sağlayarak, bu bileşiğin üretiminde daha yüksek verim elde edilebileceğini göstermişlerdir (Park ve Martinez, 1992; Martinez ve Park, 1993; Park ve Martinez, 1994;). Bu araştırmacılar kültür ortamındaki bitkisel hücreleri dimetil sülfoksit (DMSO) ile muamele ederek hücresel permeabilityi artırmış ve böylelikle rozmarinik asit'in daha kolay bir şekilde ortama salınmasını sağlamışlardır.

Herhangi bir sekonder metabolitin, bitki hücre veya doku kültürleri yolu ile üretimlerini artırmanın bir diğer yolu da ortama öncül ilavesidir. Eğer sözü edilen fitokimyasalın biyosentez yolu ve bu yolda iş gören enzimler ve ara ürünler iyi biliniyorsa, bu sürece dışarıdan başlangıç materyali ve/veya ara ürün ilavesi yoluyla hedef metabolit veriminin artırılması mümkün olabilmektedir. Nitekim

Pavlov ve İlieva (1999), kültür ortamına, rozmarinik asit için birer başlangıç materyali olan fenilalanin ve tirozin ilavesi ile hedef metabolitin miktarını artırmayı başarmışlardır. Bir başka rozmarinik asit öncülü olan lithospermik asit B ilavesi ile de bu bileşiğin üretiminde artış sağlamak mümkündür (Chen ve ark., 1999).

Hedef metabolitin aynı zamanda bir bitkisel savunma ajanı olması durumunda, elisitör ilavesi de verimin ve kalitenin artırılması konusunda önemli alternatiflerden birisidir. Kültür ortamına fitopatojenik bir oomycete olan *Phytium aphanidermatum* özütü, metil jasmonat (Szabo ve ark., 1999) veya benzothiadiazole (BTH) (Kim ve ark., 2001) ilavesi rozmarinik asit üretiminde önemli faydalar sağlamaktadır.

S. hortensis bitkisinden başlatılan kallus kültürlerine ve bu kültürlerden rozmarinik asit üretiminin optimizasyonuna dair literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Bir bitkisel sekonder metabolit olan ve birçok alanda yararlı işlevlerinin bulunduğu bilinen rozmarinik asidin *S. hortensis* kallus kültürleri yoluyla üretimi için optimum bitki büyüme düzenleyicisi ve sukroz konsantrasyonları tespit edilmeye çalışılmıştır. Burada elde edilen veriler ışığında, sözü edilen bitkinin rozmarinik asit üretimi açısından önemli bir kaynak teşkil edebileceği söylenebilir. Ancak burada ele alınan tekniklerin dışında, farklı uygulamalar yoluyla da hali hazırda elde edilen rozmarinik asit miktarının artırılabilmesi mümkün olacaktır.

5. KAYNAKLAR

- Allan, E. (1991).** Plant cell culture. In: Plant Cell and Tissue Culture (Stafford, A., Warren, G., eds). pp. 1-23. Open University Press Buckingham, U.K.
- Alphan-Çevik, B. (2004).** Bazı besi ortamı bileşenlerinin *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) doku kültürlerinde büyüme, farklılaşma ve fenoliklerin birikimi üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, pp. 1-40, Sivas.
- Andarwulan, N., Shetty K. (1999).** Influence of acetyl salicylic acid in combination with fish protein hydrolysates on hyperhydricity reduction and phenolic synthesis in oregano (*Origanum vulgare*) tissue cultures. *J. Food Biochem.*, 23: 619-635.
- Aquino, R., Ciavatta, M.L., De Simone, F., Pizza, C. (1990).** A flavanone glycoside from *Hamelia patens*. *Phytochemistry*, 29: 2358-2360.
- Arrebola, L., Socorro, O., Barcelo-Munoz, A., Simon-Perez, E., Pliego-Alfaro, F. (1997).** Micropropagation of *Satureja obovata* Lag. *Hortscience*, 32: 1278- 1280.
- Azaz, D., Demirci, F., Satıl, F., Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C. (2002).** Antimicrobial activity of some *Satureja* essential oils. *Z. Naturforsch.*, 57: 817-821.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M. A. (2001).** Temel Laboratuvar Teknikleri, *Bitki Biyoteknolojisi*, Cilt 1. Doku Kültürü ve Uygulamaları (Eds. Babaoğlu M., Gürel, E., Özcan, S). pp. 1-35. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- Babaoğlu, M., Özcan, S. (2001).** Protoplast Kültürü ve Somatik Melezleme, *Bitki Biyoteknolojisi*, Cilt 1. Doku Kültürü ve Uygulamaları (Eds. Babaoğlu M., Gürel, E., Özcan, S). pp. 89-136. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- Barz, W., Daniel, S., Hinderer, W., Jaques, U., Kessmann, H., Koster, J., Otto, C., Tiemann, K. (1988).** Elicitation and metabolism of phytoalexins in plant cell cultures. In: Applications of Plant Cell and Tissue Culture, CIBA Foundation Symposium 137, pp. 178-198, JohnWiley & Sons, Chichester, New York Brisbane, Toronto, Singapore.

- Chen, H., Chena, F., Francis, C., Chiu, K. (2001).** The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 100-105.
- Başer, K.H.C. (1995).** Essential oils from aromatic plants which are used as herbal tea in Turkey, In: Flavours, Fragrance and Essential Oils. Proceedings of the 13th International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils (Başer, K.H.C., ed.). AREP Publications, Istanbul, Turkey, pp. 67-79.
- Bauer, N., Leljak-Levanic, D., Jelaska, S. (2004).** Rosmarinic acid synthesis in transformed callus culture of *Coleus blumei* Benth. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59c: 554-560.
- Baytop, T. (1997).** Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. Türk Dil Kurumu Yayınları. Ankara, p. 578.
- Bela, J., Ueno, K., Shetty, K. (1998).** Control of hyperhydricity in anise (*Pimpinella anisum*) tissue culture by *Pseudomonas* sp. *J. Herbs. Spices. Med. Plants*, 6: 57-67.
- Brown, E.G. (1985).** *Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, Vol. 26, pp. 1-10. In: Plant Products and the New Technology (ed. K.W. Fuller and J.R. Galon). Oxford University Press, Oxford.
- Bürün, B. (2001).** Hastaliksız Bitki Üretimi, *Bitki Biyoteknolojisi*, Cilt 1. Doku Kültürü ve Uygulamaları (Eds. Babaoğlu M., Gürel, E., Özcan, S). pp. 190-210. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- Bürün, B., Gürel, A. (2001).** Embriyo Kültürü, *Bitki Biyoteknolojisi*, Cilt 1. Doku Kültürü ve Uygulamaları (Eds. Babaoğlu M., Gürel, E., Özcan, S). pp. 324-344. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- Chen, H., Chen, F., Zhang, Y.L., Song, J.Y. (1999).** Production of rosmarinic acid and lithospermic acid B in Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures. *Process Biochemistry*, 34: 777-784.
- Corder, R., Douthwaite, J.A., Lees, D.M., Khan, N.Q., dos Santos, A.C.V., Wood, E.G., Carrier, M.J. (2001).** Endotelin-1 synthesis reduced by red

wine-Red wines confer extra benefit when it comes to preventing coronary heart disease. *Nature*, 414: 863-864.

- Curtin, M.E. (1983).** Harvesting profitable products from plant tissue culture. *Biotechnology*, 1: 644-657.
- D'Amelio, F.S. (1999).** Botanicals, A Phytocosmetic Desk Reference. CRC Press, London, pp. 361.
- Davis, P.H. (1982).** Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 7, Edinburgh University Press, Edinburgh, p. 322.
- De-Eknamkul, W., Ellis, B.E. (1984).** Rosmarinic acid production and growth characteristics of *Anchusa officinalis* cell suspension cultures. *Planta Medica*, 51:346-350.
- De Tommasi, N., De Simone, F., De Feo, V., Pizza, C. (1991).** Phenylpropanoid glycosides and rosmarinic acid from *Momordica balsamina*. *Planta Medica*, 57:201.
- Deans, S.G., Svoboda, K.P. (1989).** Antibacterial activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil and its constituents. *Journal of Horticultural Science*, 64: 205-210.
- Duncan, D.B. (1955).** Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11: 1-41.
- Ellis, B.E., Towers, G.H.N. (1970).** Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochem.J.*, 118:291-297.
- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., Boskou, D. (2002).** Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. *J. Agric. Food. Chem.*, 50: 5294-5299.
- Fesen, M.R., Kohn, K.W., Leteurtre, F., Pommier, Y. (1993).** Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2399-2403.
- Fowler, M.W. (1981).** Plant cell biotechnology to produce desirable compounds. *Chemistry and Industry*, 25: 229-233.
- Fowler, M.W. (1987).** *Process possibilities*. In: Plant and Animal Cells, (ed. C. Webb and F. Mavituna), pp. 21. Horwood, Chichester.

- Fowler, M.W., Stepan-Sarkissian, G. (1985).** Carbonhydrate source biomass productivity and natural product yield in cell suspension cultures. In: Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. (Neumann, K.H., Barz, W., Reinhard, E., eds), pp. 366-74. Springer-Verlag, Berlin.
- Fujita, Y., Tabata, M. (1987).** Secondary metabolites from plant cells-pharmaceutical applications and progress in commercial production. In Plant tissue and cell culture (ed. Gren, C.E., Somers, D.A., Hackert, W.P. and Biesboer, D.D.), pp. 169-185. Liss, New York.
- Furuya, T. (1988).** Production of useful compounds by plant cell cultures-de novo synthesis and biotransformation. *Yagugaku Zasshi*, 108: 675-696.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. (1968).** Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cultures. *Exper. Cell Res.*, 50: 151-158.
- Gertlowski, C, Petersen, M. (1993).** Influence of the carbon source on growth and rosmarinic acid production in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 34: 183-190.
- Güllüce, M., Sokmen, M., Daferera, D., Agar, G., Özkan, H., Kartal, N., Polissiou, M., Sokmen, A., Şahin, F. (2003).** In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 3958-3965.
- Hajhashemi, V., Sadraei, H., Ghannadi, A.R., Mohseni, M. (2000).** Antispasmodic and antidiarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. Essential oil. *J. Ethnopharmacol.* ,71: 187-192.
- Hausler, E., Petersen, M., Alfermann, A.W. (1992).** Rosmarinsäure in *Blechnum*- Spezies. In: Haschke, H.P., Schnarrenberger, C. (Eds.), Botanikertagung. Berlin. Akademie Verlag, Berlin, p. 507.
- Hermann, K.M., Weaver, L.M. (1999).** The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 473-503.
- Hiller, K. (1965).** Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoideae. 1. Mitteilung: *Sanicula europaea* L. -Isolierung und quantitative Erfassung von Chlorogen-und Rosmarinsäure. *Pharmazie*, 20: 574-579.

- Hippolyte, I., Marin, B., Baccou, J.C., Jonard, R. (1992).** Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. *Plant Cell Rep.*, 11: 109-112.
- Holzmannova, V. (1995).** Kyselina rosmarinova jeji biologicka aktivita. *Chem. Listy.*, 90: 486-496.
- Ilieva, M., Pavlov, A. (1997).** Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47: 683-688.
- Ilieva, M., Pavlov, A. (1999).** Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension culture: nitrogen effect. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15: 711-714.
- Karam, N.S., Jawad, F.M., Arikat, N.A., Shibli, R.A. (2003).** Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73: 117-121.
- Kelley, C.J., Mahajan, J.R., Brooks, L.C., Neubert, L.A., Breneman, W.R., Carmack, M. (1975).** Polyphenolic acids of *Lithospermum ruderales* Dougl. Ex Lehm. (Boraginaceae). 1. Isolation and structure determination of lithospermic acid. *J. Org. Chem.*, 40: 1804-1815.
- Kintzios, S., Nikolaou, A., Skoula, M. (1999).** Somatic embryogenesis and *in vitro* rosmarinic acid accumulation in *Salvia officinalis* and *S. fruticosa* leaf callus cultures. *Plant Cell Reports*, 18: 462-466.
- Kim, H.K., Oh, S.R., Lee, H.K., Huh, H. (2001).** Benzothiadiazole enhances the elicitation of rosmarinic acid production in a suspension culture of *Agastache rugosa* O. Kuntze. *Biotechnology Letters*, 23: 55-60.
- Kwok, D., Shetty, K. (1997).** *Pseudomonas* sp.-mediated regulation of total phenolic and rosmarinic acid levels in shoot-based clonal lines of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *J. Food Biochem.*, 20: 365-377.
- Komali, S.A., Zuoxing, Z., Shetty, K. (1999).** A mathematical model for the growth kinetics and synthesis of phenolics in oregano (*Origanum vulgare*) shoot cultures inoculated with *Pseudomonas* species. *Process Biochemistry*, 35: 227-235.

- Lasure, A., Van Poel, B., Pieters, L., Claeys, M., Grupta, M., Vanden Berghe, D., Vlietinck, A.J. (1994).** Complement-inhibiting properties of *Apeiba tibourbou*. *Planta Medica*, 60: 276-277.
- Leung, A.Y., Foster, S. (1996).** Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs, and Cosmetics, 2nd ed., Wiley & Sons., New York, pp. 465-466.
- Lindsey, K., Yeoman, M.M. (1983).** Novel experimental systems for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. In: Mantell S.H., Smith, H. (eds), *Plant Biotechnology*, pp. 39-66, Cambridge University Press, Cambridge.
- Litvinenko, V.I., Popova, T.P., Simonjan, A.V., Zoz, I.G., Skolov, V.S. (1975).** "Gerbstoffe" und Oxyzimtsäureabkömmlinge in Labiaten. *Planta Medica*, 27: 372-380.
- Lopez-Arnaldos, T., Lopez-Serrano, M., Ros Barcelo, A., Calderon, A.A. Zapata, J.M. (1994).** Tentative evidence of a rosmarinic acid peroxidase in cell cultures from Lavandin (*Lavandula χ intermedia*) flowers. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 34: 809-816.
- Lopez-Arnaldos, T., Lopez-Serrano, M., Ros Barcelo, A., Calderon, A.A. Zapata, J.M. (1995).** Spectrophotometric determination of rosmarinic acid in plant cell cultures by complexation with Fe²⁺ ions. *Fresen J Anal. Chem.*, 351: 311-314.
- Lu, Y., Foo L.Y. (1999).** Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 51: 91-94.
- Mansuroğlu, S., Gürel, E. (2001).** Mikroçoğaltım, *Bitki Biyoteknolojisi*, Cilt 1. Doku Kültürü ve Uygulamaları (Eds. Babaoğlu M., Gürel, E., Özcan, S). pp. 262-281. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- Martinez, B.C., Park, C.H. (1993).** Characteristics of batch suspension cultures of preconditioned *Coleus blumei* cells: sucrose effect. *Biotechnology Progress*, 9: 97-100.

- Mastelic, J., Jerkovic, I. (2003).** Gas chromatography-mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L. *Food Chemistry*, 80: 135-140.
- Mohagheghzadeh, A., Shams-Ardakani, M., Ghannadi, A., Minaeian, M. (2004).** Rosmarinic acid from *Zataria multiflora* tops and *in vitro* cultures. *Fitoterapia*, 75: 315-321.
- Mulabagal, V., Tsay, H.S. (2004).** Plant cell cultures-An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2,1: 29-48.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Noe, W., Langerbartels, C., Seitz, H.U. (1980).** Anthocyanin accumulation and PAL activity in a suspension culture of *Daucus carota* L. *Planta Medica*, 149: 283-287.
- Özcan, S., Babaoğlu, M., Sancak, C. (2001).** Somatik Embriyogenez, *Bitki Biyoteknolojisi*, Cilt 1. Doku Kültürü ve Uygulamaları (Eds. Babaoğlu M., Gürel, E., Özcan, S). pp. 71-88. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- Park., C.H., Martinez, B.C. (1992).** Enhanced release of rosmarinic acid from *Coleus blumei* permeabilized by dimethyl sulfoxide (DMSO) while preserving cell viability and growth. *Biotechnology and Bioengineering*, 40: 459-464.
- Park., C.H., Martinez, B.C. (1994).** Growth and production characteristics of permeabilized *Coleus blumei* cells in immobilized batch culture. *Plant Cell Reports*, 13: 459-463.
- Parnham, M.J., Kesselring, K. (1985).** Rosmarinic acid. *Drugs of the Future*, 10: 756-757.
- Pavlov, A., Ilieva, M. (1999).** The influence of phenylalanine on accumulation of rosmarinic acid and caffeic acids by *Lavandula vera* MM cell culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15: 397-399.

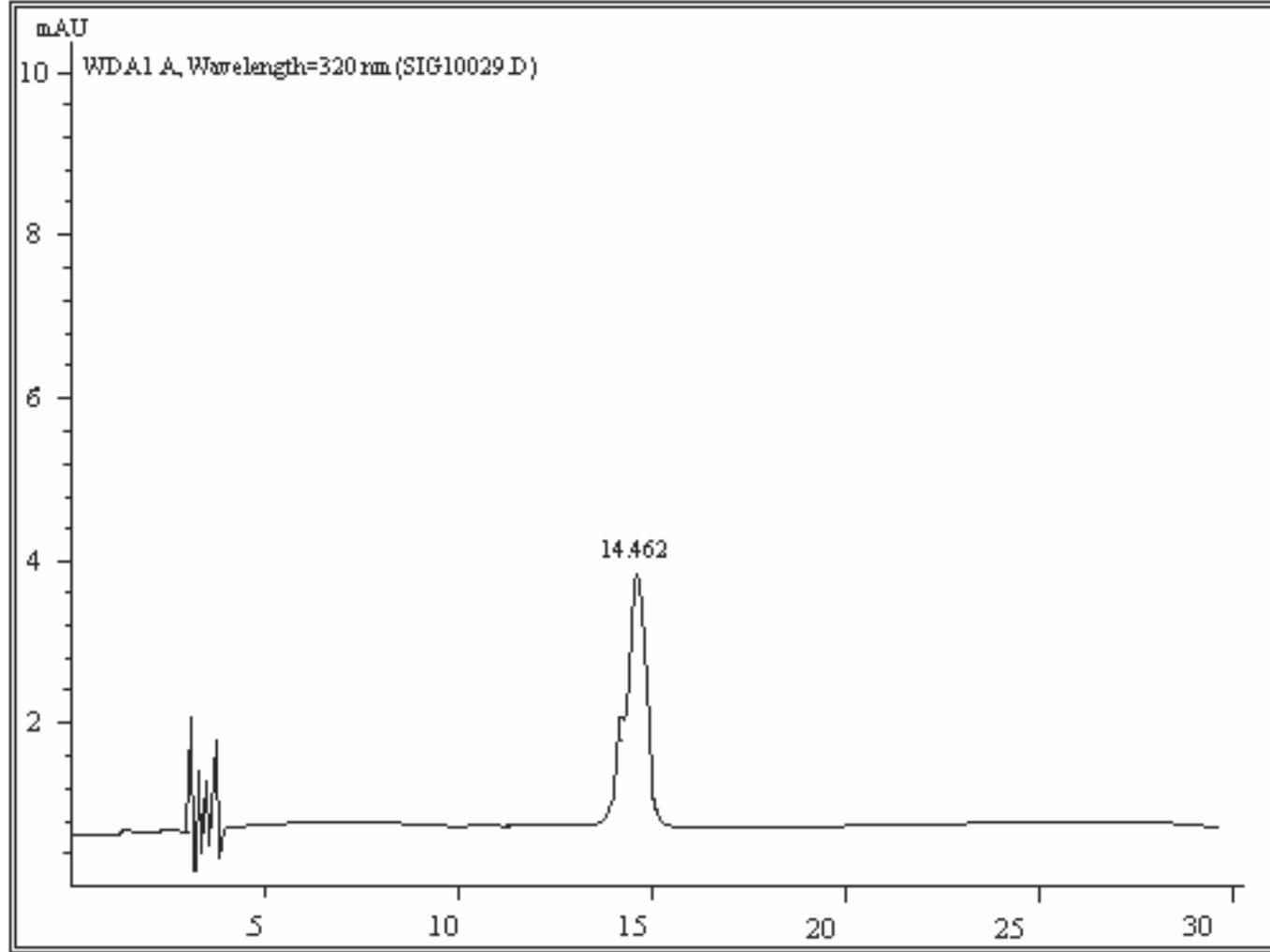
- Pavlov, A., Kovatcheva, P., Georgiev, V., Koleva, I., Ilieva, M. (2002).** Biosynthesis and radical scavenging activity of betalains during the cultivation of red beet (*Beta vulgaris*) hairy root cultures. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57c: 640-644.
- Petersen, M., Simmonds, M. (2003).** Molecules of Interest: Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62: 121-125.
- Petersen, M., Hausler, E., Meinhard, J., Karwatzki, B., Gertlowski, C. (1994).** The biosynthesis of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultures*, 38: 171-179.
- Pierik, R.L.M. (1987).** In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Rady, M.R., Nazif, N.M. (2005).** Rosmarinic acid content and RAPD analysis of in vitro regenerated basil (*Ocimum americanum*) plants. *Fitoterapia*, 76: 525, 533.
- Rawn, H., Pedersen, M.F., Andary, J., Borum, C, Anthoni, U., Cristophersen, C, Nielsen, P.H. (1994).** Seasonal variation and distribution of two phenolic compounds, rosmarinic acid and caffeic acid, in leaves and roots-rhizomes of eelgrass (*Zostera marina* L.). *Ophelia*, 40: 51-61.
- Razzaque, A., Ellis, B.E. (1977).** Rosmarinic acid production in *Coleus* cell cultures. *Planta Medica*, 137: 287-291.
- Sakuta, M., Komamine, A. (1987).** Cell growth and accumulation of secondary metabolites. In: Constabel F, Vasil IK (eds), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol 4, pp. 97-113, Academic Press, SanDiego, New York.
- Satake, T., Kamiya, K., Saiki, Y., Hama, T., Fujimoto, Y., Kitanaka, S., Kimura, Y., Uzawa, J., Endang, H., Umar, M. (1999).** Studies on the constituents of fruits of *Helicteres isora* L. *Chem. Pharm. Bull*, 47: 1444-1447.
- Sato, F., Yamada, Y. (1984).** High berberine-producing cultures of *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry*, 23: 281-285.
- Scarpati, M.L., Oriente, G. (1958).** Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *rosmarinus off.*). *Ric. Sci.*, 28: 2329-2333.

- Shetty, K., Carpenter, T.L., Kwok, D., Curtis, O.F., Potter, T.L. (1996).** Selection of high phenolic containing clones of thyme (*Thymus vulgaris* L.) using *Pseudomonas* sp. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 3408-3411.
- Sökmen, A. (1997).** Novel bioactive leads from the Turkish flora via plant cell cultures. Ph.D. Thesis, Sheffield University, Sheffield, UK.
- Sökmen, A., Jones, B. M., Erturk, M. (1999).** The *in-vitro* antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *Journal of Ehnopharmacology*, 67: 79-86.
- Sökmen, A., Gürel, E. (2001).** Sekonder Metabolit Üretimi, Bitki Biyoteknolojisi, Cilt 1 (*Doku Kültürü ve Uygulamaları*). pp.211-261. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- Staba, E.J. (1980).** Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Staba, E.J. (1985).** Milestones in plant tissue culture systems for the production of secondary products. *Journal of Natural Products*, 48: 203-209.
- Stafford, A., Warren, G. (1991).** Plant Cell and Tissue Culture, pp, 1-24. Open University Pres, Celtic Court, Buckingham.
- Strycharz, S., Shetty, K. (2002).** Response of oregano (*Origanum vulgare* L.) clonal lines to *Pseudomonas* sp. Z strain and polydye R-478 and implications for hyperhdricity prevention in tissue culture. *Process Biochemistry*, 38: 343-350.
- Steffens, P., Nakakura, N., Zenk, M.H. (1985).** Purification and characterization of the berberine bridge enzyme from *Berberis beaniana* cell cultures. *Phytochemistry*, 24: 2577-2583.
- Szabo, E., Thelen, A., Petersen, M. (1999).** Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Rep.*, 18: 485-489.
- Tada, H., Murakani, Y., Omoto, T., Shimomura, K., Ishimaru, K. (1996).** Rosmarinic acid and related phenolics in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry*, 42, 431-434.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2002).** Plant Physiology., Third Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland ,Massachusetts. p.690.

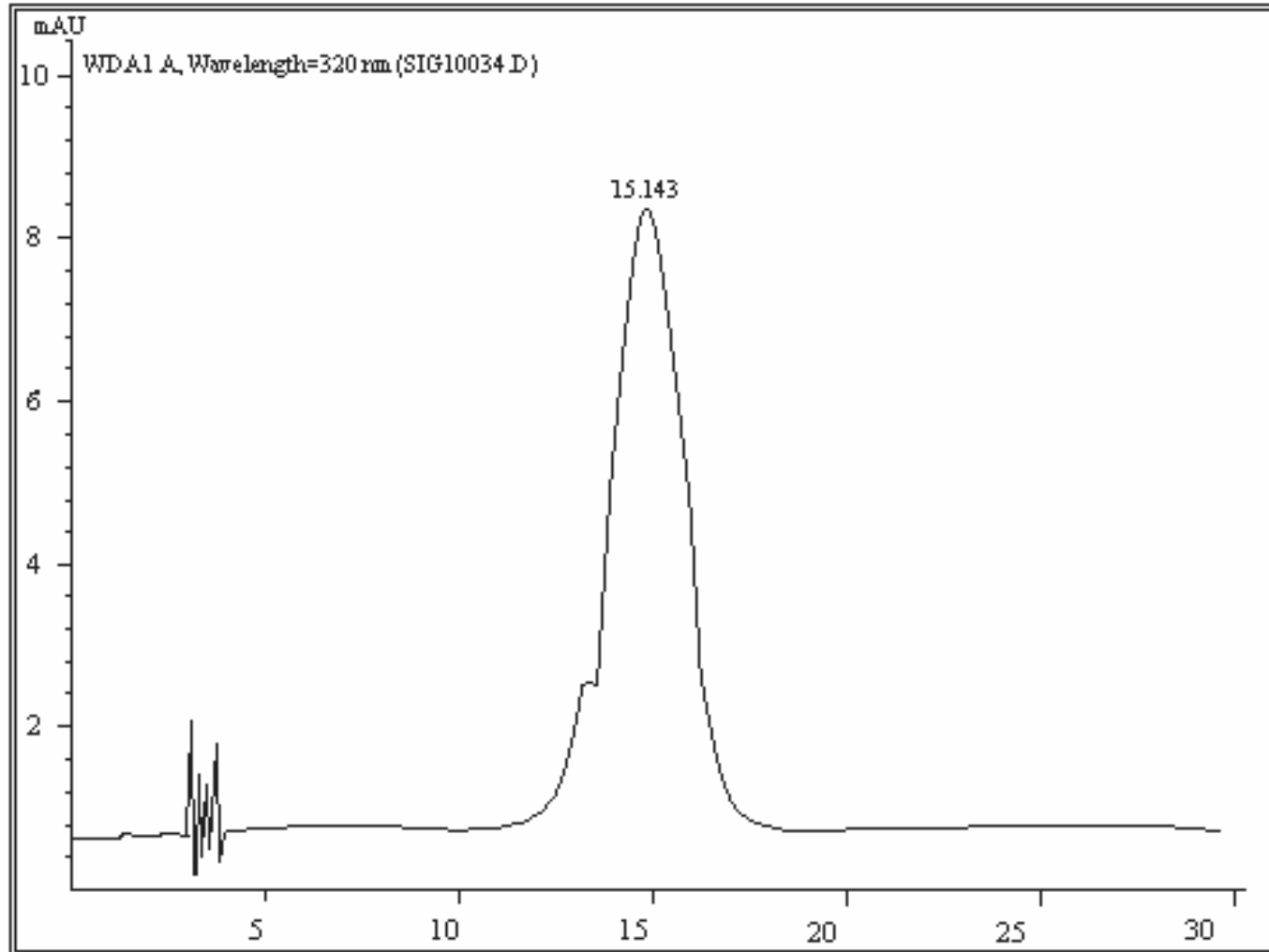
- Takeda, R., Hasegawa, J., Sinozaki, M. (1990).** The first isolation of lignans, megaceratonic acid and anthoceratonic acid, from non-vascular plants, Anthocerotae (hornworts). *Tetrahedron Letters*, 31: 4159-4162.
- Tal, B., Rokem, J.S., Goldberg, I. (1984).** Timing of diosgenin appearance in suspension cultures of *Dioscorea deltoidea*. *Planta Medica*, 50: 239-241.
- Tanaka, T., Morimoto, S., Nonaka, G., Nishioka, I., Yokozawa, T., Chung, H.Y., Oura, H. (1989).** Magnesium and ammonium-potassium lithospermates B, the active principles having a uremia-preventive effect from *Salvia miltiorrhiza*. *Chem. Pharm. Bull*, 37: 340-344.
- Trute, A., Nahrdtedt, A. (1986).** Separation of rosmarinic acid enantiomers by three different chromatographic methods (HPLC, CE, GC) and the determination of rosmarinic acid in *Hedera helix* L. *Phytochemical Analysis*, 7: 204-208.
- Tümen, G., Kırimer, N., Ermin, N., Başer, K.H.C. (1998).** The essential oils of two new *Satureja* species from Turkey: *Satureja pilosa* and *S. icarica*. *Journal of Essential Oil Research*, 10: 524-526.
- Ueno, K.I., Cheplick, S., Shetty, K. (1998).** Reduced hyperhydricity and enhanced growth of tissue culture-generated raspberry (*Rubus* sp.) clonal lines by *Pseudomonas* sp. isolated from oregano. *Process Biochemistry*, 33: 441-445.
- Ulbrich, B., Wiesner, W., Arens, H. (1985).** Large scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumei* Benth. In: Neumann, K.H., Barz, W., Reinhard, E. (Eds.), *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*. Springer, Berlin, Hiedelberg, pp. 293-303.
- Wu, J., Zhong, J.J. (1999).** Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: current technological and applied aspects. *Journal of Biotechnology*, 68: 89-99.
- Yan, Q., Shi, M., Ng, J., Wu, J.Y. (2006).** Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Science*, 170: 853-858.

- Yang, R.G., Shetty, K. (1998).** Stimulation of rosmarinic acid in shoot cultures of oregano (*Origanum vulgare*) clonal line in response to proline, proline analogue, and proline precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2888-2893.
- Zenk, M.H., El-Shagi, H., Arens, H., Stockigt, J., Weiler, E.W., Deuss, B. (1977).** In Plant tissue culture and its biotechnological application (ed. W. Barz, E. Reinhard, M.H. Zenk), p. 27. Springer-Verlag, Berlin.
- Zhong, J.J., Chen, H., Chen, F. (2001).** Production of rosmarinic acid, lithospermic acid B, and tanshinones by suspension cultures of Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in bioreactors. *Journal of Plant Biotechnology*, 3: 107-112.

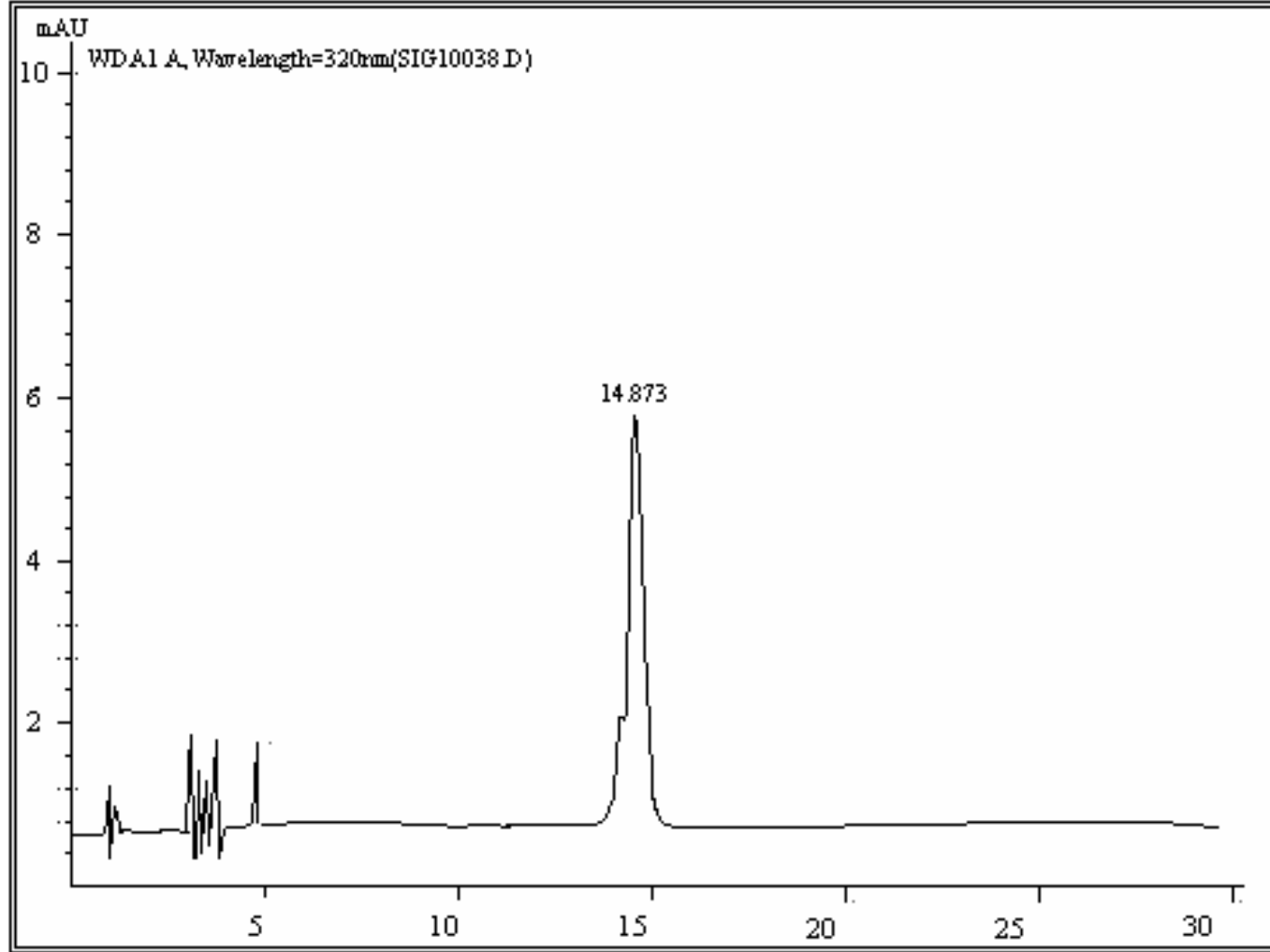
6. EKLER



Ek-1. *S. hortensis* MeOH özütünün HPLC kromatogramı



Ek-2. Uygulama 17'nin HPLC kromatogramı



Ek-3. 50 µg/ml düzeyinde standart rozmarinik asit çözeltisinin HPLC kromatogramı

7. ÖZGEÇMİŞ

25.11.1978 Sivas'ta doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Sivas'ta tamamladıktan sonra 1996 yılında Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. 2000 yılında mezun olan TEPE, aynı yıl C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programını kazandı. "*Lamiaceae* familyasına ait bazı bitki türlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması" başlıklı tez çalışması ile 2002 yılında "Uzman Biyolog" ünvanını kazandı. Yüksek lisans öğreniminin hemen ardından yine aynı enstitüde doktora programına başladı. 2000 yılından bu yana C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışan Bektaş TEPE'nin, Uluslararası Bilimsel Atıf İndeksi (SCI) tarafından taranan dergilerde yayınlanmış veya yayınlanma aşamasında olan 21 makalesi bulunmaktadır. Bu çalışmalar SCI verilerine göre bugüne kadar toplam 81 atıf almış durumdadır. Bu yayınlar, C.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı ve TÜBİTAK Uluslar Arası Bilimsel Yayınları Teşvik Programı (UBYT) çerçevesinde teşekkür ve teşvik sertifikaları ile ödüllendirdi.

Bektaş TEPE, 2002 yılından bu yana 3'ü uluslararası olmak üzere toplam 8 kongreye katıldı ve bu kongrelerde 9'u sözlü olmak üzere toplam 15 sunum gerçekleştirdi. Diğer taraftan, 1'i uluslararası olmak üzere toplam 5 araştırma projesinde yardımcı araştırmacı olarak görev aldı. Bunun yanı sıra TEPE, uluslararası indeksler tarafından taranan dergilere gönderilen 4 farklı bilimsel çalışmaya hakemlik yaptı. Bilimsel araştırma alanları arasında; ekonomik önemi olabilecek ve özellikle endemik bitkilerden doku ve hücre kültürlerinin başlatılması, bitki doku ve hücre kültürlerinde sekonder metabolitlerin üretimi ve optimizasyonu, doku kültürlerinin özütlenmesi ve özütlerde çeşitli biyoaktivite testlerinin (antibakteriyal, antifungal, antiviral ve sitotoksik) uygulanması, etnofarmakoloji, halk arasında ve yerel olarak tedavi amacıyla kullanılan bitkilerden özüt ve uçucu yağların hazırlanması ve biyoaktivite testleri ve biyoaktif bileşenlerin ayrılması ve saflaştırılması bulunmaktadır.

Bektaş TEPE, evli ve bir çocuk babasıdır.