

**KEKİK (*Origanum minutiflorum*) VE ADAÇAYI
(*Sideritis stricta*)'NİN DOKU KÜLTÜRÜ YOLUYLA
ÇOGALTIMI ÜZERİNDE ARASTIRMALAR**

**INVESTIGATION ON PROPAGATION OF OREGANO
(*Origanum minutiflorum*) AND IRONWORT
(*Sideritis stricta*) THROUGH TISSUE CULTURE**

DUDU ÖZKUM

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BIYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

2006

KEKİK (*Origanum minutiflorum*) VE ADAÇAYI (*Sideritis stricta*)'NİN DOKU KÜLTÜRÜ YOLUYLA ÇOGALTIMI ÜZERİNDE ARASTIRMALAR

Dudu ÖZKUM

ÖZ

Bu çalışmada, *Sideritis stricta* Boiss. & Heldr. ve *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis'un mikroçogaltimi araştırılmıştır. *In vitro* koşullarda çimlendirilmiş fidelerden alınan yaprak parçaları ve gövde eksplantları (hipokotil, tek bogum ve sürgün ucu), değişik 6-benzil amino pürin (BAP) (0.0, 1.0, 2.0 ve 3.0 mg/l) ve naftalen asetik asit (NAA) (0.0, 0.1 ve 0.5 mg/l) kombinasyonlarını içeren Murashige ve Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) ve Gamborg (B5) (Gamborg et al., 1968) ortamlarında kültüre alınmıştır. Elde edilen sürgünlerin alt kültür denemelerinde BAP (0.0, 1.0, 2.0 ve 3.0 mg/l) ve NAA (0.1 mg/l) kombinasyonlarını veya kinetin (2.0 ve 3.0 mg/l) ve BAP (2.0 ve 3.0 mg/l) içeren MS ve B5 ortamları, köklendirme denemeleri için 0.0, 1.5, 3.0, 4.5 ve 10 mg/l indol-3-butirik asit (IBA) içeren MS ve B5 ortamları kullanılmıştır. Her iki türün doku kültürü koşullarında çogaltımına olanak sağlayacak optimal koşullar belirlenmiştir.

S. stricta tohumlarının kabuğu çıkarılıp geri kalan embriyo ve endosperm kısmi B5 besin ortamında kültüre alındığında tohumlar % 100 oranında çimlenmiştir. B5 besin ortamında çimlendirilen ve büyütülen 30-40 günlük fidelerden alınan tek bogum eksplantları kullanılan tüm hormon kombinasyonlarında sürgün oluşumu bakımından başarılı eksplant olduğu, en başarılı hormon kombinasyonu ve ortamın ise 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA ve 20 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA kombinasyonlarını içeren B5 ortamları olduğu belirlenmiştir. 1. ve 2. alt kültürlerde en fazla sürgün oluşumu 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonunu içeren ortamda gerçekleşmiş ve sırasıyla eksplant basına ortalama 4 ve 2.11 adet sürgün oluşmuştur. 2 alt kültür sonunda çogaltım katsayısı 33.76 olarak belirlenmiştir. En yüksek kök oluşumu 4.5 mg/l IBA içeren B5 ortamında, elde edilmiştir. Köklenen sürgünler dis kosulara başarıyla aktarılmış ve canlılık oranı % 90 olarak belirlenmiştir.

O. minutiflorum tohumları MS besin ortamında kültüre alındığında % 100 oranında çimlenmiştir. MS besin ortamında çimlendirilen ve büyütülen 30-40 günlük fidelerden alınan tek bogum eksplantları kullanılan tüm hormon kombinasyonlarında sürgün oluşumu bakımından başarılı eksplant olduğu, en başarılı hormon kombinasyonu ve ortamın ise 2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonlarını içeren MS ortamları olduğu belirlenmiştir. 1., 2. ve 3. alt kültürlerde en fazla sürgün oluşumu 20 mg/l BAP içeren ortamda gerçekleşmiş ve sırasıyla eksplant basına ortalama 3.04, 3.73 ve 1.42 adet sürgün oluşmuştur. 3 alt kültür sonunda çogaltım katsayısı 42.99 olarak tespit edilmiştir. En yüksek kök oluşumu 3.0 mg/l IBA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Köklenen sürgünler dis kosullara başarıyla aktarılmış ve canlılık oranı % 58 olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Doku kültürü, *in vitro*, mikroçogaltım, rejenerasyon, *Origanum*, *Sideritis*

Danisman: Prof. Dr. Rukiye TIPIRDAMAZ, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı.

INVESTIGATION ON PROPAGATION OF OREGANO (*Origanum minutiflorum*) AND IRONWORT (*Sideritis stricta*) THROUGH TISSUE CULTURE

Dudu ÖZKUM

ABSTRACT

In this study the micropropagation *Sideritis stricta* Boiss. & Heldr. and *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis were investigated. Leaf segments and shoot explants (hypocotyl, single node and shoot tip) taken from *in vitro* growing plantlets and cultured on Murashige and Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) and Gamborg (B5) (Gamborg et al., 1968) media containing different combinations of 6-benzyl amino purine (BAP) (0.0, 1.0, 2.0 or 3.0 mg/l) and naphthalene acetic acid (NAA) (0.0, 0.1 or 0.5 mg/l). MS and B5 media supplemented with BAP (1.0, 2.0 or 3.0 mg/l) and NAA (0.1 mg/l) combinations or only BAP and kinetin (2.0 or 3.0 mg/l) were used during subcultures of shoot and Murashige and Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) and Gamborg (B5) (Gamborg et al., 1968) media supplemented with different concentrations of indole-3-butyric acid (IBA) (0.0, 1.5, 3.0, 4.5 or 10.mg/l) were used for rooting experiments. The optimal conditions for the propagation of both species under tissue culture conditions were determined.

A % 100 seed germination was achieved in *S. stricta* when the seed coat was removed and the remaining endosperm and embryo cultured on B5 medium. The single node explants taken from 30-40 days plantlets germinated and grown *in vitro* on B5 medium were the most successful type of explant in all hormone combinations used. B5 medium supplemented with 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA and 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA was determined as the most effective medium for shoot formation. At the first and second subculture, the highest shoot formation was achieved on medium supplemented with 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, the mean number of shoots per explant being 4 and 2.11, respectively. The highest multiplication rate was 33.76 at the end of second subculture. The best rooting was achieved on B5 medium supplemented with 4.5 mg/l IBA. The rooted shoots were successfully acclimized to out door conditions with a survival rate of 90 %.

A % 100 seed germination was achieved in *O. minutiflorum* when the seeds were cultured on MS medium. The single node explants taken from 30-40 days plantlets germinated and grown *in vitro* on MS medium were the most successful explant in all hormone combinations used. MS medium supplemented with 2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA and 3.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA was the most effective medium for shoot formation. At the first, second and third subculture, the highest shoot formation was achieved on medium supplemented with 2.0 mg/l BAP, the mean number of shoots per explant being 3.04, 3.73 and 1.42, respectively. The highest multiplication rate was 42.99 at the end of the third subculture. The best rooting was achieved on MS medium supplemented with 3.0 mg/l IBA. The rooted shoots were successfully acclimized to out door conditions with a survival rate 58 %.

Key Words: Tissue culture, *in vitro*, micropropagation, regeneration, *Origanum*, *Sideritis*.

Advisor: Prof. Rukiye TIPIRDAMAZ, Hacettepe University, Department of Biology, Botany Section.

TESEKKÜR

Bu çalışma konusunun ve deneysel yöntemlerinin belirlenmesinde ayrıca sonuçlarının değerlendirilmesinde her türlü yardımını, yönlendirici desteğini yakın ilgisini ve çok değerli katkılarını gördüğüm tez danismanım Prof. Dr. Rukiye TIPIRDAMAZ'a tesekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince değerli katkılarda bulunan Tez İzleme Komitesi Üyeleri Prof. Dr. Sebnem ELLIALTIUGLU'na (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü) ve Prof. Dr. Ekrem GÜREL'e (Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü), fikirleriyle ve manevi olarak bana destek olan basta Prof. Dr. Serpil TERZIOGLU, Doç. Dr. Hüsnü ÇAKIRLAR ve Doç. Dr. Yasemin EKMEKÇI olmak üzere tüm değerli bölüm hocalarıma, deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde yardımlarını gördüğüm Dr. Serpil AKTAS'a (Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstatistik Bölümü), tohumların temininde yardımcı olan Prof. Dr. Hayri DUMAN'a (Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü), Dr. Orhan ÜNAL'a, Ars. Gör. Hüseyin ÇETİN'e ve Ars. Gör. Aysegül AYHAN'a (Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü), türlerin sistematik bilgilerinin kontrolünü yapan Uzm. Hasim ALTINÖZLÜ ve Burcu ELÇI'ye tesekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını aldığım Ars. Gör. Dr. Nuran Çiçek'e, Ars. Gör. Banu Efeoglu'na ve Ars. Gör. Gökçen BAYSAL'a (Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü), yüksek lisans öğrencisi Nazli ÖZBEK'e ve özel çalışma öğrencileri Ayse CAMALAN'a, Zeynep SENCAN'a, Ümit BASARAN'a ve Mustafa Eren SAHİNER'e, desteklerini esirgemeyen tüm dostlarıma ve Erkan GÜNAYDIN'a tesekkür ederim.

Her zaman maddi ve manevi olarak yanımda olup sevgi ve destekleriyle bana güç veren aileme sonsuz tesekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmamı proje (Proje No: 0401601004) olarak destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Yetkililerine çok tesekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TESEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	6
2.1. <i>S. stricta</i> 'nin Genel Özellikleri.....	6
2.2. <i>Sideritis</i> L. Cinsinin Kullanım Alanları.....	7
2.3. <i>O. minutiflorum</i> 'un Genel Özellikleri.....	9
2.4. <i>Origanum</i> L. Cinsinin Kullanım Alanları.....	10
2.5. Mikroçogaltım.....	11
2.6. Bazı Tıbbi, Aromatik ve Endemik Bitkiler ile Lamiaceae Familyasına Ait Değişik Türlerde Mikroçogaltım Çalışmaları.....	16
3. MATERYAL VE METOTLAR	27
3.1. Bitki Materyali.....	27
3.2. Metotlar.....	28
3.2.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu.....	28
3.2.2. Tohumların Çimlendirilmesi.....	28
3.2.3. <i>In vitro</i> Kosullarda Yetistirilen Fidelerden Eksplant İzolasyonu ve Mikroçogaltımı.....	31
3.2.4. Alt Kültür Asaması.....	33
3.2.5. Sürgünlerin Köklendirilmesi ve Bitkilerin Dis Kosullara Alistirilmesi.....	34
3.2.6. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler.....	34
4. BULGULAR	37
4.1. <i>S. stricta</i> ile İlgili Denemelerin Sonuçları.....	37
4.1.1. Tohum Çimlendirme Asaması.....	37
4.1.2. Mikroçogaltım Asaması.....	39
4.1.3. Alt Kültür Asaması.....	44

4.1.4. Sürgünlerin Köklendirilmesi ve Bitkilerin Dis Kosullara Alistirilmesi.....	48
4.2. <i>O. minutiflorum</i> ile ilgili Denemelerin Sonuçları.....	53
4.2.1. Tohum Çimlendirme Asaması.....	53
4.2.2. Mikroçogaltım Asaması.....	53
4.2.3. Alt Kültür Asaması.....	58
4.2.4. Sürgünlerin Köklendirilmesi ve Bitkilerin Dis Kosullara Alistirilmesi.....	61
5. SONUÇLAR VE TARTISMA.....	65
KAYNAKLAR.....	79
EKLER.....	90
EK-1.....	91
Çizelge 1. <i>S. stricta</i> 'nin degisik eksplantlarında ve farkli BAP ve NAA kombinasyonlarındaki B5 ortamlarında sürgün oluşumu oranlarına ait varyans analiz sonuçları.....	91
Çizelge 2. <i>S. stricta</i> 'da 1. ve 2. alt kültürlerde farkli BAP ve NAA kombinasyonlarının sürgün oluşum oranlarına ait varyans analiz sonuçları.....	91
Çizelge 3. Mikroçogaltım ve alt kültür asamalarından elde edilen <i>S. stricta</i> sürgünlerinin farkli IBA konsantrasyonlarındaki kök oluşum oranlarına ait varyans analiz sonuçları.....	92
Çizelge 4. <i>O. minutiflorum</i> 'un degisik eksplantlarında ve farkli BAP ve NAA kombinasyonlarındaki MS ortamlarında sürgün oluşum oranlarına ait varyans analiz sonuçları.....	92
Çizelge 5. <i>O. minutiflorum</i> 'da 1., 2. ve 3. alt kültürlerde farkli BAP ve NAA kombinasyonlarının, farkli BAP ve kinetin dozlarının sürgün oluşum oranlarına ait varyans analiz sonuçları.....	93
Çizelge 6. Mikroçogaltım ve alt kültür asamalarından elde edilen <i>O. minutiflorum</i> sürgünlerinin farkli IBA konsantrasyonlarındaki kök oluşum oranlarına ait varyans analiz sonuçları.....	94
ÖZGEÇMİS.....	95

SEKILLER DIZINI

Sayfa

Sekil 3.1.	<i>S. stricta</i> 'nin dogal yayilis alanindaki görünüsü.....	27
Sekil 3.2.	<i>O. minutiflorum</i> 'un dogal yayilis alanindaki görünüsü.....	28
Sekil 3.3.	<i>S. stricta</i> tohumlarinin (a) ve <i>O. minutiflorum</i> tohumlarinin (b) çimlendirme ortamlarindaki görünüsleri.....	30
Sekil 3.4.	Steril laminar akisli kabinde çalisma anindan bir görünüm.....	32
Sekil 3.5.	B5 ortaminda yetistirilen 30-40 günlük <i>S. stricta</i> fidesi (a) ve MS ortaminda yetistirilen 30-40 günlük <i>O. minutiflorum</i> fidesi (b).....	32
Sekil 3.6.	Denemelerde kullanılan eksplant tipleri; hipokotil (a), tek bogum (b) sürgün ucu (c) ve yaprak parçalari (d).....	33
Sekil 3.7.	Çalisanin yürütüldüğü iklim odasindan ve denemelerin degisik asamalarindan bir görünüm.....	35
Sekil 4.1.	Mikroçogaltim amaciyla <i>S. stricta</i> fidelerinden alınan eksplantlar; hipokotil (a), tek bogum (b), sürgün ucu (c ₁₋₂) ve yaprak parçalari (d ₁₋₂).....	40
Sekil 4.2.	1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA içeren B5 ortaminda <i>S. stricta</i> sürgün ucu eksplantlarinin kültürden 4-6 hafta sonraki görünümü.....	43
Sekil 4.3.	2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren B5 ortaminda kahverengilesmis <i>S. stricta</i> yaprak parçalari (a) ve hipokotillerde olusan kalluslar (b).....	43
Sekil 4.4.	<i>S. stricta</i> tek bogum eksplantalarindan 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA içeren B5 ortaminda kültürden 4-6 hafta sonra olusan sürgünler.....	44
Sekil 4.5.	3. alt kültürde, 3.0 mg/l BAP içeren B5 ortaminda <i>S. stricta</i> 'nin vitrifiye olmus (a,b) veya rozet seklinde gelismis sürgünleri (c,d).....	47
Sekil 4.6.	1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonunu içeren B5 ortaminda 1. alt kültüre alınan <i>S. stricta</i> sürgüleri (a) ve 4 hafta sonra elde edilen yeni sürgünler (b,c).....	48
Sekil 4.7.	4.5 mg/l IBA içeren B5 ortaminda köklenmis <i>S. stricta</i> fideleri.....	50
Sekil 4.8.	<i>S. stricta</i> fidelerinin <i>ex vitro</i> kosullara alistirilma asamalari (a-f)....	51
Sekil 4.9.	Iklim odasindaki 4 aylık (a,b) ve 10 aylık (c,d) <i>S. stricta</i> bitkileri....	52
Sekil 4.10.	<i>O. minutiflorum</i> 'un embriyosuz (a) ve embriyolu (b) tohumlari (x 63).....	53
Sekil 4.11.	Mikroçogaltim amaciyla <i>O. minutiflorum</i> fidelerinden alınan eksplantlar; hipokotil (a), tek bogum (b), sürgün ucu (c) ve yaprak parçalari (d).....	54

Sekil 4.12.	1 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamında <i>O. minutiflorum</i> sürgün ucu eksplantlarının kültürden 4-6 hafta sonraki görünümü.....	57
Sekil 4.13.	2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamında <i>O. minutiflorum</i> 'un kahverengilemiş yaprak parçaları (a) ve hipokotillerde oluşan kalluslar (b).....	57
Sekil 4.14.	<i>O. minutiflorum</i> fidelerinden alınan tek bogum eksplantlarında, 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonu içeren MS ortamlarında kültür başlangıcından 4 hafta sonra oluşan sürgünler.....	57
Sekil 4.15.	2.0 mg/l BAP içeren MS ortamında 1. alt kültüre alınan <i>O. minutiflorum</i> sürgünleri (a) ve 4 hafta sonra elde edilen yeni sürgünler (b,c).....	61
Sekil 4.16.	3.0 mg/l IBA içeren MS ortamında köklenmiş <i>O. minutiflorum</i> fideleri.....	63
Sekil 4.17.	<i>O. minutiflorum</i> fidelerinin <i>ex vitro</i> koşullara alıştırılma aşamaları (a-f).....	64

ÇİZELGELER DIZINI

Sayfa

Çizelge 3.1. MS ve B5 temel besin ortamlarında bulunan besin maddeleri ve oranları (Murashige and Skoog, 1962; Gamborg et al., 1968).....	29
Çizelge 3.2. Mikroçogaltım amacıyla kullanılan MS ve B5 ortamlarının BAP ve kombinasyonları.....	31
Çizelge 3.3. <i>S. stricta</i> ve <i>O. minutiflorum</i> için alt kültür denemelerinde kullanılan ortam ve hormon kombinasyonları.....	34
Çizelge 4.1. <i>S. stricta</i> 'nin değişik eksplantlarında ve farklı BAP ve NAA kombinasyonlarındaki B5 ortamlarında sürgün oluşum oranları.....	41
Çizelge 4.2. <i>S. stricta</i> 'da alt kültür denemelerinde farklı hormon konsantrasyonlarında sürgün oluşum oranları.....	45
Çizelge 4.3. Mikroçogaltım ve alt kültür aşamalarından elde edilen <i>S. stricta</i> sürgünlerinin farklı IBA konsantrasyonlarını içeren B5 ortamlarındaki kök oluşum oranları.....	49
Çizelge 4.4. <i>O. minutiflorum</i> 'un değişik eksplantlarında ve farklı BAP ve NAA kombinasyonlarındaki MS ortamlarında sürgün oluşum oranları..	55
Çizelge 4.5. <i>O. minutiflorum</i> 'da alt kültür denemelerinde farklı hormon konsantrasyonlarında sürgün oluşum oranları.....	59
Çizelge 4.6. Mikroçogaltım ve alt kültür aşamalarından elde edilen <i>O. minutiflorum</i> sürgünlerinin farklı IBA konsantrasyonlarını içeren MS ortamlarındaki kök oluşum oranları.....	62

SIMGELER VE KISALTMALAR DIZINI

BAP	6-Benzil amino pürin
BA	6-Benziladenin
B5	Gamborg besin ortamı
B9	2,2-dimetil hidrazid
cm	Santimetre
°C	Santigrat derece
dm	Desimetre
g	Gram
GA ₃	Gibberilik asit
HCl	Hidroklorik asit
IAA	Indol-3-asetik asit
IBA	Indol-3-butirik asit
km	Kilometre
KNO ₃	Potasyum nitrat
l	Litre
m	Metre
M	Molarite
mg	Miligram
mM	Milimolar
MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
mMS	Değiştirilmiş Murashige ve Skoog besin ortamı
NaOCl	Sodyum hipklorit
PEG	Polietilen glikol
sn	Saniye
TDZ	Thidiazuron
µmol	Mikromol
µM	Mikromolar
2,4-D	2,4-diklorofenoksi asetik asit
%	Yüzde

1. GİRİŞ

Lamiaceae ya da diğerk adıyla Labiatae (Ballıbabagiler) familyasına ait bitkiler hemen hemen bütün habitatlarda ve yüksekliklerde yetişmekte, Kutuplar'dan Himalaya'lara, Güney Doğu Asya'dan, Hawai ve Avusturalya'ya, hatta Afrika ve Amerika'ya kadar geniş bir alanda yayılış göstermektedir (Heywood, 1996).

Lamiaceae familyası dünyada yaklaşık 224 cins ve 5600 tür ile temsil edilmekte olup, en yoğun bulunduğu bölge Akdeniz havzasıdır (Hickey and King, 1997). Türkiye, Lamiaceae familyası için önemli gen merkezlerinden birini oluşturmaktadır. Ülkemizde bu familya 45 cins, 565 tür ve toplam 735 takson ile temsil edilmektedir (Güner et al., 2000). Familyaya ait bitkilerin çoğu tıbbi ve aromatik özellikte olup, insanlarda çeşitli fizyolojik etkilere sahip olmaları nedeniyle eski çağlardan beri gerek halk ilacı olarak; gerekse ilaç, gıda, parfümeri ve kozmetik endüstrisinde kullanılan bitkilerdendir. Lamiaceae familyasındaki bilinen bitki türlerinden bazıları; kekik (*Thymus vulgaris*), yayla kekiği (*Origanum minutiflorum*), ada çayı (*Salvia officinalis*), nane (*Mentha longifolia*) ve dağ çayı (*Sideritis stricta*)'dır (Baytop, 1983; 1987).

Bitkilerin tedavi amacıyla kullanılması insanlık tarihi kadar eskidir. Çağımızda bilimsel araştırma süzgecinden geçirilen tıbbi bitkilerin insanoğluna bilinenden çok daha faydalı ve hastalıkların tedavisinde çok önemli oldukları anlaşılmaktadır. Günümüzde bitkilerle tedavi "fitoterapi" adıyla bilinen bilim dalı haline gelmiştir. Tedavide doğaya dönüş akımı olarak bilinen Yeşil dalga ya da Yeşil ilaç tüm Avrupa ve Amerika'yı etkisi altına almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan bir çalışma, dünyada yaklaşık 21.000 bitki türünün ilaç sanayiinde kullanıldığını ortaya koymuştur. Bu tıbbi bitkilerden birisi de *Origanum* (Mercanköşk=Sweet marjoram, Oregano)'dur (Özhatay vd., 1997).

Sadece bir ülkenin coğrafi sınırları içinde yetişip başka bir yerde yetişmeyen bitkilere endemik bitkiler denir. Ülkemizde bulunan 10671 tür ve alt türün 3488'i endemik olup endemizm oranı Türkiye için yüksektir (Güner et al., 2000).

Lamiaceae familyasında bulunan bitkilerin çoğu da endemiktir. Ülkemizde ticareti yapılan ve yaygın olarak kullanılan tıbbi ve aromatik bitkilerden olan *Sideritis* ve *Origanum* cinsleri familyada yer alan önemli cinslerdendir.

Türkiyede yetişen *Sideritis* cinsine ait 54 tür ve tür altı taksondan 40 taksonu endemik olup endemizm oranı % 74'dür (Davis et al., 1988). *Origanum* cinsinin 25 taksonundan 16 tanesi endemiktir. Bu cins için endemizm oranı % 64'dür (Davis et al., 1982; Duman et al., 1995; Kitiki, 1996; Duman; 2000). Her iki cinsin endemizm oranlarının yüksek oluşu gen merkezlerinin Anadolu ve çevresi olduğunun bir göstergesidir (Davis et al.,1982).

Sideritis türleri, bitkisel çay ve halk ilacı olarak kullanılan bitkiler arasında önem taşımaktadır. En çok bilinen özellikleri ateş düşürücü ve ülserle karşı (Villar et al., 1984; Palomino et al., 1996), antioksidatif (Triantaphyllou et al., 2001; Koleva et al., 2002) ve antimikrobiyal (Rodriguez-Linde et al., 1994; Aligiannis et al., 2001) olduğudur. Ülkemizde de *Sideritis* cinsine ait türlerin idrar söktürücü olarak, mide rahatsızlıklarını gidermede, böbrek taşlarını düşürmede, soğuk algınlıklarında ve şeker hastalığının tedavisinde kullanıldığı belirtilmektedir (Kaya, 1990). Ayrıca, bazı *Sideritis* türlerinin ateş düşürücü olduğu, karın ağrısı giderici ve baş ağrısına iyi geldiği de ifade edilmektedir (Arslan, 1999). Eski çağlardan beri *S. stricta*'dan hazırlanan çay, içerdiği uçucu yağ, acı madde ve tanen nedeniyle uyarıcı, iştah açıcı, gaz söktürücü, hazmettirici ve mide ağrılarını giderici fizyolojik etkileri nedeniyle halk ilacı olarak kullanılmaktadır. (Özhatay vd., 1997).

Origanum'lar ağrı kesici (analjezik), cinsel gücü azaltıcı (anafrodizyak), antioksidan, antiseptik, antispazmatik, antiviral, antibakteriyal, gaz giderici, kalbi uyarıcı, terletici, sindirimi kolaylaştırıcı, idrar arttırıcı, adet söktürücü, fungisidal, balgam söktürücü, müshil, sakinleştirici, tonik, mide rahatsızlıklarını ve yaraları iyileştirici etkilere sahiptir (Bernáth, 1996; Kitiki, 1996; Sarı vd., 2002). *Origanum* günlük hayatımızda da önemli bir rol oynamaktadır. Özel tadından dolayı birçok yiyeceklerde yeri doldurulamaz bir baharattır. Tüm dünyada baharat olarak kullanılması yanında bu bitkiden elde edilen uçucu yağlar antimikrobiyal, sitotoksik ve antioksidant olarak kullanılmaktadır. Bundan dolayı bu bitkiler ekonomik öneme

de sahiptirler. Bunun dışında *Origanum*'lardan elde edilen kekik suyu da astım ve kronik bronşit gibi hastalıklarda, zayıflamada, yüksek tansiyonda, şeker hastalığında, parazit dökmede ve kan dolaşımını uyarmada kullanılmaktadır.

2005 yılında Türkiye'nin dünya adaçayı üretimini yüzde 30'unu karşıladığı bildirilmektedir (www.kobifinans.com.tr/article/articleview). Kültürü yapılan *Sideritis* cinsleri 3-5 ton civarında, doğadan toplananlar ise 1 ton civarında olmak üzere yıllık toplam 6 ton civarında *Sideritis* hem iç piyasada kullanılmakta hem de ihraç edilmektedir (H. Duman, 2006, sözlü görüşme). *Origanum* cinsi de kekik ihracatının en az % 90'ını oluşturması ile ayrı bir öneme sahiptir. Türkiye 2005 yılında 10400 ton civarında ihracat miktarı ve bundan elde ettiği 18 milyon Amerikan dolar gelir ile dünyada en fazla kekik ihraç eden ülkedir (Sarı vd., 2002; http://www.bahce.biz/organik/tibbi_organik.htm; K.H.C. Başer, 2006, sözlü görüşme).

Fizyolojik etkileri ve ekonomik nedenlerden dolayı bu bitki grupları önemini ve güncelliğini korumaktadır.

Günümüzde Lamiaceae familyasına ait bitkilerden birçoğunun çeşitli ülkelerde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Ülkemizde de bu familya içerisinde yer alan bitkilerin bir bölümü doğal olarak yetişmekte, bazılarının da kültürü yapılmaktadır. Örneğin; *Origanum* türleri doğal olarak doğadan toplandı gibi bazılarının çelikle ve tohumla üretimi de yapılmaktadır (Kokkini, 1996). Ayrıca *S. lycia* ve *S. stricta* türlerinin de Antalya yöresinde kültürü yapılmaktadır (Göktürk and Sümbül, 2002; H. Duman, 2006, sözlü görüşme). Ancak, ticari açıdan önemli olan bu türler, çoğunlukla doğadan toplanarak pazarlanmaktadır. Bunun yanı sıra bu türler, yayılış gösterdikleri alanlarda çoğunlukla yağ elde etmek, çay yapımında ve baharat olarak kullanılmak üzere yöre insanı tarafından da bol miktarda toplanmaktadır. Bununla beraber türlerin yayılış alanlarına giren küçük baş hayvanların, buralarda otlamaları sonucu türler zarar görmektedirler (Ünal, 2003). Bu faaliyetler sonucunda florada yoğun bir tahribat söz konusu olmakta ve bazı endemik türler yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmaktadırlar. *Origanum* cinsine ait *O. minutiflorum* ve *Sideritis* cinsine ait *S. stricta* türleri de bu tehlike ile karşı karşıya olan endemik türlerdendir (Başer, 2001). Alınan tüm önlemlere

rağmen, her yıl tekrarlanan sökümler nedeniyle doğada gün geçtikçe azalan *O. minutiflorum* türü “Kırmızı Bülten” de Az Tehdit Altında, Tehdit Altına Girebilir (LR (nt) (Lower Risk, Near Threatened)) kapsamına ve *S. stricta* türü de Az Tehdit Altında, Koruma Önlemi Gerektiren (LR (cd) (Lower Risk, Conservation Dependent)) kapsamına alınmıştır (Ekim vd., 2000; IUCN, 2001).

Bu bitkilerin tıbbi ve aromatik niteliği nedeni ile doğada var olan stoklarının sökülerek ihraç ediliyor olmaları bu gen kaynaklarımızın gündün güne azalmasına neden olmakta, bu da var olanı sökmek yerine bitkiyi üretmeye yönelik hızlı ve kontrollü çoğaltım yöntemlerinin geliştirilerek kullanılmasını zorunlu hale getirmektedir. Ticari amaçlarla doğadan toplanan bitkilerin korunması amacıyla uygulanabilecek en ideal alternatif yöntemin “üretim” olduğu tüm dünyada kabul edilmektedir. Doku kültürü teknikleri kullanılarak bitki üretilmesi (mikroçoğaltım), bir çok bitki türünde olduğu gibi tıbbi ve aromatik bitkilerin de vejetatif olarak hızlı ve çok miktarda çoğaltılabilmesine olanak sağlayan bir üretim şeklidir. Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen tanesi) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanır. Eğer bitkilerin uygun besin maddesi ihtiyaçları, hormon ve kültür istekleri yeterince biliniyorsa, mikroçoğaltım tekniği kullanılarak tüm bitki türlerinin üretilmesi mümkündür (Hartman and Kester, 1975; Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Bu amaçla değişik bitki eksplantları (hipokotil, kotiledon, sürgün ucu, meristem, tek boğum), besin ortamları, hormon kombinasyonları, agar ve şeker düzeyleri ve yetiştirme koşulları kullanılarak Lamiaceae familyasına ait bazı tıbbi ve aromatik özellikteki bitkilerin *in vitro* koşullarda üretimi için doku kültürü sistemlerini geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmıştır (Ćellárová, 1992; Kumari and Saradhi, 1992; Garcia-Granados et al., 1994; Sajina et al., 1997; Ellialtıoğlu vd., 1998; Iyer and Pai, 1998; Iyer and Pai, 2000; Tepe vd., 2002; Arafah et al, 2003; Tisserat ve Vaughn, 2004). Bununla birlikte literatürde *O. minutiflorum* ve *S. stricta* türlerinin doku kültürü yoluyla çoğaltılmasına ilişkin yapılmış bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada ekonomik değerleri ve endemik özellikleri nedeni ile tehdit altında olan *S. stricta* ve *O. minutiflorum*'un *in vitro* koşullarda üretilmesi ve etkin bir üretime olanak sağlayacak optimal koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, değişik hormon kombinasyonlarını (0.0, 1.0, 2.0 ve 3.0 mg/l BAP, 0.0, 0.1 ve 0.5 mg /l NAA) içeren MS ve B5 ortamlarında, *in vitro* koşullarda çimlendirilerek büyütülen fidelerden alınan farklı eksplant tipleri (hipokotil, tek boğum, sürgün ucu ve yaprak parçaları) kültüre alınmıştır. Elde edilen sürgünlerin alt kültür denemelerinde BAP (0.0, 1.0, 2.0 ve 3.0 mg/l) ve NAA (0.1 mg/l) kombinasyonlarını ve ayrı ayrı kinetin (2.0 ve 3.0 mg/l) ve BAP (2.0 ve 3.0 mg/l) içeren B5 ve MS ortamları kullanılmıştır. Eksplant tipi, hormon kombinasyonu ve farklı besin ortamlarının sürgün oluşumu üzerindeki etkileri, 0.0, 1.5, 3.0, 4.5 ve 10 mg/l IBA içeren köklenme ortamlarının sürgünlerin kök oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, sırasıyla bitkisel materyal olarak kullanılan *S. stricta* ve *O. minutiflorum*'ün genel özellikleri belirtilmiş, bu türlerin de içinde yer aldığı *Sideritis* L. ve *Origanum* L. cinslerinin kullanım alanları ile ilgili bilgiler verilmiş daha sonra ise bazı tıbbi, aromatik ve endemik bitkiler ile Lamiaceae familyasına ait değişik türlerin *in vitro* koşullarda çoğaltılması ile ilgili çalışmalar özetlenmiştir.

2.1. *S. stricta*'nın Genel Özellikleri

Çok yıllık, 55-65 cm, gövde basit, yeşil veya sarımsı, tüy örtüsü aşağıda basık, salgısız, üstte salgılı ve yayık salgısız tüylüdür. Alt yapraklar basık beyaz-ipeksi, tüysüzümsü, gövdenin ortasındaki yapraklar yeşil, yumuşak seyrek tüylü, yoğun ağsı damarlı, şeritsi-mızraksıdan şeritsiye kadar değişen şekillerde, keskin sivri uçlu veya sivri uçlu, ince dişli, sapsız, 3-5 x 0,5-1 cm'dir. Dairesel olarak dizilen çiçekler 10-18 adet, alttakilerin arasındaki uzaklık 1-3 cm, orta ve üsttekiler sıkışıktır. Orta brakteler yuvarlak-yüreksiden böbrek biçimliye kadar değişen şekillerde, 1-1.5 x 1-2 cm, uç kısmı 2-3 mm, basık-tüylüden tüysüze kadar çeşitlilik gösterebilen, 2-3 mm boyunda salgısız sillidir. Kaliks 10-11 mm, şeritsi-mızraksı dişli, 3-4.5 mm, yayılan tüylü, tüp salgılı tüylüdür. Korolla sarı, 12-15 mm, tüylü ve içi kahverengi çizgilidir. Tohumlar fındıksı, yumurta biçimli, küçük 3 mm, düz ve kahverengi renklidir. $2n=32$ 'dir. Habitatı meşe makiliği, deniz seviyesinden 915 m'ye kadar yayılış gösterir. Endemik Doğu Akdeniz elemanıdır (Davis et al., 1982).

Bitki 4 farklı gelişim dönemi göstermektedir;

I. Dönem: Çiçeklenme Öncesi Dönem (Mayıs-Haziran)

II. Dönem: Çiçeklenme Dönemi (Temmuz-Ağustos)

III. Dönem: Tohum Dönemi (Eylül-Ekim)

IV. Dönem: Tohum sonrası Dönem (Kasım-Aralık)

Türün yayılış gösterdiği alanlar;

Tip örneği: C3 Antalya, İç Akseki ve Antalya.

Antalya: Gölbaşı 29v-21vi 1882, Luscan.

Güneybatı Anadolu. C2 Muğla. Taşocağından Fethiye'ye, Peşmen 517.

C3 Antalya: Termessus'dan Yenice Kahve'ye, 450-460 m. D.13940, Hub.-Mor. 8270.

S. stricta'nın yöresel isimleri; Antalya yöresinde Tokalı çayı, Antalya-Kemer yöresinde Tilkikuyruğu çayı, Antalya-Korkuteli yöresinde Dokuzdonlu veya Dağ çayıdır (Aydın, 1993; Baytop, 1997).

2.2. *Sideritis* L. Cinsinin Kullanım Alanları

Dünyada oldukça geniş bir yayılışa sahip olan *Sideritis* cinsine ait tür ve tür altı taksonlar, çok farklı ülkelerde tıbbi amaçla halk ilacı olarak kullanılmaktadırlar. *Sideritis* cinsindeki türler, antimikrobiyal, antioksidatif, anti-enflamatuar, anti-ülser gibi canlılar üzerindeki çeşitli farmokolojik etkilerinden dolayı, farklı ülkelerde drog olarak tüketilmektedirler (Villar et al., 1982; 1984; 1985; 1986; Diaz et al., 1988; Alcaraz et al., 1989; Gergis et al., 1990; Rios et al., 1992; Rodriguez-Linde et al., 1994; Palomino et al., 1996; Demo et al., 1998; Godo et al., 2000; Villena et al., 2000; Triantaphyllou et al, 2001; Aligiannis et al., 2001; Navarro et al., 2001; Koleva et al., 2002). *S. mugronensis* türünün toprak üstü kısımları deney hayvanlarında otonom sinir sistemini uyarıcı ve hipotansif etkilidir. Ayrıca düz kas preparasyonlarında spazmolitik etkisinin olduğu da ifade edilmektedir (Alcaraz et al., 1989). Rus florası kayıtlarına göre; Kırım'da yetişen *S. chlorostegia* ve *S. catillaris* türlerinin çay olarak kullanıldığı, *S. conferta* türünün ise değerli fiksatif reçine içeriğine sahip olduğu, ayrıca *S. montana*'nın zararlı yabancı ot şeklinde atları zehirlediği bildirilmektedir (Shishkin and Yuzepchuk, 1976). Aynı zamanda Rus florası'ndaki *Sideritis* cinsinin 16. yüzyıl boyunca çeşitli savaşlarda yaralanan insanların, yaralarının iyileştirilmesinde kullanıldığı öne sürülmektedir. Yunanistan iç pazarında *S. theezans*, *S. peloponnensiaca* ve *S. roeseri* türlerinin aromatik çay olarak satıldığına dair çok eski kayıtlar vardır (Uphof, 1968).

Ülkemizde *Sideritis* cinsine ait taksonlar özellikle bitkisel çay ve halk ilacı olarak kullanılmaktadırlar. *S. brevidens* İçel-Gülnar'da adaçayı olarak, *S. rubriflora* ise İçel-Anamur'da dağ çayı olarak bilinmekte, ve bulunduğu yörelerde çay olarak tüketilmektedirler (Kırimer et al., 1997). *S. lycia* türünün hoş bir aromaya sahip olması nedeniyle Antalya yöresinde kültürünün

yapıldığı belirtilmektedir (Göktürk and Sümbül, 2002). *S. congesta*'nın Mersin yöresinde, *S. libanotica*'nın Mersin ve Antalya yöresinde, *S. libanotica* subsp. *linearis*'in Mersin, Konya ve Afyon yöresinde, *S. pisidica*'nın Antalya yöresinde tonik yapımında kullanıldığı ve aynı zamanda çay olarak tüketildiği, *S. pisidica*'nın ise bunlara ilaveten Konya yöresinde lapa halinde karın ağrılarına karşı kullanıldığı belirlenmiştir (Kırimer et al., 1999).

Ülkemiz için endemik olduğu belirlenen *S. öztürkii* ise, adaçayı olarak bilinmekte ve yine çay olarak halkımız tarafından tüketilmektedir (Aytaç and Aksoy, 2000). *S. vulcanica* türü Elazığ ilinde ateş düşürücü ve karın ağrılarını giderici etkisi sebebiyle çay olarak içilmekte, yine aynı yörede başağrısı tedavisinde toz haline getirildikten sonra burundan çekilerek kullanılmaktadır (Arslan, 1999). *S. lycia* türü ile farelerde yapılan bir denemede, anti-enflamatuar aktivitesinden dolayı gastrik ülserle karşı iyi geldiği bildirilmiştir (Akcoş et al., 1999). Kaya (1990)'ya göre, *S. congesta*, *S. arguta*, *S. argyrea* ve *S. libanotica*'nın enfüzyon halinde halk arasında çay olarak içildiği belirtilmektedir. Bu türler aynı zamanda idrar söktürücü olarak, mide hastalıklarında, böbrek taşlarını düşürmede, bazen de soğuk algınlığında Güney Anadolu Bölgesi'nde kullanılmaktadır. *S. perfoliata* enfüzyon halinde soğuk algınlığı ve şeker hastalığına karşı, *S. dichotoma* ise enfüzyon halinde soğuk algınlığına karşı etkilidir. *S. bilgerana*, *S. hispida*, *S. tmolea* ve *S. stricta* iştah açıcı ve gaz söktürücü özelliğe sahiptirler (Baytop, 1984).

S. germanicopolitana'nın iki alt türü de, tıbbi öneminin yanı sıra park ve bahçelerde süs bitkisi olarak yetiştirilmeye uygun estetik ve dekoratif bir yapıya sahiptir. Bu yüzden park ve bahçe düzenlemelerinde yer örtücü olarak veya kaya bahçelerinde kullanılacak ideal bitkilerden olduğu, aynı zamanda yol kenarlarının ve kayalık alanların bitkiler açısından zenginleştirilmesinde ve erozyon kontrol çalışmalarında kullanılabileceği de açıkça ifade edilmektedir (Yücel, 1996).

Sideritis cinsine ait türlerin kimyasal bileşenleri ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğu uçucu yağ bileşenleri, flavonoidler ve diterpenlere yöneliktir (Diaz et al., 1988; Garcia-Granados et al., 1994). Bunlara

ilave olarak varlığı bildirilen diğer bileşikler steroller, fenilpropanoit heterozitleri, lignanlar, iridoid heterozitleri, kumarinler, alkanlar, triterpenik saponozitler ve serbest yağ asitleridir (Akcoş, 1994).

2.3. *O. minutiflorum*'un Genel Özellikleri

35 cm'e kadar boylanabilen çok yıllık yarıçalılardır. İnce tüylüdür. Her gövdede 4'er cm'lik 10 çift dal bulunur. Yapraklar saplı ya da sapsızimsı (yaprak sapı 6 mm kadardır). Yapraklar ovat veya eliptiktir ve yaklaşık 3-16 x 1-12 mm, \pm keskin sivri uçludur. İğneler yaklaşık 2-8 x 3 mm. Brakteler ovat ya da eliptik, 1-3 x 0.5-1.5 mm, nerdeyse küt uçlu. Kaliks yaklaşık 2 mm; üst dudak loblu veya boyunun yaklaşık 2/5'i kadar olabilen \pm genişçe üçgen dişli; alt dudak aşağı yukarı üst dudak kadar uzun, genişçe üçgen dişten oluşmaktadır. Korolla beyaz renkli, 2,5-4 mm. Tohumlar fındıksı, yumurta biçimli, küçük 1 mm, düz ve kahverengi renklidir. Kayalık kireçli yamaçlarda 1500-1800 m'de yayılış gösterir. Endemik, Doğu Akdeniz elemanıdır (Davis et al., 1982).

Bitki 4 farklı gelişim dönemi göstermektedir;

I. Dönem: Çiçeklenme Öncesi Dönem (Mayıs-Haziran)

II. Dönem: Çiçeklenme Dönemi (Temmuz-Ağustos)

III. Dönem: Tohum Dönemi (Eylül-Ekim)

IV. Dönem: Tohum sonrası Dönem (Kasım-Aralık)

Türün yayılış gösterdiği alanlar;

Tip Örneği: C3 Antalya; Kemer, Tahtalı Dağı, Çukur Yayla 1000 m. 15.viii.1947, P.H. Davis 14185.

Çalbalı Dağı, Kar Çukuru-Feslikan Yaylası arası 1800 m. P.H. Davis 15402.

Gebiz, Bozburun Dağı, Tozlu Çukur Yaylası-Boğaz Ağızı arasında P.H. Davis 15509.

O. minutiflorum'ün yöresel isimleri; Sütçüler-Isparta yöresinde Eşek kekiği, Antalya yöresinde Toga kekiği veya Yayla kekiğidir (Baytop, 1997).

2.4. *Origanum* L. Cinsinin Kullanım Alanları

Origanum cinsinin kullanımı binlerce yıl öncesine dayanır. İncil'de bahsedilen 'hyssop' (Çürdük, Zufa otu)'un *O. syriacum* L. olduğuna inanılır. Avrupa'daki uzun hikayesine rağmen *Origanum* cinsi bu yüzyılın başında Amerika'ya girmiştir (Bernáth, 1996). Ülkemizde *Origanum* türlerinin kullanımı çok eski zamanlarda başlamış olup bitkinin kullanımı paleolitik döneme kadar inmektedir (MÖ 50.000-7.000). İlk kayıtlara, MÖ 1.600-1.200 yıllarına ait Hitit tablolarındaki resimlerde rastlanmıştır. Baharat olarak kullanımı ise MÖ 7'nci yüzyıla kadar dayanmaktadır (Kitiki, 1996).

Geleneksel bir baharat ve halk ilacı olan *Origanum* bitkisini eski Yunanlılar güzel kokularında, kozmetik ve ilaçlarda kullanırlar ve "dağların sevinci" anlamına gelen "oregano" adıyla anarlardı. *Origanum* kelimesi Yunanca *oros*: dağ ve *ganos*: süs kelimelerinden türemiştir. Genelde "oregano" veya "origan terimleri botaniksel isimlerine göre daha yaygındır. Arnavut dilinde karşılığı rigoni olan oregano terimi Arnavutlarca sık kullanılmaktadır (Xhuveli ve Lipe, 1996). *Origanum* olmayan bir çok bitki uluslararası pazarlarda 'oregano' olarak bilinmektedir. Hatta bunlardan bazıları Lamiaceae familyasına ait bile değildir (Bejilali, 1996).

Origanum'lar ağrı kesici (analjezik), cinsel gücü azaltıcı (anafrodizyak), antioksidant, antiseptik, antispazmatik, antiviral, antibakteriyal, gaz giderici, kalbi uyarıcı, terletici, sindirimi kolaylaştırıcı, idrar arttırıcı, adet söktürücü, fungusidal, balgam söktürücü, müshil, sakinleştirici, midevi, tonik, yara iyileştirici etkilere sahiptir. *Origanum* günlük hayatımızda önemli bir rol oynamakta ve özel tadından dolayı birçok yiyeceklerde baharat olarak kullanılmaktadır. Ayrıca *Origanum*'lardan elde edilen kekik suyu da astım ve kronik bronşit gibi hastalıklarda, zayıflamada, yüksek tansiyonda, şeker hastalığında, parazit dökmede ve kan dolaşımını uyarmada kullanılmaktadır (Bernáth, 1996; Kitiki, 1996; Sarı vd., 2002). *Origanum* cinsine ait türlerin kimyasal bileşenleri ile ilgili olarak yapılan çalışmaların çoğu uçucu yağ bileşenleri, karvakol, timol, γ -terpinen gibi bileşiklere yöneliktir (Bernáth, 1996; Alves-Pereira and Fernandes-Ferreira, 1998; Socorro vd., 1998). Ayrıca güzel görünümünden dolayı *Origanum* türlerinin estetik amaçlı plantasyonlarda kullanılabilmeleri de söz konusudur (Kokkini, 1996).

2.5. Mikroçoğaltım

Doku kültürü teknikleri kullanılarak bitki üretmek, yani; mikroçoğaltım bir çok bitki türünde olduğu gibi tıbbi ve aromatik bitkilerin de vejetatif olarak hızlı ve çok miktarda çoğaltılabilmesine olanak sağlayan bir üretim şeklidir. Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen tanesi vb.) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanmaktadır (Mansuroğlu ve Gürel, 2001). Eğer bitkilerin uygun besin maddeleri ihtiyaçları, hormon ve kültür istekleri yeterince biliniyorsa, mikroçoğaltım tekniği kullanılarak tüm bitki türlerinin üretilmesi mümkündür (Hartman and Kester, 1975). Mikroçoğaltım bitki yetiştiriciliği ve genetiği yönünden önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu avantajlar; hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal elde edilmesi, kitlesel üretimde üretilen bitkilerde fenotipik ve genotipik benzerlik (homojenite) olması, alışlagelen yöntemlerden daha kısa kültür süresine ihtiyaç duyulması, zor üretilen türlerin daha kolay üretimi, seçilen belirli/üstün genotiplerin hızlı üretimi, üretimde daha az verici (donör) kullanılması gibi yararları ve somoklonal varyasyonlardan dolayı yeni çeşitlerin elde edilmesi şeklinde sıralanabilir. Ayrıca kısa sürede fazla bitkinin elde edilebilmesi de diğer bir avantajdır (Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

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

1) Hazırlık aşaması

Esas olarak bulaşma problemlerinin en aza indirilmesi amacıyla verici (donör) bitkinin hijyenik koşullarda yetiştirilmesini kapsamaktadır. Verici (donör) bitkinin vejetatif gelişme evresinde olması mikroçoğaltımda başarıyı etkileyen etkenlerden bir diğeridir. Kültür için sürgün gelişiminin hızlı olduğu ve aktif büyümenin bulunduğu dönemler seçilmelidir. Mikroçoğaltımın başarısı eksplantların alındığı verici (donör) bitkinin genotipi, sağlık durumu ve yetiştirme koşulları (beslenme, ışık,

sıcaklık, bitki büyüme düzenleyicilerinin uygulanması, yetiştirme mevsimi) ile doğrudan ilişkilidir.

2) Kültür başlangıç aşaması

Eksplant seçimi ve sterilizasyonu, kültür ortamlarının seçimi ve kültürün yürütüleceği çevresel koşulların belirlendiği aşamadır. Mikroçoğaltımda çoğunlukla eksplant olarak tepe (apikal) ve koltuk altı (aksiller) tomurcuklar seçilmekle birlikte, farklı organlar da eksplant olarak kullanılmaktadır. Örneğin 2-3 mm büyüklüğündeki kök parçaları (Huang and Chu, 1987), sürgün ucu (Mariska et al., 1991), yaprak, yaprak sapı ve çiçek sapı parçaları (Chu and Huang, 1983; Schwenkel and Grunewaldt, 1988), rizomların terminal ve lateral uçları (Pierik et al., 1988), yaprak ve gövde eksplantları (Nakano et al., 1999), soğan pulları ve yaprakları (Pelkonnen and Kauppi, 1999; Tıprıdamaz vd., 1999; Çakırlar vd., 2000; Tıprıdamaz, 2003) başarıyla kullanılmıştır.

Werbrouck ve Debergh (1994) eksplant seçiminde uyulması gereken bazı özelliklere dikkat çekmektedirler; bitkilerin toprak üstü kısımları toprak altı kısımlarından, bitki iç parçaları bitki dış parçalarından daha az kontamine edilmiştir. Eksplantın rejenerasyon yeteneği büyüklüğüne ve fizyolojik yaşına bağlıdır. Eksplantlar gelişme mevsiminin başlangıcında aktif büyüyen sürgünlerden alındığında başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Verici (donör) bitkinin yatıştırma ortamındaki ışık ve sıcaklık koşulları, beslenme durumu ve yaşı eksplantın büyüme ve gelişme başarısını etkilemektedir.

Araştırmacılar, sürgün büyüklüğünün de önemli olduğunu ve sürgün ucundan alınan eksplantın virüssüz olacak kadar büyük, rejenerasyon yeteneğini yitirmeyecek kadar küçük olması gerektiğini vurgulamaktadırlar. Terminal tomurcuk içeren çelikler ve bütün tomurcuk, 0.5-1 mm'lik sürgün uçlarına nazaran daha yüksek oranda kontamine olmaktadır. Küçük sürgün ucu eksplantlar düşük canlılık oranına ve başlangıçta yavaş gelişme özelliğine sahip olmakla birlikte, virüslerle kontrol edilen bazı karakterleri yok etmektedir (Bhojwani and Razdan, 1983).

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

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

Murashige ve Skoog (MS) ortamı (Murashige and Skoog, 1962) bir çok bitki için hem kültür başlangıcında hem de sürgün çoğaltımında kullanılmaktadır.

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

3) Sürgün çoğaltım aşaması

Genel olarak başlangıç için kullanılan ortamlar çoğaltım aşamasında da kullanılmakla birlikte, bazı durumlarda değişiklik yapılabilmektedir. Bitki dokularından organ farklılaşmasında oksin ve sitokininler önemli rol oynamaktadır. Sitokinin/oksin oranının yüksek olması sürgün oluşumunu, oksin/sitokinin oranının yüksek olması kök oluşumunu, oksin ve sitokinin aynı miktarda kullanılması ise kallus oluşumunu desteklemektedir. 6-benzil amino pürin (BAP) çok sık kullanılan ve genellikle olumlu sonuçlar veren bir sitokinidir. Genel olarak 1-2 mg/l sitokinin çoğu sistemde yeterlidir. Yüksek düzeyler, adventif sürgün oluşumunu artırma

eğilimindedir. Thidiazuron (TDZ) düşük konsantrasyonlarda (0.05-1.0 mg/l) etkili olduğu için umut veren bir sitokinidir. İndol-3-asetik asit (IAA) ortamda çok az stabil olduğundan, sentetik oksinlerden naftalen asetik asit (NAA) ve indol-3-butirik asit (IBA) tercih edilmektedir. Bunların sürgün çoğaltım aşamasında kullanılan oranları 0.1-1.0 mg/l'dir. Kallus oluşumunu artırma eğiliminde olan 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2.4-D)'in kullanımından ise kaçınılmaktadır (Werbrouck ve Debergh, 1994).

Bitkilerin çok hızlı çoğaltılması onların totipotensi (tek hücreden yeni bir birey oluşturma) özeline bağlıdır. Kültüre alınan hücrelerden bitkilerin farklılaşması sürgün-kök oluşumu ya da somatik embriyogenesis ile meydana gelir. Kallustan sürgün çoğaltılması yöntemi ile bitkilerin klonlanmasında bazı sakıncaları vardır: Bu sakıncaları hücrelerin stabil olmaması, poliploid ve aneuploid bitkiler meydana gelmesi ve bir çok tür için uygulanmaz oluşudur. Ayrıca dokunun başlangıçtaki bitki rejenerasyon kapasitesi zamanla alt kültürlerde azalmakta ve sonunda yok olmaktadır.

Yaprak koltuk altı (aksiller) ya da sürgün tepelerinin (apikal) dışında herhangi bir yerde oluşan tomurcuklar adventif tomurcuk olarak adlandırılır. Kalluslardan sürgün farklılaşması da adventif tomurcuk olarak ele alınmasına rağmen, bu tomurcuklar kallus evresine gerek kalmadan doğrudan bir organ ya da organ parçasından da oluşabilmektedir. Bitki türlerinin klonal üretiminde organlardan doğrudan adventif sürgün oluşumu kallus yönteminden daha iyi sonuçlar vermektedir. Doğrudan bir organ ya da organ parçasından oluşan adventif tomurcuklar (sürgünler) tek düze diploid bireyler oluşturmaktadır.

Aksiller tomurcuklar genellikle yaprak koltuklarında bulunur ve her tomurcuk bir sürgün geliştirme potansiyeline sahiptir. Mikroçoğaltımda, aksiler dallanmayla sürgün çoğalmasının artırılması uygun konsantrasyonda ve tipte sitokin içeren (oksinli ya da oksinsiz) besin ortamlarında yapılır. *In vitro* şartlarda oluşan sürgünler taze ortamlara aktarılarak aksiler dallanma ile sürgün çoğaltması sürdürülebilir.

Aksiler dallanma ile sürgün çoğaltımı, kallustan sürgün oluşumu veya doğrudan adventif sürgün oluşumuna göre başlangıçta daha yavaştır. Fakat her alt kültürde sürgün sayısı logaritmik olarak artarak bir yıl içinde astronomik rakamlara ulaşmaktadır. Bu yöntemin klonal çoğaltımda ticari olarak yaygınlaşmasının bir diğer nedeni ise sürgün ucu hücrelerinin tek düze diploid olması ve kültür koşulları altında genotipik değişikliklere çok az yatkın olmasıdır.

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

4) Köklendirme aşaması

Tam bir bitki oluşturmak için sürgünler, sürgün oluşturma ortamından farklı bir hormonal kompozisyona sahip olan yeni bir ortama aktarılmaktadır. Sürgünler belli bir uzunluğa eriştikten sonra köklenme ortamına alınır. Türlerin çoğunda köklenmenin desteklenmesi için NAA ya da IBA (0.1-1.0 mg/l)'e gereksinim duyulur. Makro ve mikro tuzların konsantrasyonu ve uygulama zamanı bu yöntemin başarısını belirler. Yüksek şeker konsantrasyonu (% 3-4) köklenmeyi ve bitkilerin kalitesini artırır. Adventif ve aksiller sürgün gelişimi ortamlarında sitokininin varlığı köklenmeyi engellemektedir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

5) Bitkilerin dış ortam koşullarına alıştırılması aşaması

Steril koşullarda, düşük ışık yoğunluğunda, yüksek nem içeren ve tüm besin maddelerinin bulunduğu bir ortamda geliştirilen bitkilerin, daha düşük nem, daha yüksek ışık düzeyi ve steril olmayan koşullara sahip dış ortama aktarılması çok

dikkat isteyen bir işlem olup, bunun aşamalı olarak yapılması gerekmektedir. *In vitro* koşullarda gelişen köklenmiş bitkicikler dikkatli bir şekilde dış koşullara aktarılmalı ve yüksek nem (% 90-100) sağlanmalıdır. Aşamalı olarak saksıların üzerine yerleştirilen cam kaplar açılarak hava sirkülasyonu sağlanmalı daha sonra seradaki özel alanlarına alınmalıdır (Preece and Sutter, 1993).

Mikroçoğaltım aşamalarının başarıyla tamamlanması bitkiye uygun eksplant tipi, sterilizasyon yöntemleri, besin ortamı bileşimi ve hormon kombinasyonları ile kültür koşullarının belirlenmesiyle mümkün olabilmektedir.

2.6. Bazı Tıbbi, Aromatik ve Endemik Bitkiler ile Lamiaceae Familyasına Ait Değişik Türlerde Mikroçoğaltım Çalışmaları

Kumari ve Saradhi (1992), *O. vulgare* L.'nin kallus kültüründen bitki rejenerasyonunu ve hızlı çoğaltımını araştırmışlardır. Çalışmada aseptik koşullarda kültüre alınan 15 günlük fidelerden alınan kotiledon, hipokotil ve kök segmentleri eksplant olarak kullanılmıştır. Bu eksplantlar ayrı ayrı 2,4-D, NAA ve BAP'ın farklı kombinasyonlarını (0, 10^{-7} , 10^{-6} ve 10^{-5} M) içeren B5 ortamlarında kültüre alınmışlardır. En yüksek kallus oluşumu 10^{-7} M 2,4-D içeren ortamda % 90 oranında elde edilmiştir. Kallus oluşumu için en uygun eksplant kaynağının kotiledon oluşu belirlenmiştir. Kotiledon eksplantları yalnızca BAP veya 10^{-7} M veya 10^{-6} M NAA + BAP kombinasyonlarında alt kültüre alındığında sürgün oluşumu meydana gelmiştir. Bununla birlikte 10^{-5} M NAA tamamıyla BAP'ın sürgün oluşturma etkisini baskılamıştır. Genelde NAA tüm eksplantlarda kök oluşumunu teşvik etmiştir. En yüksek sürgün oluşumu 10^{-6} M BAP + 10^{-6} M NAA içeren ortamda % 95 olarak gerçekleşmiştir. 10^{-6} M IBA veya NAA içeren 1/2 Gamborg (B5) (Gamborg et al., 1968) sıvı ortamının, kallustan çıkan sürgünlerin kök oluşumuna eşit şekilde etkili olduğu gösterilmiştir.

Nanenin (*Mentha* sp.) doku kültürü ile çoğaltılma olanaklarının araştırıldığı çalışmalarda (Ćellárová, 1992; Ellialtıoğlu vd., 1998) sürgün ucu ve tek boğumlar eksplant olarak kullanılmıştır. 30 g/l sukroz ve 0.4 g/l agar dozu ve 2 mg/l BAP içeren MS ortamının ve pH 5.6'nın etkin bir sürgün rejenerasyonu için uygun

olduğu belirlenmiştir. Eksplant başına ortalama 4-6 adet sürgün elde edilmiştir. En iyi köklenme ise hormonsuz MS ortamında gerçekleşmiştir. Optimal kültür koşulları 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta, 2500 lüks floresan ışığı olarak tespit edilmiştir.

Yürekli ve Baba (1995) bazı endemik bitkilerin (*Thymus sipyleus* Boiss., *Sideritis sipylea* Boiss.) doku kültürü yoluyla çoğaltılmasını çalışmışlardır. Eksplantların sterilizasyonu için iki farklı sodyum hipoklorit (NaOCl) dozu (% 4.5 ve %10) 5, 8, 9 ve 10 dakika sürelerle denenmiştir. Her iki tür için de eksplantların % 4.5 NaOCl dozunda 10 dakika süreyle tutulmasının sterilizasyon işlemi için uygun olduğu bulunmuştur. Kallus, sürgün oluşumu ve köklenme 0.4 mg/l NAA ve 3 mg/l 6-benziladenin (BA) içeren MS ortamında gerçekleşmiştir. Kalluslardan sürgün rejenerasyonu yukarıda belirtilen aynı ortam bileşiminde elde edilmiştir. Ayrıca sürgünler köklendirilmiş ve dış ortamlara aktarılmıştır.

Erzen-Vodenik ve Baricevic (1996) *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis*, *Hypericum perforatum*'un doku kültürü ile çoğaltılmasını çalışmışlardır. Bu doğrultuda sürgün ucu eksplant olarak kullanılmıştır. *Origanum* ve *Thymus*'un çoğaltımı pH'sı 5.7 olan 6 g/l agar ve 25 g/l sukroz içeren MS besin ortamında elde edilmiştir. *Salvia* için en uygun mikroçoğaltım ortamı ise 0.5 mg/l IAA ve 0.1 kinetin içeren MS ortamı olarak belirlenmiştir. 0.010 g/l 2,2-dimetil hidrazid (B9) sentetik büyüme düzenleyicisi içeren MS ortamı tüm türler için köklenme oranını arttırmıştır.

Arrebola ve Socorro (1997) adaçayının (*Satureja obovata* Lag.) mikroçoğaltımını araştırmışlardır. Çalışmada tohumlar 0.57 mM gibberillik asit (GA₃) ile muamele edilerek, embriyo dormansisi ortadan kaldırılmış ancak GA₃ uygulaması kontrole göre *in vitro* koşullarda çimlenme oranında önemli etki yapmamıştır. *In vitro* ve *in vivo* koşullarda yetiştirilen bitkilerden alınan tek boğum eksplantlarından optimum sürgün rejenerasyonu 2.22 mM BA içeren ortamda elde edilmiştir. Sürgünlerin köklendirilmesi, sürgünlerin 3 gün süreyle 4.92 mM IBA içeren katı veya sıvı MS besin ortamında kültüre alınıp, oksinsiz MS ortamına transfer edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Dış koşullara alıştırılan bitkilerin yaşama oranının % 95'ten daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Sajina vd., (1997) baharat olarak kullanılan bazı önemli türlerin (*Thymus vulgaris*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*) *in vitro* olarak çimlendirilmiş fidelerinden alınan sürgün ucu ve tek boğum eksplantlarını kullanarak bu türlerin mikroçoğaltımı için gerekli koşulları optimize etmişlerdir. Kallustan sürgün rejenerasyonu bazı türler için 4-12 ayda büyüme ortamında alt kültüre almadan sağlanmıştır.

Faria vd. (1998) *Sideritis angustifolia* yapraklarından elde edilen protoplastlardan rejenerasyonu teşvik eden faktörleri çalışmışlardır. 6.0 mM BA ve 2.0 mM NAA içeren değiştirilmiş sıvı MS ortamlarında protoplastlardan kallus elde edilmiştir. Daha sonra kalluslar katılaştırılmış rejenerasyon ortamlarına aktarılmış ve adventif sürgün farklılaşması 8.0 mM BA ve 2.0 mM NAA içeren MS ortamlarında geliştirilen kalluslarda gözlenmiştir. Bu sürgünler hormonsuz ortama aktarılarak çoğaltılmış ve köklendirilmiştir.

Origanum majorana L.'da *in vitro* koşullarda yürütülen çalışmada 2.0 mg/l BA içeren MS ortamında tek boğum eksplantlarından çok sayıda sürgünler elde edilmiştir (Iyer ve Pai, 1998). Sürgünler 0.2 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendirilmiş, bitkicikler güçlendirilip toprağa aktarılmış ve yaşama oranı yaklaşık % 50 olarak belirlenmiştir. *O. majorana*'da yapılan bir başka *in vitro* rejenerasyon çalışmasında (Iyer ve Pai, 2000), tek boğum eksplantlarından ve kallustan bitki rejenerasyonu sağlanmıştır. 2 mg/l BA ve karbon kaynağı olarak maltoz içeren MS ortamında kültüre alınan tek boğum eksplantları 40 kadar sürgün vermiştir. Sürgünler 0.2 mg/l IBA varlığında köklendirilmiştir. Tek boğum eksplantlarından kallus oluşumu 0.4 mg/l 2.4-D içeren ortamda teşvik edilmiştir. Bu kalluslar 3.0 mg/l BAP ve 0.2 mg/l IBA içeren MS ortamında organogenesis göstermiştir.

Socorro vd. (1998) İspanya'nın endemik türü olan *Origanum bastetanum*'un *in vivo* ve *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımı yapılmış bitkilerinin essansiyel yağlarını karşılaştırmalı olarak araştırmışlardır. Çalışmada *in vitro* koşullarda bitkilerin çoğaltımı için; *O. bastetanum*'un tohumlarını 5 hafta süreyle 24 ± 1 °C $40 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{sn}^{-1}$ 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullarda MS ortamında kültüre alarak çimlendirmişlerdir. Çimlenme oranını arttırmak amacıyla tohumlar farklı sürelerde 0.57 mM GA_3 ile muamele edilmiş ancak GA_3 muamelesi yapılmayan tohumlarda

% 95 oranla en iyi çimlenme elde edilmiştir. *In vitro* koşullarda elde edilmiş bitkilerden alınan tek boğum eksplantları 8 g/l agar ve 0.22 µM BA içeren çoğaltım ortamında kültüre alınmış ve 3 alt kültür aynı ortamda sürdürülmüştür. Köklendirme *in vivo* koşullarda da sağlanmıştır. Bitkiler çiçeklenme periyoduna kadar yetiştirilerek essensiyel yağ asitleri analiz edilmiştir.

Erdağ ve Yürekli (2000), *Thymus siphyleus* Boiss.'un mikroçoğaltımını araştırmışlardır. Sterilize edilmiş bitki tohumları değiştirilmiş MS (mMS) ve Heller ortamlarında çimlendirilmiştir. Daha sonra 0.4 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BA içeren MS besin ortamına aktarılan fideler ortamla temas ettikleri noktalardan kallus oluşturmuşlardır. Yine aynı ortamda rejenere olan bitkicikler, 2 hafta sonra çoklu sürgün halini almış ve 4. alt kültür sonunda aynı ortamda köklenmişlerdir.

Tisserat ve Silman (2000) Lamiaceae'de *in vitro* koşullarda yaptıkları çalışmada *Origanum vulgare* ve *Mentha piperita*'da sürgün büyümesi ve morfogenetik gelişme % 0.8 agar, 0.0 veya % 3.0 sukroz içeren MS ortamında 8 hafta 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyotta sağlanmıştır.

Minas (2001) *Origanum dictamnus*'un apikal meristemlerinden *in vitro* koşullarda çoğaltılmasını araştırmıştır. 0.5-1 mm boyutlarındaki meristem uçlarını % 3 sukroz, 4.5 mg/l BAP, 0.009 mg/l IBA, 55.7 mg/l askorbik asit ve 25 mg/l phytigel içeren MS ortamında kültüre almış ve bitkinin üretimini başarmıştır. Araştırmacı tüm *in vitro* çoğaltım aşamaları (eksplantların kültüre alınması, çoğaltım ve köklendirme aşamaları) için de aynı ortam bileşimini kullanmıştır.

Jhumur ve Handique (2002), Polygonaceae'ye ait tıbbi bir bitki olan *Polygonum microcephalum* O. Don.'un mikroçoğaltımını araştırmışlardır. Tek boğum eksplantları 3 mg/l BAP ve 0.1 mg/l IAA kombinasyonu içeren MS ortamında kültüre alındığında sürgün rejenerasyonu ve çoğaltımı sağlanmıştır. Mikrosürgünler 0.1-0.3 mg/l IAA veya IBA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Köklenmiş bitkicikler bir ay sonra dış koşullara alıştırılmış ve tarlaya aktarılmıştır.

Arı vd. (2002) Fabaceae'ye ait Türkiye için endemik bir tür olan *Astragalus chrysocholorus*'un çoğaltımı için doku kültürü koşullarının optimizasyonunu ve

sekonder metabolitlerini araştırmışlardır. Kallus oluşumu 0.5 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamında sürgün eksplantlarından elde edilmiştir. Köklendirme 0.4 mg/l NAA veya 0.5 mg/l IBA içeren sıvı MS ortamında sağlanmıştır. Hücre suspansiyon kültürleri ise yukarıda belirtilen ortamdan elde edilen kalluslar kullanılarak kurulmuş ve sekonder metabolitlerin incelenmesi için rutin olarak alt kültürlere alınmıştır.

Sarker vd. (2002) Rubiaceae'ye ait *Paederia foetida* L.'nin klonal çoğaltımını araştırmışlardır. Potansiyel tıbbi bir bitki olan *P. foetida* L.'nin tek boğum eksplantlarından elde edilen sürgünlerden 1.5 mg/l kinetin, 1.0 mg/l BAP ve 1.5 mg/l IBA'nın kombinasyonunu içeren MS ortamında bitki oluşumu sağlanmıştır. NAA veya BAP'ın 0.5-3.0 mg/l konsantrasyonları da bitki oluşumunu sağlamış ancak kinetin, BAP ve IBA kombinasyonunun bitki oluşumu üzerindeki etkisinin daha iyi olduğu bulunmuştur. NAA ve IBA aynı zamanda kallus oluşumunu indüklemiştir. 0.5-5.0 mg/l BAP oklu sürgün oluşumunu uyarımış ve sürgün gelişimini arttırmıştır. Kinetin ise sürgün oluşumu ve gelişiminde yetersiz kalmıştır. 2,4-D sadece kallus oluşumunu indüklemiştir.

Tepe vd. (2002) nane (*Mentha longifolia*) bitkisinde *in vitro* koşullarda kolkisin uygulamaları ile poliploid bitkilerin elde edilmesini araştırmışlardır. Açık arazide yetişen nane bitkilerinden alınan tek boğum eksplantları aseptik koşullarda 30 g/l sukroz, 6 g/l agar, 0.5 mg/l BA içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Bir ay sonra gelişen *in vitro* sürgünlerden tek boğum eksplantları ve sürgün uçları hazırlanarak 100 ve 150 mg/l kolkisin içeren besin ortamlarında 5, 7 ve 10 gün süreyle yetiştirilmiş, bu uygulamanın ardından kolkisin içermeyen taze besin ortamlarına aktarılmışlardır. İki ay süreyle gelişen bitkiler serada dış koşullara aktarılmış, kök uçlarında kromozom sayımları yapılarak poliploidi oluşum oranları belirlenmiştir. Kolkisin uygulamalarında hem sürgün ucu, hem de tek boğum eksplantlarının kullanılabilereği, eksplantların 5 gün süreyle 100 mg/l kolkisin uygulamasının ardından kolkisin içermeyen ortamlara aktarılması halinde % 25-27 oranında poliploid bitkiler elde edilebileereği ortaya konmuştur.

Arafah vd. (2003) *Origanum syriacum*'un *in vitro* koşullarda çoğaltımını araştırmışlardır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda (0.0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 veya

2.0 mg/l) kinetin, BA veya TDZ içeren MS ortamları kullanılmıştır. En yüksek sürgün oluşumu 0.4 mg/l kinetin ve 0.8 veya 1.2 mg/l BA kullanılan MS ortamlarında elde edilmiştir. TDZ sürgün oluşumunu uyarmamış, kallus oluşumunu indüklemiştir. Köklenme için farklı konsantrasyonlarda (0.0, 0.1, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 veya 2.0 mg/l) NAA, IBA veya IAA içeren MS ortamları kullanılmıştır. En yüksek kök sayısı 11.4 olarak 0.8 mg/l IAA içeren ortamda elde edilmiştir. Köklenmiş bitkicikler dış koşullara alıştırılmış, toprağa aktarılmış ve olgun bitkiler serada yetiştirilmiştir. Dış koşullarda bitkilerin yaşama oranı % 90 olarak belirlenmiştir.

Gattuso vd. (2003) Passifloraceae'ye ait Arjantin'in yerli türü olan *Passiflora caerulea*'nin mikroçoğaltımını çalışmışlardır. Bu tür geleneksel sakinleştirici olarak kullanılmaktadır. Yaprak eksplantları 0.0, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l BA içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Sürgün oluşumu başladığında, sürgünler hormonsuz MS ortamında, 24 ± 2 °C, $60 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{sn}^{-1}$, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında kültüre alınmıştır. BA içermeyen ortamda sürgün oluşumu gözlenmezken diğer ortamlarda çoklu sürgünler gelişmiştir. 50 gün sonra ortalama çoğaltım oranı 1.0 mg/l BA içeren ortamda % 62.43, 2.0 mg/l BA içeren ortamda % 33.60 ve 4.0 mg/l BA içeren ortamda ise % 7.50 olarak belirlenmiştir.

Goleniowski vd. (2003) *Origanum vulgare x appeli*'nin meristem kültürü ile mikroçoğaltımını araştırmışlardır. Çalışma farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda BA ve NAA içeren MS ortamlarının *Origanum vulgare x appeli*'nin mikroçoğaltımı üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır. Çalışmada 0.28 μM BA ve 0.5 μM NAA hormon kombinasyonunu içeren MS ortamı sürgün oluşumu üzerinde en etkin ortam bileşimi olmuştur. Eksplant başına ortalama 22.2 adet sürgün elde edilmiştir. 60 gün sonra % 100 oranında köklenmiş bitkiler elde edilmiştir.

Makowczynska ve Andrezewska-Golec (2003) Plantaginaceae'ye ait tıbbi açıdan önemli bir tür olan *Plantago asiatica* L.'nin sürgün ucu kültürü ile çoğaltımını çalışmışlardır. Bu amaçla sürgün uçlarını IAA ve BAP veya kinetin içeren MS ortamında kültüre almışlar ve en iyi sonucu 0.1 mg/dm³ IAA ve 1.0 mg/dm³ BAP kombinasyonunu içeren ortamda elde etmişlerdir. Altı hafta sonra bu sürgünleri

köklendirmek amacıyla MS ortamına aktarılmış ve 8 hafta içinde köklenen bitkicikler dış koşullara alıştırılmıştır.

Perica (2003) Asteraceae'ye ait *Centaurea rupestris* L.'in *in vitro* koşullarda çoğaltımını çalışmıştır. Balkan-Alpler için endemik olan, içerdiği flavonoid ile güçlü antifitoviral, antimikrobiyal ve antifungal etkiye sahip bu türün çoğaltımı sağlanmıştır. Tohumların aseptik olarak *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi ile elde edilen sürgünler kültür başlangıcında eksplant olarak kullanılmıştır. En yüksek çoğaltım katsayısı eksplant başına 11.88 sürgün olarak 1.0 µM BAP ve 2.9 µM 2,4-D içeren MS ortamında 3. alt kültürde elde edilmiştir. En iyi köklenme % 58 oranında 3.0 µM IBA içeren yarı kuvvetteki MS besin ortamında elde edilmiştir. Köklenmiş bitkicikler saksılara aktarılmış ve dış koşullara alıştırılmıştır.

Gao vd. (2003/4) tohum, kök ve yapraklarında bulunan rotenondan dolayı doğal insektisit olarak kullanılan Fabaceae'ye ait *Amorpha fruticosa*'nın mikroçoğaltımı üzerine BA ve kazein hidrolizatın etkisini araştırmışlardır. 1/2 kuvetteki hormonsuz MS besin ortamında kültüre alınan tohumlardan elde edilen fidelerden alınan apikal ve aksiler tomurcuklar eksplant olarak kullanılmıştır. 8.0 mg/l BA içeren MS ortamında kültüre alınan eksplantların % 100'ü kültür başlangıcından 6 hafta sonra eksplant başına 4.94 adet sürgün oluşturmuştur. Aynı ortam bileşimine alınan bu sürgünler çoklu sürgün oluşturmuştur. Ortama 200 mg/dm³ kazein hidrolizat ilave edilmesi alt kültür başına 8.77'ye kadar sürgün sayısını arttırmıştır. Ortama hindistan cevizi sütü ilave edilmesi sürgün uzamasını arttırmış ve sürgünlerin daha canlı büyümesini sağlamıştır. 2.0 mg/dm³ IAA içeren 1/2 kuvvetteki MS ortamında alt kültüre alınan sürgünlerden 3 hafta sonra % 82.53 oranında sürgün oluşumu sağlanmıştır. Köklü bitkicikler dış koşullara alıştırılmıştır.

Zhao vd. (2003/4) Fabaceae'ye ait tıbbi bir bitki olan *Sophora flavescens* Ait.'in *in vitro* koşullarda çoğaltımını çalışmışlardır. 1/2 kuvetteki MS ortamında kültüre alınan tohumlardan fideler elde edilmiştir. Fidelerden alınan tek boğum eksplantları farklı konsantrasyonlardaki TDZ, BA ve NAA kombinasyonlarını içeren 30 g/l sukroz ve 7 g/l agar ilave edilmiş MS ortamlarında, 24 µmol. m⁻². sn⁻¹, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında kültüre alınmıştır. Oluşan sürgünler de farklı konsantrasyonlarda NAA, IAA ve IBA içeren MS ortamlarında

kültüre alınmıştır. En iyi sürgün oluşumu 8.88 µM BA ve 2.69 µM NAA kombinasyonu içeren MS ortamında ve en iyi kök oluşumu ise 5.37 NAA içeren MS besin ortamında gerçekleşmiştir. Sürgün oluşum oranı % 93.4, kök oluşum oranı ise % 82.4 olarak tesbit edilmiştir. Eksplant başına 4.2 adet sürgün oluşmuştur. Oluşan sürgünler sürgün oluşumunu arttırmak için aynı ortamda 6 kez alt kültüre alınmış ve köklendirilmiş bitkicikler dış koşullara alıştırılmıştır.

Benniamin vd. (2004) Capparidaceae'ye ait tıbbi bir bitki olan *Crateva magna* (Lour.) DC.'nin mikroçoğaltımını araştırmışlardır. Tek boğum eksplantları farklı konsantrasyonlarda BAP ve 30 g/l sukroz içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. 8.8 µM BAP içeren MS ortamında 63.2±0.92 mm uzunluğunda eksplant başına 4.4±0.09 adet sürgün oluşmuştur. Bu sürgünlerin köklendirilmesi 9.84 µM IBA ve 0.54 µM NAA kombinasyonunu içeren 1/2 kuvvetteki MS ortamında sağlanmıştır. Köklendirilmiş bitkicikler dış koşullara alıştırılmış ve yaşama oranı % 68 olarak belirlenmiştir.

Miachir vd. (2004) Zingiberaceae'ye ait tıbbi ve ticari açıdan önemli olan *Curcuma zedoaria* Roscoe'nin mikroçoğaltımını ve kallus oluşumunu çalışmışlardır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlardaki (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ve 3.0 mg/l) BAP ve (0.0, 0.2, 0.5 ve 1.0 mg/l) NAA ayrı ayrı ya da kombinasyonlarını içeren, 8.0 g/l agar ve 30 g/l sukroz ilave edilmiş MS besin ortamında yetiştirilen bitkilerin rizomlarının sürgün uçları ve meristemleri kullanılmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda BAP içeren ancak NAA içermeyen ortamlarda sürgün ucu eksplantları % 72.3 oranında sürgün oluşturmuştur. Bitkicikler başarıyla dış koşullara alıştırılmıştır. Kallus indüksiyonu ve gelişimi kök parçalarının 1 mg/l NAA içeren MS ortamında karanlık ve 25±2 °C'de kültüre alınmasıyla sağlanmıştır.

Prasad vd. (2004) Periplocaceae'ye ait sürgün ucu, tek boğum ve kotiledon eksplantları kullanarak tıbbi bir bitki olan *Cryptolepis buchmanii* Roem. & Schult'nin *in vitro* koşullarda çoğaltımını araştırmışlardır. En iyi sonuç tek boğum eksplantlarından elde edilmiştir. Tek boğum eksplantları farklı konsantrasyonlarda sitokinin ya da sitokininle birlikte oksin veya gibberelin kombinasyonlarını içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Sitokinin tek başına ya da BAP ile birlikte kullanıldığında sürgün oluşumu üzerinde en etkili olmuştur. Eksplant başına 4.5-

5.0 cm uzunluğunda, 12.5-13.0 adet sürgün oluşumu 2.0 mg/l BAP, 0.1 mg/l kinetin, 0.05 mg/l NAA ve 0.05 mg/l GA₃ kombinasyonunu içeren MS ortamında elde edilmiştir. Sürgün oluşum oranı % 60 olarak belirlenmiştir. Oluşan sürgünler farklı konsantasyonlarda oksin; IAA, IBA ve NAA ve kombinasyonlarını içeren MS ortamında köklendirilmeye alınmıştır. 1 mg/l IBA içeren MS ortamında mikro sürgünlerin % 80'i yaklaşık olarak sürgün başına 4.0-4.5 cm uzunluğunda 6.5-7.0 adet kök oluşturmuştur.

Tyagi ve Prakash (2004) Simmondsiaceae'ye ait *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider (Jojoba)'in 10 genotipinin mikroçoğaltımı için koşulların optimize edilmesini araştırmışlardır. Tarlada yetişen 5 dişi ve 5 erkek jojoba genotiplerinden alınan tek boğum eksplantları MS ortamında kültüre alınmıştır. Farklı genotiplerin optimum sürgün rejenerasyonu için gerekli BA gereksinimlerinin farklı olduğu belirlenmiştir. Dişi genotip (EC 99692) tek boğum eksplantarı 10 µM BA içeren MS ortamında eksplant başına maksimum 10 sürgün oluşturmuş bunu eksplant başına 9.3 sürgün oluşumuyla erkek genotip (EC 171284) takip etmiştir. Değişik genotip kültürlerinin % 44-67'sinde 50 µM IBA'in kök oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir.

Ayan vd. (2005) farklı sukroz içerikleri, bitki büyüme düzenleyicileri ve eksplant tiplerinin Hypericaceae'ye ait *Hypericum perforatum* L.'da rejenerasyon yeteneği ve hypericin içeriğine etkilerini araştırmışlardır. Dünya literatüründe St. John's wort olarak bilinen kantaron (*Hypericum perforatum* L.) günümüzde depresyon tedavisinde de yaygın olarak kullanılan çok yıllık bir tıbbi bitkidir. Bitkinin antidepresan etkisinin bir dianthrone pigmenti olan hypericidinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada hypericini doku kültürü yöntemiyle üretmek ve kantaron için etkili bir mikroçoğaltım sistemi tanımlamak amaçlanmıştır. Yaprak parçaları ve gövde segmentleri 0.5, 1.0 veya 1.5 mg/l kinetin, 0.5, 1.0 veya 1.5 mg/l 2,4-D ve 30, 40 veya 50 g/l sukroz içeren MS ortamlarında, karanlık şartlarda 26±2 °C de 8 hafta boyunca kültüre alınmışlardır. Bitki büyüme düzenleyicileri içeren bütün ortamlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Ancak kallus oluşum sıklığı bakımından en yüksek değerler 30g/l sukroz, 0.5 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l kinetin içeren MS ortamında elde edilmiştir. Elde edilen kalluslar sürgün oluşumu için 1.0 mg/l BA, kök oluşumu için ise 1.0 mg/l IAA içeren MS ortamlarında kültüre

alınmışlardır. Kallus başına sürgün sayısı ve hypericin içeriği bu sürgünlerde araştırılmıştır. Yaprak parçalarından gelişen sürgünlerde bu değerler daha yüksek olup kallus başına 9 sürgün ve % 0.048 oranında hypericin tespit edilmiştir. Elde edilen sürgünler başarılı bir şekilde sera şartlarına adapte olmuşlardır.

Chen ve Li (2005) Çin'e ait tehlike altında ve tıbbi bir tür olan *Saussurea laniceps* Hand.-Mazz.'in (Asteraceae) mikroçoğaltımını ve kallus kültürünü çalışmışlardır. Hormon içermeyen MS besin ortamında *in vitro* çimlendirilen 7-10 günlük bitkilerin 0.5 cm x 0.5 cm yaprak eksplantları NAA/2,4-D ve BA/kinetin içeren MS ortamında kültüre alınmış ve 10 gün sonra kallus elde edilmiştir. 1.5 mg/l BA + 0.2 mg/l NAA kombinasyonunu içeren ortama aktarılıp 5 °C düşük sıcaklıkta inkübe edilen kalluslardaki sürgün rejenerasyonu 23/20 °C'de inkübe edilenlere göre önemli ölçüde artmıştır. 0.2 mg/l NAA ieren 1/2 kuvvetteki MS ortamında sürgünlerin % 78'i köklenmiştir. Bitkicikler dış koşullara alıştıırılmış ve canlılık oranı %63 olarak belirlenmiştir.

Gangaprasad vd. (2005) Asclepiadaceae'ye ait endemik ve tehlike altında olan, tıbbi açıdan önemli bir tür *Decalepis arayalpathra* (Joseph & Chandra) Venter'nın mikroçoğaltımını ve ekorestorasyonunu araştırdıkları çalışmalarında tek boğum eksplantlarını 0.1-5.0 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre almışlardır. 1.0 mg/l BAP içeren MS ortamı en uzun sürgün oluşumunu (6.8 cm) 60 günde sağlamıştır. Çoğaltım aşaması için *in vitro* koşullarda elde edilen nodlar ve sürgün uçları 0.5 mg/l BAP içeren ortamlarda kültüre alındığında 30 günde 8 cm uzunluğunda 5-7 nod içeren sürgünler oluşturmuştur. Daha sonrasında 2-3 nod içeren 3-5 cm uzunluğundaki mikro sürgünler 1.5 mg/l IAA içeren MS ortamında kültüre alındığında 30 günde ortalama 6.3 adet kök oluşturmuşlardır. Köklenmiş bitkicikler doğal habitatlarına aktarılmışlar ve 2 sene sonra % 84 yaşama oranı ile bitkilerin doğal koşullarına alıştıırıldığı rapor edilmiştir.

Piatczak vd. (2005), Gentianaceae'ye ait *Centaurium erythraea* Rafn.'da sıvı kültür sistemi kullanarak *in vitro* koşullarda çoğaltımını ve de elde edilen bitkilerden farmakolojik olarak önemi olan sekoiridoid üretimini çalışmışlardır. *In vitro* koşullarda 30 gün büyütölmüş fidelerden alınan sürgün ucu eksplantlarından sürgün çoğaltımı 0.1 mg/l IAA ve 1.0 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamı kullanılarak

geliştirilmiştir. 4 hafta içinde eksplant başına 60 sürgün oluşmuştur. Bu değer, katı ortamda elde edilen sürgünlerin 3 katından fazladır. Sıvı ortamda elde edilen sürgünler hormon içermeyen MS ve 1/2 kuvvetteki MS ortamlarında 4 ve 6 hafta içinde sırasıyla % 77 ve % 85 oranında köklenmiştir. Köklenmiş bitkicikler toprağa aktarılarak dış koşullara % 90 başarıyla alıştırılmıştır. 10 haftalık bitkilerin sürgünlerinin 149 mg/g kuru ağırlık'a kadar sekoiridoid glukozitleri biriktirdiği belirlenmiştir. Bu değer yabancı bitki sürgünlerinde elde edilen miktardan önemli düzeyde fazladır.

Sadanandam vd. (2005) Combretaceae'ye tıbbi bir bitki olan *Terminalia bellirica* Roxb.'nın mikroçoğaltımını çalışmışlardır. Tek boğum eksplantlarından aksiller tomurcuk oluşumunu sağlamışlardır. Eksplantlar farklı konsantrasyonlarda BA ve kinetin içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Birinci kültürde 13.3 µM BA içeren ortam en yüksek sürgün uzunluğunu (1.9±0.2 cm) sağlamıştır. Sürgünler ayrılıp düşük düzeyde BA (2.2, 4.4, 6.6 veya 8.9 µM) veya kinetin (2.3, 4.6, 6.9 veya 9.3 µM) içeren alt kültürlere aktarıldığında en etkin sürgün indüksiyonu 4.4 µM BA içeren ortamda sağlanmıştır. Sürgünlerin köklendirilmesi 4.9 µM IBA içeren değiştirilmiş B5 veya Odunsu bitki ortamında elde edilmiştir. Köklendirilmiş bitkiler seralara aktarılmıştır.

Datta vd. (2006) Taxaceae'ye ait *Taxus wallichiana* (Zucc.)'nin organogenezisini ve bitki rejenerasyonunu çalışmışlardır. İnsanlardaki tümörlere karşı etkili taxan maddesini içermektedir. Zigotik embriyolar 0.5 mg/l BA, 1.0-2.0 mg/l 2,4-D veya NAA kombinasyonu ilave edilmiş 1/2 kuvvetteki Lloyd ve MCCown ortamlarında kültür başlangıcından 4 hafta sonra yeşil ve sarı olmak üzere morfolojik olarak iki farklı kallus kopmaktı oluşturmuştur. Adventif sürgün tomurcuk indüksiyonunun optimum sıklığı % 63 olarak yeşil kallus kompaktından, 2.5 mg/l BA içeren 1/2 WPMSH ortamında kültürden 4 hafta sonra elde edilmiştir (her yeşil kallus kopmaktı başına 3.0±0.67 sürgün tomurcuk). Ortama %1 aktif kömür ilave edilmesi maksimum sürgün uzunluğuna (2.15 cm) neden olmuştur. Mikro sürgünler kültür başlangıcından 4 hafta sonra nitrat konsantrasyonu 1/5 oranında azaltılmış MS besin ortamında köklendirilmiş ve köklenme oranı % 40 olarak tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOTLAR

Araştırma 2000-2006 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölüm'üne ait Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Bitki Materyali

Araştırmada bitkisel materyal olarak Batı ve Güney Anadolu'da yetişen endemik bir tür olan *Sideritis stricta* Boiss. & Heldr. ve Batı Torosların Isparta ve Antalya arasındaki dar bir şeridinde yayılış gösteren diğer bir endemik tür *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis kullanılmıştır.

S. stricta tohumları doğal koşullarda yetiştiği ve yoğun yayılış gösterdiği, C3 Antalya: Serik Taşağıl-Beşkonak, 20 km, 240 m, *P. brutia* açıklığı lokalitesinden H. Duman, 8411, *O. minutiflorum* tohumları ise, C3 Antalya: Saklıkent Bakırlı tepesi etekleri, 1800 m lokalitesinden O. Ünal, 1111 tarafından toplanmıştır. *S. stricta* ve *O. minutiflorum*'un doğal yayılış alanlarındaki görünüşleri ile ilgili fotoğrafları sırasıyla Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.1. *S. stricta*'nın doğal yayılış alanındaki görünüşü.



Şekil 3.2. *O. minutiflorum*'un doğal yayılış alanındaki görünüşü.

3.2. Metotlar

3.2.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

Tohumların yüzey sterilizasyonu Babaoğlu vd. (2001)'nin tohum sterilizasyonu için önerdiği yöntemle göre yapılmıştır. Buna göre *O. minutiflorum* ve *S. stricta* tohumları birkaç damla Tween-20 eklenmiş % 10'luk NaOCl çözeltisi içerisinde 25 dakika süreyle tutularak dezenfekte edilmiş, daha sonra üç kez beşer dakika süreyle steril saf su ile durulanmıştır.

3.2.2. Tohumların Çimlendirilmesi

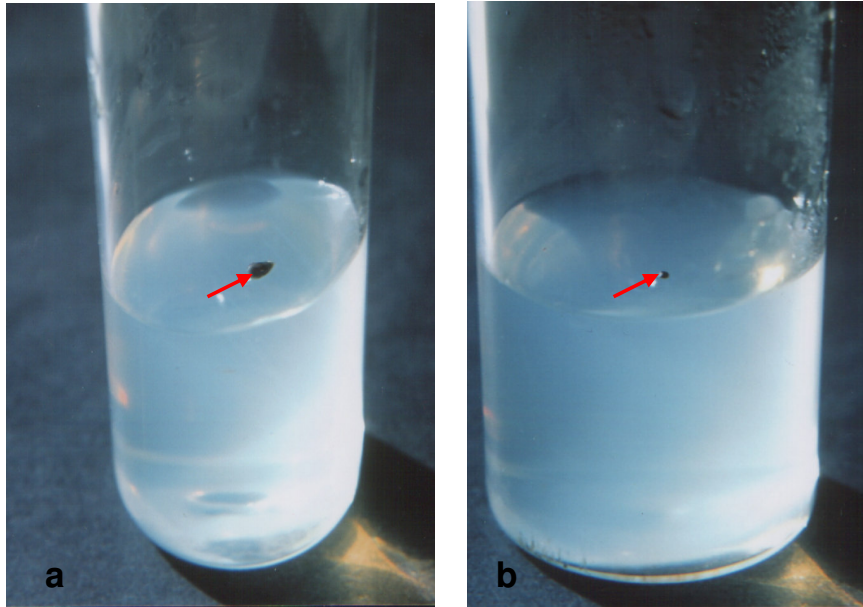
Çimlendirme denemelerinde temel besin ortamı olarak MS ve B5 ortamları kullanılmıştır. Bu temel besin ortamlarının içindeki maddeler ve miktarları ile ilgili bilgiler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. MS (Murashige and Skoog, 1962) ve B5 (Gamborg et al., 1968) temel besin ortamlarında bulunan besin maddeleri ve oranları.

	MS	B5
Makro elementler	(mg/l)	(mg/l)
KNO ₃	1900	2500
NH ₄ NO ₃	1650	134
KH ₂ PO ₄	170	150
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	250
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	150
Mikro elementler		
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	2
H ₃ BO ₃	6.2	3
KI	0.83	0.75
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
Vitaminler ve aminoasitler		
Myo-inositol	100	100
Tiamin	0.100	10
Nikotinik asit	0.5	1
Piridoksin HCl	0.5	1
Fe-şelat		
Na ₂ EDTA	37.30	37.30
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85	27.85

Ortamlar % 0.6 oranında agar ile katılaştırılmış ve 30 g/l oranında sukroz ilave edilmiştir. Besin ortamının pH seviyesi 5.7'e ayarlandıktan sonra kaynatılan ortamlar; 2.5x10 cm boyutundaki cam tüplere 10'ar ml olacak şekilde doldurulmuştur. Tüplerin ağzı alüminyum folye kapak ile kapatılmış ve 15 dakika süreyle 121 °C'de otoklavda sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işlemi tamamlanan ortamlar dikime hazır hale getirilmiştir.

Sterilize edilen tohumlar çimlendirilmek üzere MS ve B5 ortamlarına aktarılmışlardır. *S. stricta* ve *O. minutiflorum*'a ait tohumların çimlendirme ortamlarındaki fotoğrafları Şekil 3.3 a ve b'de verilmiştir. Her iki tür için de her tüpte bir adet tohum olacak şekilde toplam 300 tüpe dikim yapılmıştır. Tohumlar çimlenene kadar 14-21 gün boyunca karanlıkta, 25 ± 2 °C'de tutulup daha sonra fide çıkışı başlayınca 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta, $40 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{sn}^{-1}$ floresan ışığı bulunan iklim odasında kültüre alınmıştır. Tohumlarda çimlenme oranı "%" olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.3. *S. stricta* tohumlarının (a) ve *O. minutiflorum* tohumlarının (b) çimlendirme ortamlarındaki görünüşleri.

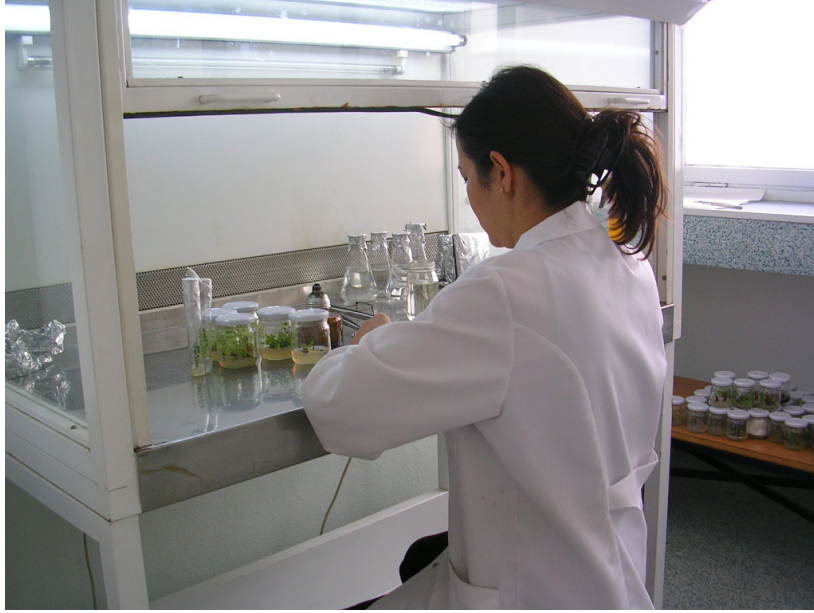
3.2.3. *In vitro* Koşullarda Yetiştirilen Fidelerden Eksplant İzolasyonu ve Mikroçoğaltımı

Bitki büyüme düzenleyicilerinden; BAP'in 0.0, 1.0, 2.0 ve 3.0 mg/l ve NAA'in 0.0, 0.1 ve 0.5 mg/l konsantrasyonlarının, 0.1 ve 0.5 mg/l NAA'in tek başına kullanıldığı uygulamalar hariç, on farklı kombinasyonları kullanılarak hazırlanan MS ve B5 ortamları erlenmayerlere konulmuş ve ağızları alimünyum folye ile kapatılarak otoklavda sterilize edilmiştir. Mikroçoğaltım için kullanılan ortam kombinasyonları Çizelge 3.2'de toplu olarak gösterilmiştir. Bu steril ortamlar daha sonra önceden otoklavda 121 °C'de 45 dakika süreyle tutularak sterilize edilmiş ve soğutulmuş petri kutularına ve cam kavanozlara konulmuştur. Besin ortamları 7 cm çapındaki her bir cam petri kabına yaklaşık 10 ml olacak şekilde, 6.5 x 7.5 cm boyutlarındaki her kavanoza da 50 ml olacak şekilde doldurulmuştur. Ortamlar, petri kutuları ve kavanozlar içerisinde bir saat kadar bekleyince agarın etkisiyle jel kıvamına ulaşmış ve dikime hazır hale gelmiştir. Bu işlemlerin tamamı laminar akışlı kabinde (Şekil 3.4) steril şartlarda yapılmıştır.

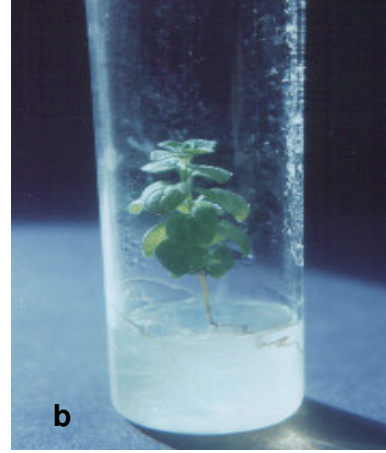
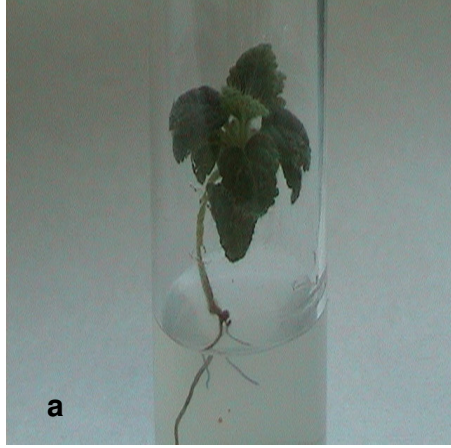
Çizelge 3.2. Mikroçoğaltım amacıyla kullanılan MS ve B5 ortamlarının BAP ve NAA kombinasyonları.

	BAP (mg/l)			
NAA (mg/l)	0.0	1.0	2.0	3.0
0.0	+	+	+	+
0.1	—	+	+	+
0.5	—	+	+	+

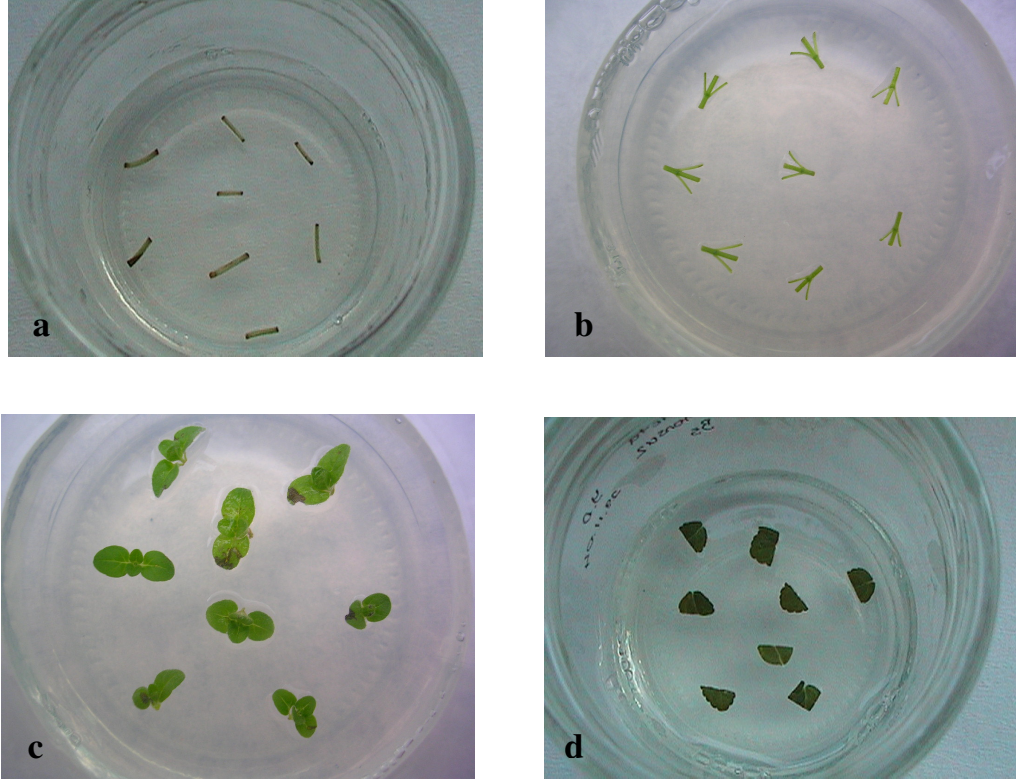
In vitro koşullarda elde edilmiş 30-40 günlük fidelerden (Şekil 3.5 a,b) alınan yaprak parçaları ve gövde parçaları (hipokotil, tek boğum ve sürgün ucu) (Şekil 3.6) eksplant olarak kullanılmıştır. *S. stricta* ve *O. minutiflorum* için sırasıyla her uygulama grubunda toplam 40 ve 30 adet eksplant olacak şekilde, eşit sayıda eksplant kullanılmasına özen gösterilmiştir. Eksplantlar mikroçoğaltım amacıyla geliştirilmek üzere Çizelge 3.2'de verilen hormon kombinasyonlarını içeren ortamlara aktarılmış ve 25±2 °C'de, % 40-50 nem, 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta, 145 µmol. m⁻². sn⁻¹ floresan ışığı bulunan iklim odasında kültüre alınmıştır.



Şekil 3.4. Steril laminar akışlı kabinde çalışma anından bir görünüm.



Şekil 3.5. B5 ortamında yetiştirilen 30-40 günlük *S. stricta* fidesi (a) ve MS ortamında yetiştirilen 30-40 günlük *O. minutiflorum* fidesi (b).



Şekil 3.6. Denemelerde kullanılan eksplant tipleri; hipokotil (a), tek boğum (b) sürgün ucu (c) ve yaprak parçaları (d).

3.2.4. Alt Kültür Aşaması

Mikroçoğaltım aşamasından elde edilen yeni sürgünlerin bir kısmı çoğaltım katsayısını belirlemek amacıyla 1., 2. ve 3. alt kültürlerle alınmıştır. *S. stricta* türü için alt kültür denemelerinde 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA hormon kombinasyonunu ve sadece BAP (1.0-3.0 mg/l) içeren B5 ortamları kullanılmıştır. *O. minutiflorum* türü için ise 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonları ve sadece BAP (2.0-3.0 mg/l) veya sadece kinetin (2.0-3.0 mg/l) içeren MS ortamları kullanılmıştır. *O. minutiflorum* için alt kültür denemelerinde MS ortamının Fe-şelat konsantrasyonu iki katına çıkarılmıştır. Her iki tür için alt kültür denemelerinde kullanılan ortam bileşimleri toplu olarak Çizelge 3.3'de verilmiştir. Tüm alt kültür denemelerinde her uygulama grubunda *S. stricta* ve *O. minutiflorum* için sırasıyla toplam 36 ve 48 adet sürgün eksplant olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. *S. stricta* ve *O. minutiflorum* için alt kültür denemelerinde kullanılan ortam ve hormon kombinasyonları.

Tür	Besin ortamı	Hormon Kombinasyonları
<i>S. stricta</i>	B5	1 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA
		1 mg/l BAP
		2 mg/l BAP
		3 mg/l BAP
<i>O. minutiflorum</i>	MS	1 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA
		2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA
		3 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA
		2 mg/l BAP
		3 mg/l BAP
		2 mg/l Kinetin
		3 mg/l Kinetin

3.2.5. Sürgünlerin Köklendirilmesi ve Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması

Mikroçoğaltım ve her alt kültür aşamasından oluşan sürgünler, farklı IBA konsantrasyonları (0.0, 1.5, 3.0, 4.5 ve 10 mg/l) içeren MS ve B5 ortamlarında köklendirilmeye aktarılmıştır. 3-4 hafta sonunda köklenen sürgünler önce iklim odasında steril 'perlit + toprak' içeren 6.5 x 8 cm boyutundaki plastik kaplara alınmıştır. Kapların üzerine beher yerleştirilerek 7 günde aşamalı olarak açılıp sulanarak, dış koşullara alışması sağlanmıştır. Bitkiler 3 ay sonra 10 x 7.5 cm boyutundaki küçük saksılara, 7 ay sonra da 14 x 13 cm boyutundaki büyük saksılara aktararak gelişmeleri *S. stricta* türü için 12 ay süre ile, *O. minutiflorum* türü için ise 3 ay süre ile izlenmiştir. Bitkiler gün aşırı musluk suyu ile sulanmıştır.

3.2.6. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

Bütün denemeler Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre 3 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Çimlendirme, mikroçoğaltım, alt kültür, bitkilerin köklendirilmesi ve dış koşullara alıştırılması ile ilgili tüm denemeler iklim odasında yürütülmüştür. İklim odasının koşulları; çimlendirme denemeleri için karanlık, *in vitro* koşullarda fidelerin gelişmesi için 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta, 40 $\mu\text{mol. m}^{-2}$.

sn⁻¹ floresan ışığı olacak şekilde, mikroçoğaltım, alt kültür ve köklendirme denemelerinde ise 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta, 145 μmol. m⁻². sn⁻¹ floresan ışığı olacak şekilde ayarlanmıştır. Sıcaklık tüm gelişme aşamaları için 25±2 °C'ye, nem ise % 40-50'ye ayarlanmıştır (Ćellárová, 1992). Çalışmanın yürütüldüğü iklim odasından ve denemelerin değişik aşamalarından bir görünüm Şekil 3.7'de verilmiştir.



Şekil 3.7. Çalışmanın yürütüldüğü iklim odasından ve denemelerin değişik aşamalarından bir görünüm.

Her iki bitki türünde değişik eksplant tiplerinin ve farklı hormon kombinasyonlarının sürgün oluşumu üzerindeki etkileri eksplant başına oluşan ortalama sürgün sayısı, sürgün veren eksplant başına ortalama sürgün sayısı, sürgün veren eksplant oranı ve gelişen eksplant oranları (%) belirlenmiştir. Sürgün veren eksplant oranları, sürgün veren eksplant sayısının dikilen eksplant sayısına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır. Benzer şekilde, gelişen eksplant oranı, gelişen eksplant sayısının dikilen eksplant sayısına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır. Çoğaltım katsayısı, mikroçoğaltım aşamasındaki eksplant başına ortalama sürgün sayısının, 1., 2., 3.,.....n. alt kültür aşamalarındaki eksplant başına

ortalama sürgün sayısı ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır. Eksplant tiplerinin ve hormon kombinasyonlarının oluşan sürgün sayısı üzerindeki etki ve etkileşimlerinin, alt kültür aşamalarında kullanılan hormon ve kombinasyonlarının eksplant başına oluşan sürgün sayısı üzerindeki etkileri, köklendirme aşaması denemeleri için ise farklı IBA konsantrasyonlarının kök oluşumu üzerindeki etkilerinin önemi varyans analizleri ile incelenmiştir. Varyans analizleri SPSS paket programı ile yapılmıştır. Uygulamalar arasındaki farkların önem kontrolü ise “Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi” ile ortalamalar arasındaki farklar karşılaştırılarak belirlenmiştir (Sokal and Rohlf, 1995).

4. BULGULAR

Bu bölümde *S. stricta* ve *O. minutiflorum*'un *in vitro* koşullarda çoğaltımı için en uygun eksplant tipi, ortam, hormon kombinasyonu, alt kültür sayısı ve çoğaltım katsayısı belirlenmiş, *in vitro* koşullarda köklenen sürgünlerin dış koşullara alıştırılması sağlanmıştır. Çalışma birkaç aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada tohumların çimlendirme denemeleri, ikinci aşamada *in vitro* koşullarda yetiştirilen fidelerden eksplant izolasyonu ve mikroçoğaltım denemeleri, üçüncü aşamada sürgün oluşumunun devam ettiği alt kültür sayısı belirleme denemeleri kurulmuştur. Dördüncü aşamada ise rejenere olan sürgünlerin köklendirilmesi ve dış koşullara alıştırılması sağlanmıştır. İkinci aşamada farklı BAP (0.0, 1.0, 2.0 ve 3.0 mg/l) ve NAA (0.0, 0.1 ve 0.5 mg/l) kombinasyonlarını içeren MS ve B5 ortam bileşimlerinin ve farklı eksplant tiplerinin (hipokotil, tek boğum, sürgün ucu ve yaprak parçaları) sürgün oluşumu üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Üçüncü aşamada her bir alt kültür için farklı BAP (0.0, 1.0, 2.0 ve 3.0 mg/l) ve NAA (0.1 mg/l) kombinasyonlarını ve ayrı ayrı kinetin (2.0 ve 3.0 mg/l) veya BAP (2.0 ve 3.0 mg/l) içeren MS ve B5 ortamlarının sürgün oluşumu üzerindeki etkileri ve son aşamada ise farklı IBA konsantrasyonlarının (0.0, 1.5, 3.0, 4.5 ve 10 mg/l) mikroçoğaltım ve alt kültürlerden elde edilen sürgünlerin kök oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu aşamalarla ilgili denemelerin sonuçları *S. stricta* ve *O. minutiflorum* için ayrı başlıklar halinde verilmiştir.

4.1. *S. stricta* ile İlgili Denemelerin Sonuçları

4.1.1. Tohum Çimlendirme Aşaması

Sterilize edilen tohumlar, hormonsuz MS ve B5 ortamlarında, karanlıkta, 25 °C'de iklim odasında çimlendirilmeye bırakılmıştır. Tohumlarda 3 ay süreyle yapılan gözlemler sonucunda çimlenme gözlenmemiştir. Bu nedenle, tohumları çimlendirmek amacı ile farklı metotlar uygulanmıştır.

Bu metotlar;

1- Tohumlar her iki yüzü kurutma kağıdı ile kaplanmış, 1/2 Hoagland (Hoagland and Arnon, 1938) çözeltisi ve ayrıca saf su ile ıslatılmış steril petri kutularında 10'ar adet olacak şekilde çimlenmeye bırakılmıştır. Ancak bu uygulama sonucunda da tohumlarda çimlenme gerçekleşmemiştir.

2- Yapılan literatür çalışmasında (Martin, 2003) *Sideritis* türlerinde çimlenme problemi olduğu ve bunun tohum kabuğunun (testa) sert olmasından kaynaklandığı belirtilmektedir. Bu nedenle tohumlara değişik *Sideritis* türleri için önerilen bir uygulama yapılmıştır (Martin, 2003). Buna göre, *S. stricta* tohumların testası 0 numara su zımparası ile zımparalanmış ve tohum yüzeyi inceltirilmiştir. Bu tohumların bir kısmı, her iki yüzü kurutma kağıdı ile kaplanmış ve saf su ile ıslatılmış steril petri kutularında 10'ar adet olacak şekilde oda sıcaklığında, karanlıkta çimlenmeye bırakılırken, bir kısmı da perlit içeren plastik kaplara ekilmiş ve 25 ± 2 °C' de, 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta, $40 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{sn}^{-1}$ floresan ışığı bulunan iklim odasında kültüre alınmıştır. Fakat bu uygulamalar sonucunda da tohumlarda çimlenmenin gerçekleşmediği görülmüştür.

3- Tohumlar + 4-5 °C'de 24 saat bekletildikten sonra sterilize edilip MS ve B5 ortamlarında *in vitro* koşullarda ve ayrıca iki yüzü kurutma kağıdı ile kaplanmış ve saf su ile ıslatılmış steril petri kutularında *in vivo* koşullarda kültüre alınmıştır. Bir ay süreyle yapılan gözlemler sonucunda ne *in vitro* ne de *in vivo* koşullarda çimlenme gözlenmemiştir.

4- Tohumlar kaynamış su (100 °C) içinde 24 saat bekletilip sonra sterilize edilerek MS ve B5 ortamlarında *in vitro* koşullarda, ayrıca iki yüzü kurutma kağıdı ile kaplanmış ve saf su ile ıslatılmış steril petri kutularında *in vivo* koşullarda kültüre alınmıştır. Bir ay süreyle yapılan gözlemler sonucunda ne *in vitro* ne de *in vivo* koşullarda çimlenme gözlenmemiştir.

5- Sterilize edilmiş tohumlar 25×10^{-2} M GA_3 çözeltisi ile 24 saat muamele edilip MS ve B5 ortamlarında *in vitro* koşullarda ve ayrıca iki yüzü kurutma kağıdı ile kaplanmış ve saf su ile ıslatılmış steril petri kutularında *in vivo* koşullarda kültüre alınmıştır. Bu uygulamalardan dört hafta sonra *in vitro* koşullarda MS besin

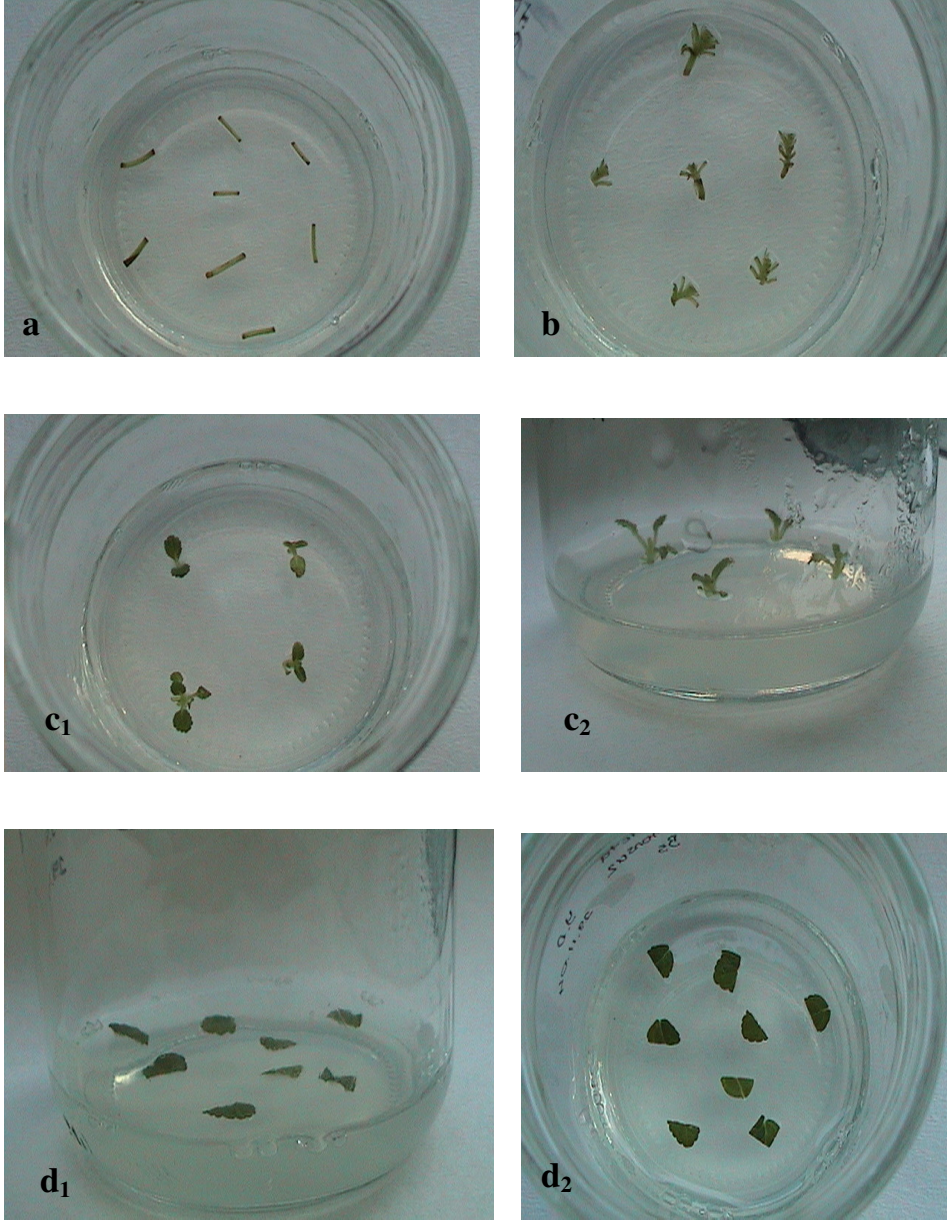
ortamında % 10 oranında, B5 ortamında % 25 oranında, *in vivo* koşullarda ise % 10 oranında çimlenme gözlenmiştir.

6- Sterilize edilmiş tohumların testası bir bistüri yardımıyla çıkarılarak geri kalan endosperm ve embriyo kısmı MS ve B5 ortamlarında kültüre alınmıştır. İki hafta sonra yapılan gözlemlerde MS ortamında % 20 oranında, B5 ortamında ise % 100 oranında çimlenme olduğu belirlenmiştir.

Bu bulgular ışığında mikroçoğaltım denemelerinde B5 ortamında çimlendirilen ve büyütülen 30-40 günlük fideler kullanılmıştır (Bkz. Şekil 3.5 a).

4.1.2. Mikroçoğaltım Aşaması

Eksplant olarak kullanılan hipokotil, tek boğum, sürgün ucu gibi gövde kısımları ve yaprak parçalarının ve farklı BAP ve NAA kombinasyonlarındaki MS ve B5 ortamlarının sürgün oluşumuna etkisi incelenmiştir. Kullanılan eksplant tipleri ile ilgili fotoğraflar Şekil 4.1'de görülmektedir. MS ortamında kültüre alınan eksplantlarda sürgün oluşumu gerçekleşmemiş, aksine kararmalar ve ölümler meydana gelmiştir. Bu nedenle MS ortamı mikroçoğaltım denemelerinden çıkarılmıştır. Değişik eksplant tiplerinin, farklı BAP ve NAA kombinasyonlarındaki B5 ortamlarının sürgün oluşumu üzerindeki etkisi ile ilgili veriler Çizelge 4.1'de, bu verilerin varyans analiz sonuçları ise Ek-1, Çizelge 1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Mikroçoğaltım amacıyla *S. stricta* fidelerinden alınan eksplantlar hipokotil (a), tek boğum (b), sürgün ucu (c₁₋₂) ve yaprak parçaları (d₁₋₂).

Çizelge 4.1. *S. stricta*'nın değişik eksplantlarında ve farklı BAP ve NAA kombinasyonlarındaki B5 ortamlarında sürgün oluşum oranları.

Eksplant	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Dikilen eksplant sayısı (adet)	Ortalama sürgün sayısı / eksplant	Ortalama sürgün sayısı/ sürgün veren eksplant	Sürgün veren eksplant oranı (%)
Hipokotil	0.0	0.0	40	--	--	--
	1.0	0.0	40	--	--	--
	1.0	0.1	40	--	--	--
	1.0	0.5	40	--	--	--
	2.0	0.0	40	--	--	--
	2.0	0.1	40	--	--	--
	2.0	0.5	40	--	--	--
	3.0	0.0	40	--	--	--
	3.0	0.1	40	--	--	--
3.0	0.5	40	--	--	--	
Ortalama			40	--	--	--
Tek boğum	0.0	0.0	40	1.25 (50) ± 0.086 a*	1.25 (50)	100
	1.0	0.0	40	0 (0)	0 (0)	0
	1.0	0.1	40	4 (160) ± 0.14 b	4 (160)	100
	1.0	0.5	40	3 (120) ± 0.10 c	3 (120)	100
	2.0	0.0	40	1 (40) ± 0 a	1 (40)	100
	2.0	0.1	40	1 (40) ± 0 a	1 (40)	100
	2.0	0.5	40	4 (160) ± 0.14 b	4 (160)	100
	3.0	0.0	40	2 (80) ± 0.12 d	2 (80)	100
	3.0	0.1	40	0 (0)	0 (0)	0
3.0	0.5	40	1 (40) ± 0 a	1 (40)	100	
Ortalama			40	1.725	1.725	80
Sürgün ucu	0.0	0.0	40	--	--	--
	1.0	0.0	40	--	--	--
	1.0	0.1	40	0.5 (20) ± 0 e	1 (20)	50
	1.0	0.5	40	--	--	--
	2.0	0.0	40	--	--	--
	2.0	0.1	40	--	--	--
	2.0	0.5	40	--	--	--
	3.0	0.0	40	--	--	--
	3.0	0.1	40	--	--	--
3.0	0.5	40	--	--	--	
Ortalama			40	0.05	0.1	5
Yaprak parçaları	0.0	0.0	40	--	--	--
	1.0	0.0	40	--	--	--
	1.0	0.1	40	--	--	--
	1.0	0.5	40	--	--	--
	2.0	0.0	40	--	--	--
	2.0	0.1	40	--	--	--
	2.0	0.5	40	--	--	--
	3.0	0.0	40	--	--	--
	3.0	0.1	40	--	--	--
3.0	0.5	40	--	--	--	
Ortalama			40	--	--	--

() parantez içindeki sayılar oluşan toplam sürgün sayısını ifade etmektedir.

* Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p<0.01).

Varyans analiz sonuçları incelendiğinde hormon ve eksplant etken ve etkileşimlerinin sürgün oluşumu üzerindeki etkilerinin istatistiksel olarak önemli olduğu ($p<0.01$) görülmektedir (Bkz. Ek-1, Çizelge 1).

Çizelge 4.1 incelendiğinde farklı eksplant tiplerinin sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkileri arasındaki farkların önemli olduğu görülmektedir ($p<0.01$). Sürgün ucu eksplantlarının 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonu hariç, diğer kombinasyonlarda gelişmeye devam ettiği ancak yeni bir sürgün oluşturmadığı belirlenmiştir. 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonunda ise sürgün ucu eksplantlarının % 50'sinde eksplant başına 1 adet sürgün oluşmuştur (Şekil 4.2).

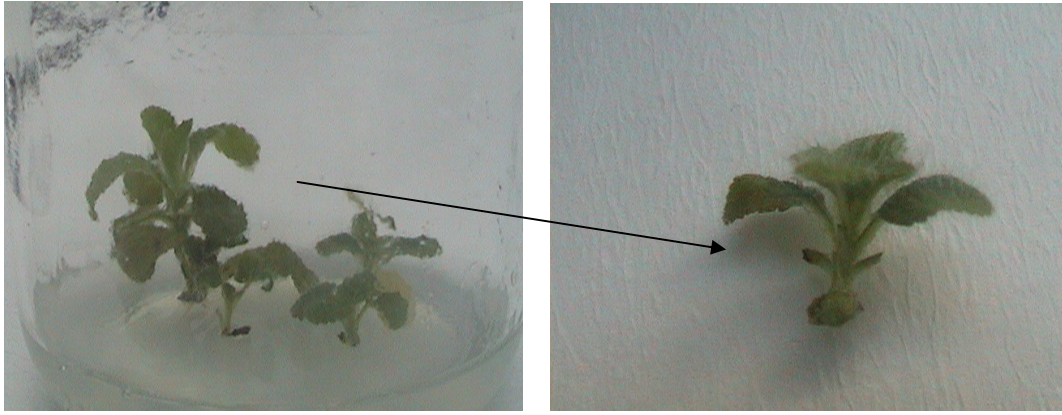
Hipokotil ve yaprak parçalarının ise B5 ortamında ve B5 ortamına ilave edilen BAP ve NAA konsantrasyonlarında sürgün oluşturmadığı belirlenmiştir. Yaprak parçalarının kahverengileştiği, hipokotillerde ise kallus oluştuğu gözlenmiştir. Şekil 4.3.a'da kahverengileşmiş yaprak parçaları, Şekil 4.3.b'de hipokotillerde kallus oluşumu görülmektedir.

Tek boğum eksplantlarının farklı BAP ve NAA kombinasyonlarında oluşturduğu sürgün sayıları incelendiğinde (Bkz. Çizelge 4.1) arasındaki farkların da önemli olduğu görülmektedir ($p<0.01$). Tek boğum eksplantlarının kullanılan tüm hormon kombinasyonlarında sürgün oluşumu bakımından en başarılı eksplant olduğu saptanmıştır. Kullanılan hormon kombinasyonlarının etkileri ile karşılaştırıldığında, 1.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerinde etkili olmadığı ve sürgün oluşturmadığı belirlenmiştir. Diğer kombinasyonlar sürgün sayısını önemli düzeyde arttırmıştır. Ancak 0.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA, 2.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA, 2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA kombinasyonlarının etkileri arasındaki farklar istatistiksel olarak benzer olduğu gibi, 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA ve 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA kombinasyonlarının etkileri arasındaki farklarda istatistiksel olarak birbiriyle benzer düzeyde olmuştur.

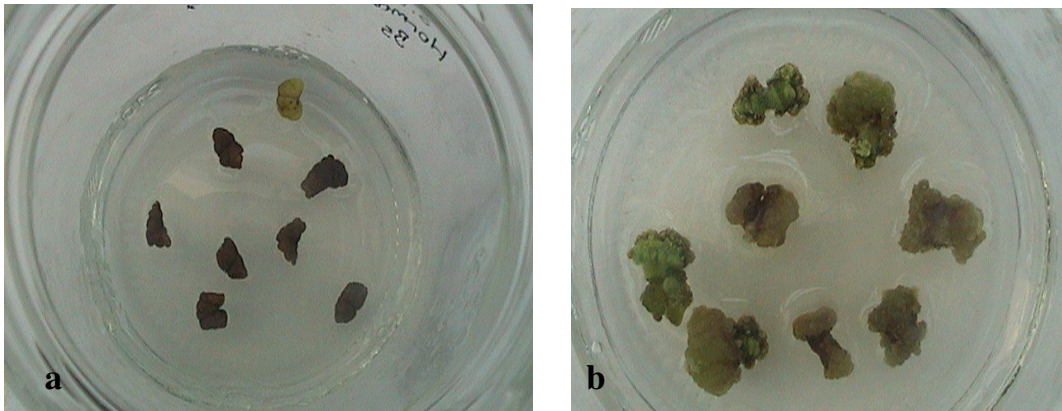
1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA veya 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA hormon kombinasyonu içeren B5 ortamlarında kültür başlangıcından 4 hafta sonra sürgün

oluşumu başlamış, eksplant başına 4 adet sürgün ve 6 hafta sonra da gelişmiş sürgünler elde edilmiştir (Şekil 4.4). Sonuç olarak sürgün oluşumu bakımından en uygun eksplantın tek boğum, en uygun ortamların ise 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA ve 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA kombinasyonlarını içeren B5 besin ortamlarının olduğu ancak iki kombinasyonun etkileri arasındaki farkın ise önemsiz olduğu belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.1)

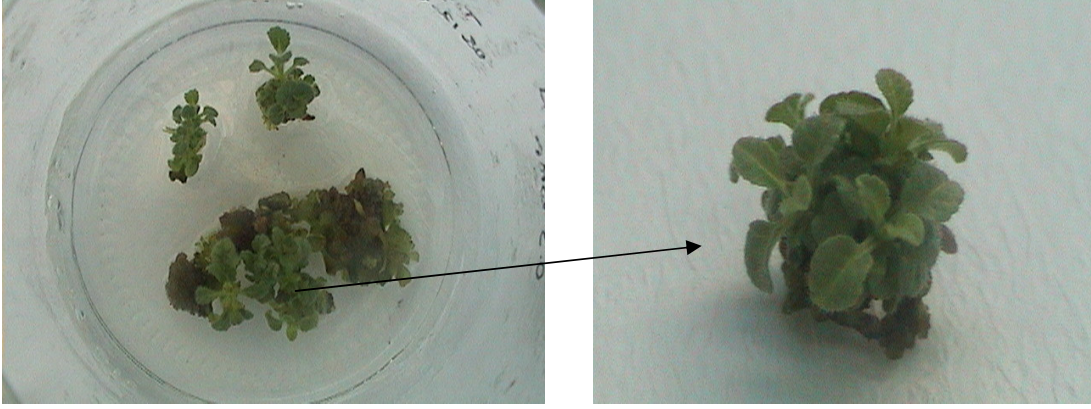
Bu nedenle sonraki mikroçoğaltım denemelerinde düşük konsantrasyonda BAP ve NAA içeren, 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonu ve tek boğum eksplantları kullanılmıştır.



Şekil 4.2. 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA içeren B5 ortamında *S. stricta* sürgün ucu eksplantlarının kültürden 4-6 hafta sonraki görünümü.



Şekil 4.3. 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren B5 ortamında kahverengileşmiş *S. stricta* yaprak parçaları (a) ve hipokotillerde oluşan kalluslar (b).



Şekil 4.4. *S. stricta* tek boğum eksplantalarından 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA içeren B5 ortamında kültürden 4-6 hafta sonra oluşan sürgünler.

4.1.3. Alt Kültür Aşaması

Mikroçoğaltım aşamasında elde edilen yeni sürgünlerin çoğaltım katsayısını belirlemek amacıyla 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 1.0 mg/l BAP, 2.0 mg/l BAP ve 3.0 mg/l BAP içeren B5 ortamları kullanılarak, bu ortam bileşimlerinin sürgün oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Belirlenen sürgün oluşum oranları Çizelge 4.2'de ve bu verilere ait varyans analiz sonuçları ise Ek-1, Çizelge 2'de verilmiştir

Çizelge 4.2. *S. stricta*'da alt kültür denemelerinde farklı hormon konsantrasyonlarında sürgün oluşum oranları.

Hormon konsantrasyonu	Dikilen eksplant sayısı (adet)	1. alt kültürde sürgün veren eksplant oranı (%)	1. alt kültürde kendi gelişen eksplant oranı (%)	2. alt kültürde sürgün veren eksplant oranı (%)	2. alt kültürde kendi gelişen eksplant oranı (%)	Ortalama sürgün sayısı/ eksplant			
						1. alt kültür	2. alt kültür	1. + 2. alt kültürler/2	3. alt kültür
1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/INAA	36	100 (36/36x100)	0 (0/36x100)	83.3 (30/36x100)	5.6 (2/36x100)	4 ± 0.39 a* (144/36)	2.11 ± 0.32 b (76/36)	3.05	Vitrifikasyon veya rozet oluşumu
1.0 mg/l BAP	36	72.2 (26/36x100)	27.8 (10/36x100)	67.7 (24/36x100)	11.1 (4/36x100)	2.33 ± 0.33 b (84/36)	1.88 ± 0.33 b (67/36)	2.11	Vitrifikasyon veya rozet oluşumu
2.0 mg/l BAP	36	75 (27/36x100)	25 (9/36x100)	83.3 (30/36x100)	16.7 (6/36x100)	1.92 ± 0.36 b (69/36)	1.61 ± 0.20 b (58/36)	1.76	Vitrifikasyon veya rozet oluşumu
3.0 mg/l BAP	36	66.7 (24/36x100)	33.3 (12/36x100)	Vitrifikasyon veya rozet oluşumu	Vitrifikasyon veya rozet oluşumu	1.28 ± 0.19 b (46/36)	Vitrifikasyon veya rozet oluşumu	0.64	Vitrifikasyon veya rozet oluşumu

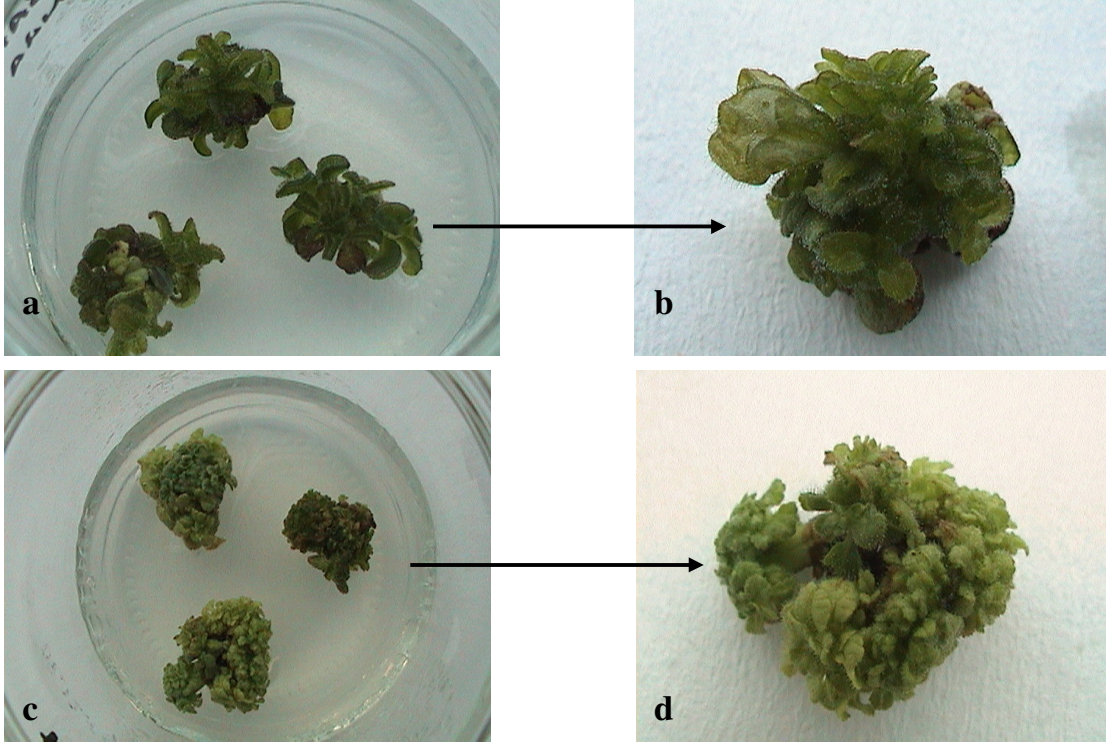
* Duncan çoklu karşılaştırma testine göre her bir alt kültür için, aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p<0.01).

1. ve 2. alt kültürlerde farklı BAP ve NAA kombinasyonlarının sürgün oluşumu üzerine etkileri arasındaki farkların önemli ($p<0.01$) olduğu tesbit edilmiştir (Bkz. Ek-1, Çizelge 2).

Çizelge 4.2 incelendiğinde 1. alt kültürde eksplant başına ortalama sürgün sayısı 1.28-4 adet arasında değiştiği ancak 1.0 mg/l BAP, 2.0 mg/l BAP ve 3.0 mg/l BAP içeren ortamlardaki sürgün sayılarının istatistiksel olarak aynı gruba girdiği belirlenmiştir.

2. alt kültürde ise 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 1.0 mg/l BAP ve 2.0 mg/l BAP içeren ortamların sürgün oluşumu üzerindeki etkilerinin aynı olduğu belirlenmiştir. 3.0 mg/l BAP dışında diğer ortam kombinasyonlarında sürgün sayısı ortalama 1.61-2.11 arasında değişmiştir. 2. alt kültürde 3.0 mg/l BAP içeren ortamda ve 3. alt kültürdeki tüm ortam kombinasyonlarında oluşan yeni sürgünlerin vitrifiye olduğu veya rozet şeklinde geliştiği gözlenmiştir. Sürgünlerdeki vitrifikasyon ve rozet oluşumları Şekil 4.5'de gösterilmiştir.

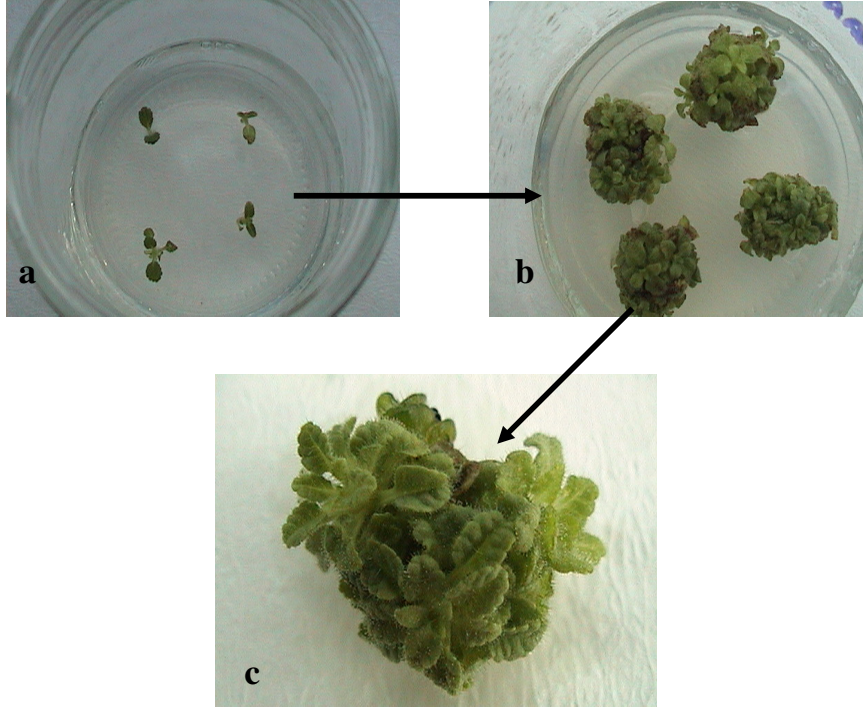
Vitrifikasyonu ve rozet oluşumunu engellemek için alt kültür ortamı olarak kullanılan ortam bileşimlerine GA_3 'ün farklı konsantrasyonları (0.1 ve 0.5 mg/l) ilave edilerek hazırlanan B5 ve 1/2 B5 ortamlarında 3. alt kültür denemeleri yeniden kurulmuştur. Ancak denenen ortam kuvvetlerinin ve GA_3 ' in vitrifikasyon ve rozet oluşumunun engellenmesinde herhangi bir etkisi olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.5. 3. alt kültürde, 3.0 mg/l BAP içeren B5 ortamında *S. stricta*'nın vitrifiye olmuş (a,b) veya rozet şeklinde gelişmiş sürgünleri (c,d).

1. ve 2. alt kültürlerde en fazla sürgün oluşumu 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonunu içeren ortamda gerçekleşmiş, bu hormon kombinasyonunun sürgün oluşumu üzerine etkisi $p < 0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. 1. alt kültürde eksplant başına ortalama 4 adet, 2. alt kültürde 2.11 adet sürgün oluşmuştur (Bkz. Çizelge 4.2). 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonunu içeren B5 ortamında 1. alt kültüre alınan sürgünler ve 4 hafta sonra bu sürgünlerden elde edilen yeni sürgünlerin fotoğrafı Şekil 4.6'da verilmiştir.

2. alt kültür sonunda 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 1.0 mg/l BAP, 2.0 mg/l BAP ve 3.0 mg/l BAP içeren ortamlardaki çoğatım katsayıları sırasıyla, $4 \times 4 \times 2.11 = 33.76$, $4 \times 2.33 \times 1.88 = 17.52$, $4 \times 1.92 \times 1.61 = 12.37$ ve $4 \times 1.28 = 5.12$ olarak hesaplanmış ve 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA içeren ortamın en başarılı ortam olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.6. 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonunu içeren B5 ortamında 1. alt kültüre alınan *S. stricta* sürgünleri (a) ve 4 hafta sonra elde edilen yeni sürgünler (b,c).

4.1.4. Sürgünlerin Köklendirilmesi ve Bitkilerin Dış Koşullara Ağıştırılması

Mikroçoğaltım aşamasından ve her alt kültürden oluşan sürgünler farklı IBA konsantrasyonlarını (0.0, 1.5, 3.0, 4.5 ve 10 mg/l) içeren B5 besin ortamlarında köklendirmeye alınmıştır. Bu ortamların kök oluşumu üzerindeki etkileri ile ilgili veriler Çizelge 4.3'de ve bu verilere ait varyans analiz sonuçları Ek-1, Çizelge 3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Mikroçoğaltım ve alt kültür aşamasından elde edilen *S. stricta* sürgünlerinin farklı IBA konsantrasyonlarını içeren B5 ortamlarındaki kök oluşum oranları.

Köklendirme ortamındaki IBA konsantrasyonları	Mikroçoğaltım aşamasından elde edilen sürgünlerin kök oluşum oranı (%)	1. alt kültür aşamasından elde edilen sürgünlerin kök oluşum oranı (%)	2. alt kültür aşamasından elde edilen sürgünlerin kök oluşum oranı (%)
Hormonsuz	2 ± 0.58 a*	3 ± 0.58 a	1 ± 0.0 a
1.5 mg/l IBA	32 ± 2.31 b	36 ± 0.0 b	28 ± 1.16 b
3.0 mg/l IBA	20 ± 1.16 c	18 ± 1.16 c	22 ± 0.0 c
4.5 mg/l IBA	38 ± 0 d	44 ± 1.16 d	32 ± 1.16 d
10 mg/l IBA	18 ± 2.31 c	22 ± 0.0 c	14 ± 0.0 c

* Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p<0.01).

Ek-1, Çizelge 3'de farklı IBA konsantrasyonlarının, *S. stricta* sürgünlerinin kök oluşum oranları üzerindeki etkisinin p<0.01 düzeyinde önemli olduğu görülmektedir.

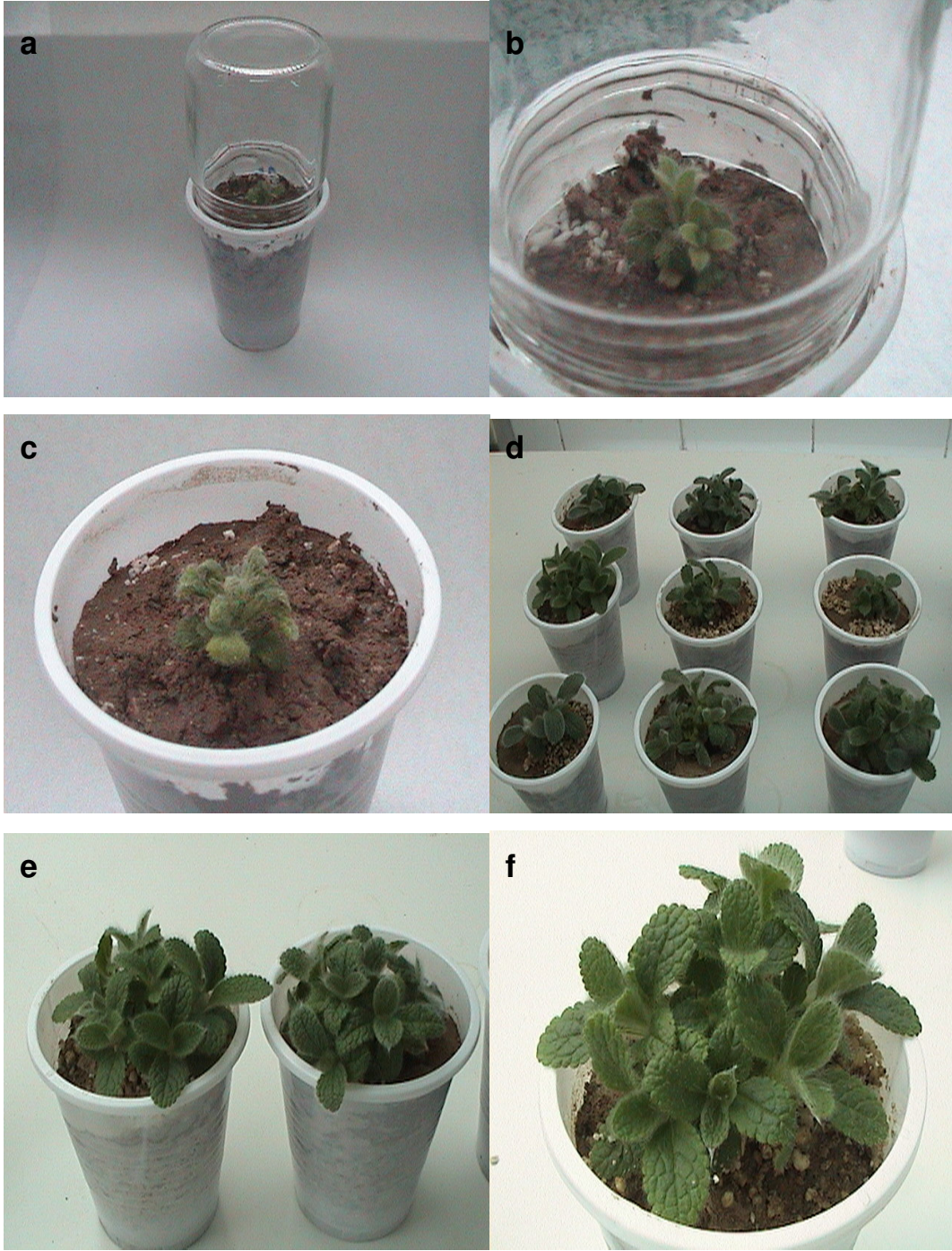
Çizelge 4.3'de mikroçoğaltım aşaması ile ilgili sonuçlar incelendiğinde 3.0 mg/l ve 10 mg/l IBA içeren ortamların kök oluşumu üzerindeki etkileri arasında önemli farklılık olmadığı belirlenmiştir. Diğer aşamalarda uygulanan farklı IBA konsantrasyonlarının kök oluşumu üzerindeki etkileri arasındaki farkların ise önemli olduğu bulunmuştur (p<0.01).

Yapılan gözlemlerde 4-6 hafta sonra en yüksek kök oluşumunun 4.5 mg/l IBA içeren ortamda gerçekleştiği görülmüştür. Bu konsantrasyonda köklenme oranı mikroçoğaltım aşamasından elde edilen sürgünler için % 38, 1. alt kültürden elde edilen sürgünler için % 44 ve 2. alt kültürden elde edilen sürgünler için % 32 olarak tesbit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.3). Ancak kök oluşum oranları açısından bu aşamalar arasındaki farklar önemsiz bulunmuştur.

Köklü fideler steril 'perlit + toprak' karışımından oluşan *ex vitro* koşullara aktarılarak dış koşullardaki gelişmeleri izlenmiştir. 4.5 mg/l IBA içeren B5 besin ortamında köklenmiş *S. stricta* fidelerinin fotoğrafları Şekil 4.7'de görülmektedir. Şekil 4.8'de *S. stricta* fidelerinin *ex vitro* koşullara alıştırılma aşamaları verilmiştir. 1 yıl süre ile yapılan gözlemlerde fidelerin canlılık oranı tüm köklendirme ortamlarında % 90 olarak belirlenmiştir. Mikroçoğaltımı yapılmış *S. stricta* bitkilerine ait fotoğraflar Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.7. 4.5 mg/l IBA içeren B5 ortamında köklenmiş *S. stricta* fideleri.



Şekil 4.8. *S. stricta* fidelerinin *ex vitro* koşullara alıştıırılma aşamaları (a-f).

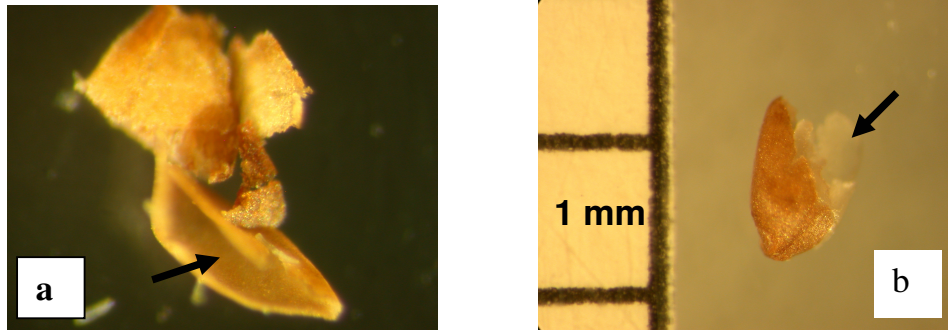


Şekil 4.9 . İklim odasındaki 4 aylık (a,b) ve 10 aylık (c,d) *S. stricta* bitkileri.

4.2. *O. minutiflorum* ile İlgili Denemelerin Sonuçları

4.2.1. Tohum Çimlendirme Aşaması

Sterilize edilen tohumlar MS ve B5 ortamlarında karanlıkta, 25 °C'de iklim odasında çimlendirilmeye bırakılmıştır. İki hafta-21 gün süreyle yapılan gözlemler sonucunda tohumlarda çimlenmenin her iki ortamda da çok düşük oranda (% 10) olduğu belirlenmiştir. Tohumlar stereomikroskop altında incelenmiş ve çoğunluğunun boş olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.10'da embriyosuz ve embriyolu *O. minutiflorum* tohumlarının stereomikroskopta çekilmiş fotoğrafları görülmektedir.



Şekil 4.10. *O. minutiflorum*'un embriyosuz (a) ve embriyolu (b) tohumları (x 63).

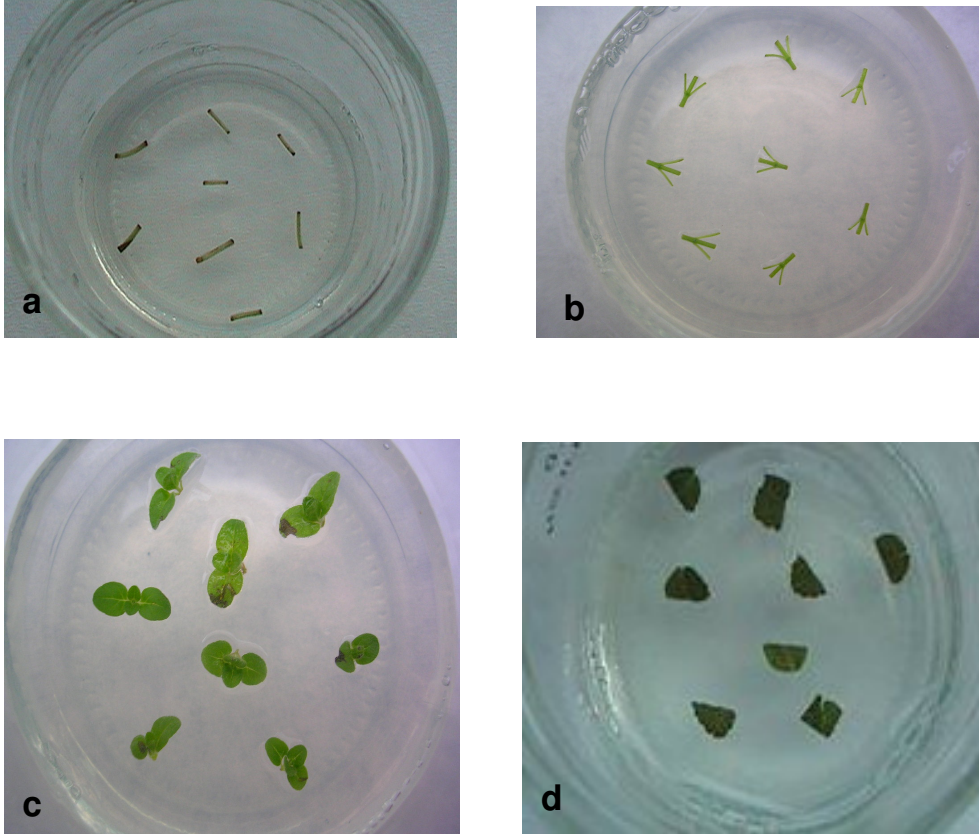
Embriyo içeren tohumlar seçilerek çimlendirme denemeleri yapıldığında ise çimlenme oranı MS ve B5 ortamlarında sırasıyla % 100 ve % 20 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle mikroçoğaltım aşamasındaki denemelerde MS ortamında çimlendirilen ve büyütülen 30-40 günlük fideler kullanılmıştır (Bkz. Şekil 3.5 b).

4.2.2. Mikroçoğaltım Aşaması

Eksplant olarak kullanılan hipokotil, tek boğum, sürgün ucu gibi gövde kısımları ve yaprak parçalarının ve farklı BAP ve NAA kombinasyonlarındaki MS ve B5 ortamlarının sürgün oluşumuna etkisi incelenmiştir. Kullanılan eksplant tipleri ile ilgili fotoğraflar Şekil 4.11'de görülmektedir. B5 ortamında kültüre alınan

eksplantlarda sürgün oluşumu gerçekleşmediğinden, aksine kararmalar ve ölümler meydana geldiğinden bu besin ortamı denemelerden çıkarılmıştır.

Değişik eksplant tiplerinin ve farklı BAP ve NAA kombinasyonlarındaki MS ortamlarının sürgün oluşumu üzerindeki etkisi ile ilgili veriler Çizelge 4.4'de, bu verilerin varyans analiz sonuçları Ek-1, Çizelge 4'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Mikroçoğaltım amacıyla *O. minutiflorum* fidelerinden alınan eksplantlar; hipokotil (a), tek boğum (b), sürgün ucu (c) ve yaprak parçaları (d).

Çizelge 4.4. *O. minutiflorum*'ün değişik eksplantlarında ve farklı BAP ve NAA kombinasyonlarındaki MS ortamlarında sürgün oluşum oranları.

Eksplant	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Dikilen eksplant sayısı (adet)	Ortalama sürgün sayısı / eksplant	Ortalama sürgün sayısı/ sürgün veren eksplant	Sürgün veren eksplant oranı (%)
Hipokotil	0.0	0.0	30	--	--	--
	1.0	0.0	30	--	--	--
	1.0	0.1	30	--	--	--
	1.0	0.5	30	--	--	--
	2.0	0.0	30	--	--	--
	2.0	0.1	30	--	--	--
	2.0	0.5	30	--	--	--
	3.0	0.0	30	--	--	--
	3.0	0.1	30	--	--	--
3.0	0.5	30	--	--	--	
Ortalama			30	--	--	--
Tek boğum	0.0	0.0	30	--	--	--
	1.0	0.0	30	--	--	--
	1.0	0.1	30	0.4 (12) ± 0.14 a*	2 (12/6)	20
	1.0	0.5	30	0.3 (9) ± 0.085 a	1 (9/9)	30
	2.0	0.0	30	--	--	--
	2.0	0.1	30	0.8 (24) ± 0.31 b	4 (24/6)	20
	2.0	0.5	30	0.3 (9) ± 0.085 a	1 (9/9)	30
	3.0	0.0	30	--	--	--
	3.0	0.1	30	0.6 (18) ± 0.18 ab	2 (18/9)	30
3.0	0.5	30	0.3 (9) ± 0.085 a	1 (9/9)	30	
Ortalama			30	0.27	1	16
Sürgün ucu	0.0	0.0	30	--	--	--
	1.0	0.0	30	--	--	--
	1.0	0.1	30	--	--	--
	1.0	0.5	30	--	--	--
	2.0	0.0	30	--	--	--
	2.0	0.1	30	--	--	--
	2.0	0.5	30	--	--	--
	3.0	0.0	30	--	--	--
	3.0	0.1	30	--	--	--
3.0	0.5	30	--	--	--	
Ortalama			30	--	--	--
Yaprak parçaları	0.0	0.0	30	--	--	--
	1.0	0.0	30	--	--	--
	1.0	0.1	30	--	--	--
	1.0	0.5	30	--	--	--
	2.0	0.0	30	--	--	--
	2.0	0.1	30	--	--	--
	2.0	0.5	30	--	--	--
	3.0	0.0	30	--	--	--
	3.0	0.1	30	--	--	--
3.0	0.5	30	--	--	--	
Ortalama			30	--	--	--

() parantez içindeki sayılar toplam sürgün sayısını ifade etmektedir.

* Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir. (p<0.01).

Varyans analiz sonuçları incelendiğinde hormon ve eksplant tipi etken ve etkileşimlerinin sürgün oluşumu üzerindeki etkilerinin istatistiksel olarak önemli olduğu ($p<0.01$) görülmektedir (Bkz. Ek-1, Çizelge 4).

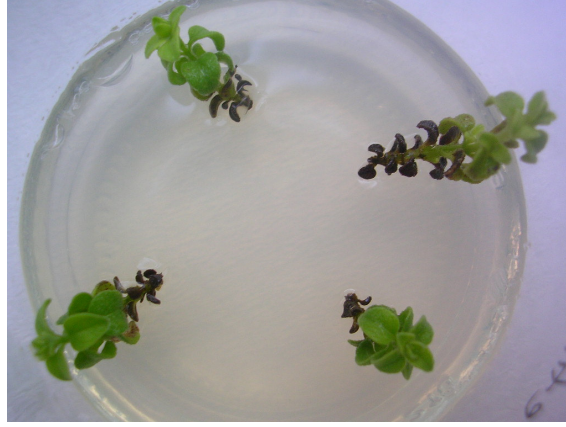
Çizelge 4.4 incelendiğinde farklı eksplant tiplerinin sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkileri arasındaki farkların önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$).

Sürgün ucu kullanıldığında dikimden 4 hafta sonra yeni sürgün oluşmadığı ancak var olan sürgünlerin geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4.12).

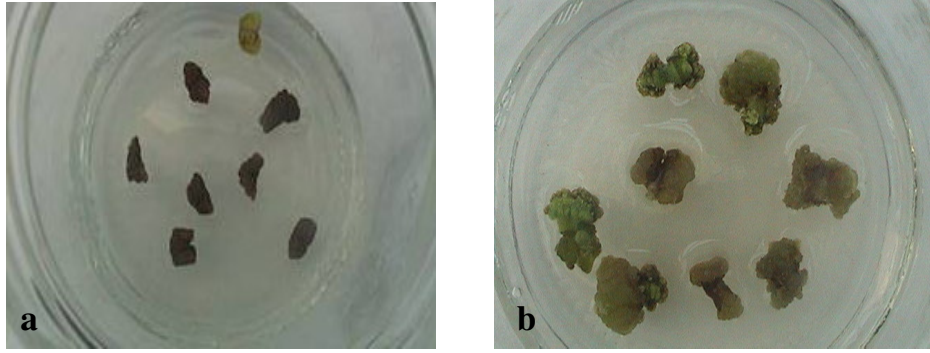
Yaprak parçaları ve hipokotil eksplantlarında yukarıda belirtilen deneme kombinasyonlarında herhangi bir gelişme olmadığı ve eksplantların büyük oranda kahverengileştiği gözlenmiştir (Şekil 4.13).

Diğer eksplantlarla karşılaştırıldığında kullanılan tüm hormon kombinasyonlarında sürgün oluşumu bakımından sadece tek boğum eksplantlarının başarılı olduğu tespit edilmiştir. Tek boğum eksplantlarının farklı BAP ve NAA kombinasyonlarında oluşturduğu sürgün sayıları incelendiğinde (Bkz. Çizelge 4.4) arasındaki farkların da önemli olduğu görülmektedir ($p<0.01$). Sürgün oluşturma etkileri bakımından kullanılan hormon kombinasyonları karşılaştırıldığında, tek boğum eksplantlarında, 2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonu içeren MS ortamında kültür başlangıcından 4 hafta sonra sürgün oluşumu başlamış, sürgün veren eksplant başına 4 adet sürgün elde edilmiştir. 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonlarını içeren MS ortamlarında ise sürgün veren eksplant başına 2 adet sürgün elde edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.4) ve oluşan sürgünlere ait fotoğraflar Şekil 4.14'de verilmiştir.

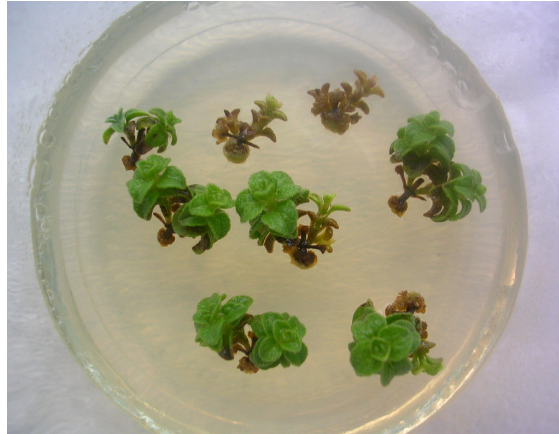
0.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA, 1.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA, 2.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA kombinasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerinde etkili olmadığı ve sürgün oluşturmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.12. 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamında *O. minutiflorum* sürgün ucu eksplantlarının kültürden 4-6 hafta sonraki görünümü.



Şekil 4.13. 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren MS besin ortamında *O. minutiflorum*'un kahverengileşmiş yaprak parçaları (a) ve hipokotillerde oluşan kalluslar (b).



Şekil 4.14. *O. minutiflorum* fidelerinden alınan tek boğum eksplantlarında, 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonu içeren MS ortamlarında kültür başlangıcından 4 hafta sonra oluşan sürgünler.

Sonuç olarak, sürgün oluşumu bakımından en uygun eksplantın tek boğum, en uygun ortamların ise 2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonlarını içeren MS besin ortamlarının olduğu belirlenmiştir. Tüm bu ortam kombinasyonları sonraki mikroçoğaltım denemelerinde kullanılmıştır.

4.2.3. Alt Kültür Aşaması

Mikroçoğaltım aşamasında elde edilen yeni sürgünlerin çoğaltım katsayısını belirlemek amacıyla 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 3.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 2.0 mg/l BAP, 3.0 mg/l BAP, 2.0 mg/l Kinetin ve 3.0 mg/l Kinetin içeren MS ortamları kullanılarak, bu ortam bileşimlerinin sürgün oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Eksplant başına oluşan sürgün sayıları Çizelge 4.5'de ve bu verilere ait varyans analiz sonuçları Ek-1, Çizelge 5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. *O. minutiflorum*'da alt kültür denemelerinde farklı hormon konsantrasyonlarında sürgün oluşum oranları.

Hormon konsantrasyonu	Dikilen eksplant sayısı (adet)	1.alt kültürde sürgün veren eksplant oranı (%)	1.alt kültürde kendi gelişen eksplant oranı (%)	2.alt kültürde sürgün veren eksplant oranı (%)	2.alt kültürde kendi gelişen eksplant oranı (%)	3.alt kültürde sürgün veren eksplant oranı (%)	3.alt kültürde kendi gelişen eksplant oranı (%)	Ortalama sürgün sayısı/ eksplant			
								1. alt kültür	2. alt kültür	3. alt kültür	1. + 2. +3 alt kültürler/3
1.0 mg/l BAP-0.1 mg/INAA	48	25 (12/48x100)	25 (12/48x100)	44 (21/48x100)	56 (27/48x100)	6.25 (3/48x100)	93.75 (45/48 x100)	0.63 ± 0.19 a* (30/48)	1.06 ± 0.23 a (51/48)	0.15 ± 0.089 a (7/48)	0.61
2.0 mg/l BAP-0.1 mg/INAA	48	75 (36/48x100)	25 (12/48x100)	56 (27/48x100)	44 (21/48x100)	25 (12/48x100)	75 (36/48x100)	4.33 ± 0.64 b (208/48)	2.13 ± 0.31 b (102/48)	0.25 ± 0.061 a (12/48)	2.24
3.0 mg/l BAP-0.1 mg/INAA	48	83 (40/48x100)	17 (8/48x100)	25 (12/48x100)	75 (36/48x100)	25 (12/48x100)	75 (36/48x100)	3.5 ± 0.49 b (172/48)	1.06 ± 0.34 a (51/48)	0.63 ± 0.16 ab (30/48)	1.73
2.0 mg/l BAP	48	65 (31/48x100)	10 (5/48x100)	73 (35/48x100)	10 (5/48x100)	58.3 (28/48x100)	41.7 (20/48x100)	3.04 ± 3.11 cb (146/48)	3.73 ± 0.64 c (179/48)	1.42 ± 0.18 b (68/48)	2.73
3.0 mg/l BAP	48	54 (26/48x100)	21 (10/48x100)	81 (28/48x100)	10 (5/48x100)	4.2 (2/48x100)	95.8 (46/48x100)	2 ± 0.38 c (96/48)	3.5 ± 0.67 cd (168/48)	0.08 ± 0.58 a (4/48)	2.1
2.0 mg/l Kinetin	48	19 (9/48x100)	56 (27/48x100)	81 (28/48x100)	15 (7/48x100)	23 (11/48x100)	77 (37/48x100)	0.5 ± 17 a (24/48)	2.17 ± 0.38 b (104/48)	0.5 ± 0.15 ab (24/48)	1.06
3.0 mg/l Kinetin	48	17 (8/48x100)	56 (27/48x100)	44 (21/48x100)	40 (19/48x100)	8.3 (4/48x100)	91.7 (44/48x100)	0.69 ± 0.25 a (33/48)	1.5 ± 0.38 ab (73/48)	0.10 ± 0.054 a (5/48)	0.76

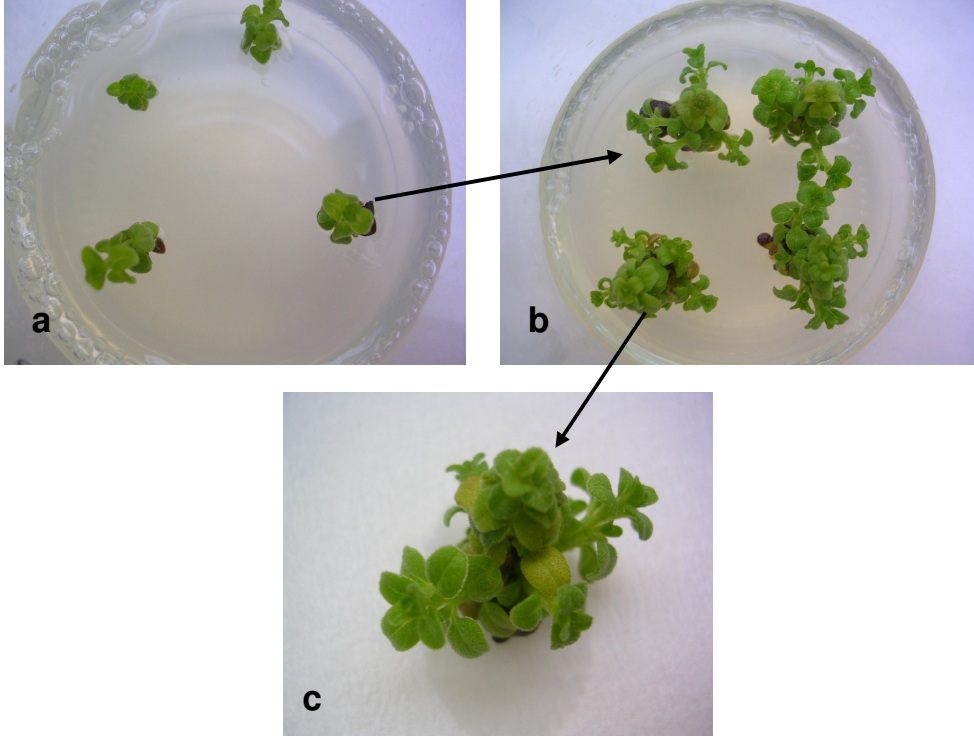
* Duncan çoklu karşılaştırma testine göre her bir alt kültür için, aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p<0.01).

Ek-1, Çizelge 5'de görüldüğü gibi BAP ve NAA'nın farklı kombinasyonlarının *O. minutiflorum* sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri arasındaki farkların her üç alt kültürde de $p<0.01$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir. Sürgün oluşumu açısından karşılaştırıldığında üç alt kültür arasındaki farkların da önemli olduğu ($p<0.01$) görülmüştür (Bkz. Çizelge 4.5).

Çizelge 4.9 incelendiğinde 1., 2. ve 3. alt kültürlerde en fazla sürgün oluşumu 2.0 mg/l BAP içeren ortamda elde edilmiş ve sürgün oluşumu üzerine etkisi $p<0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. 1. alt kültürde eksplant başına ortalama 3.04 adet, 2. alt kültürde 3.73 adet ve 3. alt kültürde 1.42 adet sürgün oluşmuştur. 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonunu içeren MS besin ortamında 1. alt kültüre alınan sürgünler ve 4 hafta sonra bunlardan elde edilen yeni sürgünlerin fotoğrafları Şekil 4.15'de verilmiştir.

Sürgün sayıları 1. alt kültürde 0.5-4.33 arasında değişirken, 2. alt kültürde 1.5-3.73 arasında, 3. alt kültürde ise 0.08-1.42 arasında değişmiştir (Bkz. Çizelge 4.5).

3. alt kültür sonunda çoğaltım katsayıları 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 2.0 mg/l BAP, 3.0 mg/l BAP, 2.0 mg/l kinetin, 3.0 mg/l kinetin içeren içeren ortamlarda çoğaltım katsayıları sırasıyla, $2.67 \times 0.63 \times 1.06 \times 0.5 = 0.89$, $2.67 \times 4.33 \times 2.13 \times 0.25 = 6.16$, $2.67 \times 3.5 \times 1.06 \times 0.63 = 6.24$, $2.67 \times 3.04 \times 3.73 \times 1.42 = 42.99$, $2.67 \times 2.0 \times 3.5 \times 0.08 = 1.50$ $2.67 \times 0.5 \times 2.17 \times 0.5 = 1.45$ ve $2.67 \times 0.69 \times 1.5 \times 0.10 = 0.28$ olarak hesaplanmış ve 2.0 mg/l BAP içeren ortamın en başarılı ortam olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.15. 2.0 mg/l BAP içeren MS ortamında 1. alt kültüre alınan *O. minutiflorum* sürgünleri (a) ve 4 hafta sonra elde edilen yeni sürgünler (b,c).

4.2.4. Sürgünlerin Köklendirilmesi ve Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması

Mikroçoğaltım aşamasından ve her alt kültürden oluşan sürgünler farklı IBA konsantrasyonlarını (0.0, 1.5, 3.0, 4.5 ve 10 mg/l) içeren MS besin ortamlarında köklendirmeye alınmıştır. Bu ortamların kök oluşumu üzerine etkileri ile ilgili veriler Çizelge 4.6'da ve bu veriler ait varyans analiz sonuçları Ek-1, Çizelge 6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Mikroçoğaltım ve alt kültür aşamalarından elde edilen *O. minutiflorum* sürgünlerinin farklı IBA konsantrasyonlarını içeren MS ortamlarındaki kök oluşum oranları.

Köklendirme ortamındaki IBA konsantrasyonları	Mikroçoğaltım aşamasından elde edilen sürgünlerin kök oluşum oranı (%)	1. alt kültür aşamasından elde edilen sürgünlerin kök oluşum oranı (%)	2. alt kültür aşamasından elde edilen sürgünlerin kök oluşum oranı (%)	3. alt kültür aşamasından elde edilen sürgünlerin kök oluşum oranı (%)
Hormonsuz	80 ± 1.16 a*	75 ± 0.58 a	84 ± 2.31 a	76 ± 0.0 a
1.5 mg/l IBA	53 ± 0.0 b	45 ± 2.89 b	40 ± 1.16 b	50 ± 1.16 b
3.0 mg/l IBA	87 ± 1.73 c	94 ± 0.0 c	85 ± 0.0 ac	90 ± 1.16 c
4.5 mg/l IBA	40 ± 1.16 d	36 ± 2.31 d	42 ± 1.16 b	38 ± 1.16 d
10 mg/l IBA	17 ± 0.58 e	15 ± 0.0 e	10 ± 1.76 e	12 ± 0.0 e

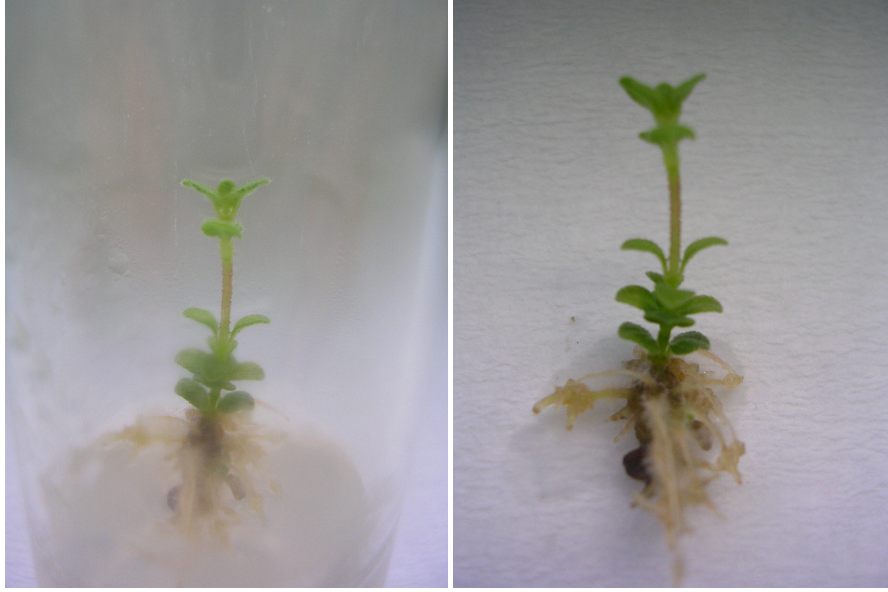
* Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p<0.01).

Ek-1, Çizelge 6'da görüldüğü gibi farklı IBA konsantrasyonlarının *O. minutiflorum* sürgünlerinin kök oluşum oranları üzerindeki etkisi p<0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur.

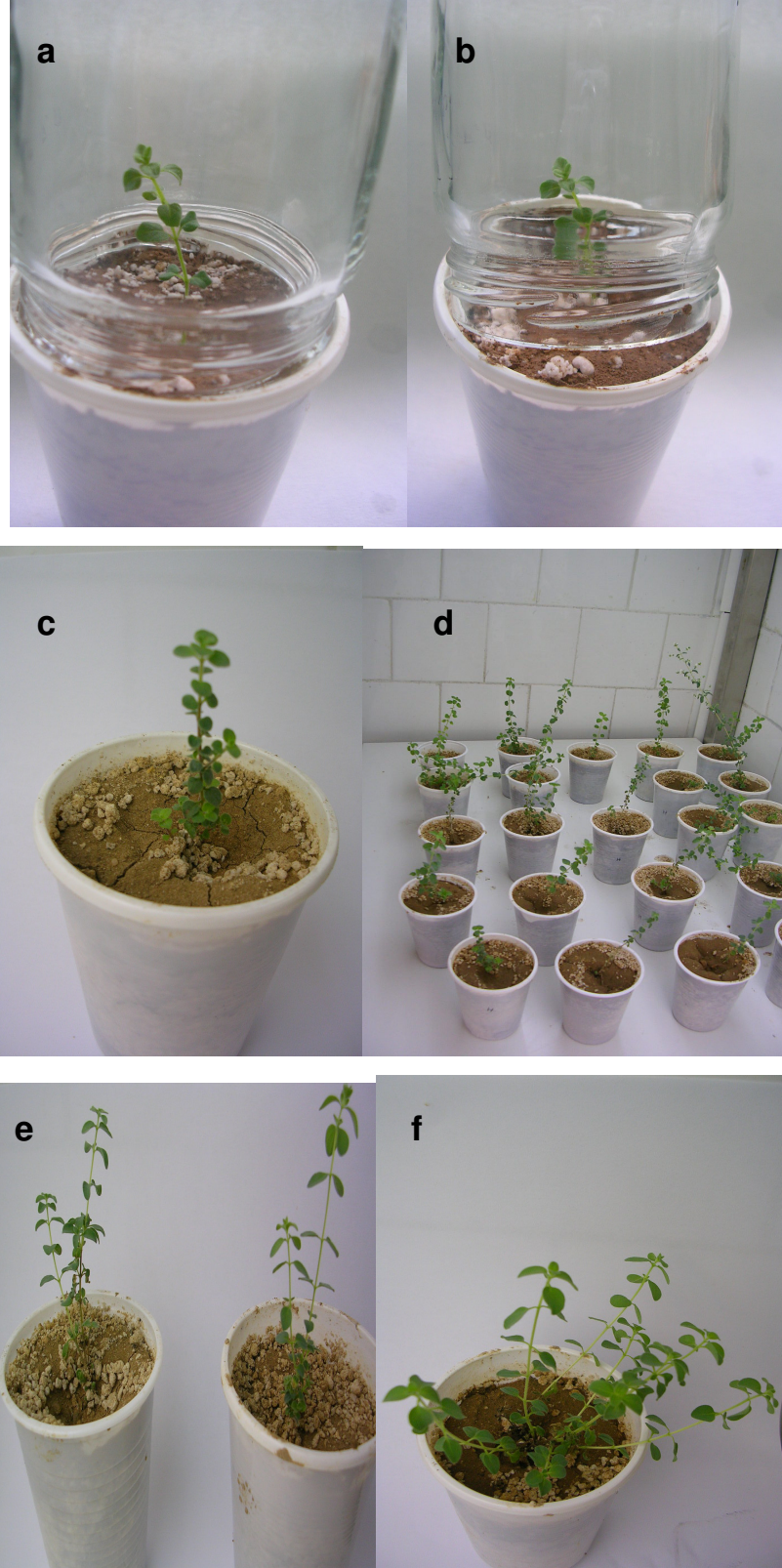
Çizelge 4.6'da 2. alt kültür aşamasındaki kök oluşum oranları incelendiğinde hormon içermeyen köklendirme ortamı ile 3.0 mg/l IBA içeren köklendirme ortamının kök oluşumu üzerindeki etkilerinin benzer olduğu görülmektedir. Diğer yandan diğer aşamalarda uygulanan farklı IBA konsantrasyonlarının kök oluşumu üzerindeki etkileri arasındaki farkların da önemli olduğu bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.6). Ancak kök oluşum oranları bakımından bu aşamalar arasındaki farklar çoğunlukla önemsiz bulunmuştur.

En yüksek kök oluşumu 3.0 mg/l IBA içeren ortamda sağlanmıştır. Bu ortamda kök oluşum oranları mikroçoğaltım aşamasından elde edilen sürgünler için % 87, 1. alt kültür aşamasından elde edilen sürgünler için % 94, 2. alt kültür aşamasından elde edilen sürgünler için % 85 ve 3. alt kültür aşamasından elde edilen sürgünler için % 90 olarak tesbit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.6).

Köklü fideler steril 'perlit + toprak' karışımından oluşan *ex vitro* koşullara aktarılarak dış koşullardaki gelişmeler izlenmiştir. Şekil 4.16'da 3.0 mg/l IBA içeren MS ortamında köklenmiş *O. minutiflorum* fideleri görülmektedir. Şekil 4.17'de *O. minutiflorum* fidelerinin *ex vitro* koşullara alıştırılma aşamaları verilmiştir. 3 ay süre ile yapılan gözlemlerde fidelerin canlılık oranları 0.0, 1.5, 3.0, 4.5 ve 10 mg/l IBA içeren tüm köklendirme ortamlarında sırasıyla % 45, % 70, % 58 ve % 96 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.16. 3.0 mg/l IBA içeren MS besin ortamında köklenmiş *O. minutiflorum* fideleri.



Şekil 4.17. *O. minutiflorum* fidelerinin *ex vitro* koşullara alıştıırılma aşamaları (a-f).

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, *S. stricta* ve *O. minutiflorum*'ün mikroçoğaltımına olanak sağlayacak optimal koşullar belirlenmiştir. İki türün tohumları *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş ve fideler elde edilmiştir. Bu fidelerden alınan yaprak parçaları ve gövde eksplantları (hipokotil, tek boğum ve sürgün ucu) farklı bitki büyüme düzenleyicileri olarak BAP (0.0, 1.0, 2.0 ve 3.0 mg/l) ve NAA (0.0, 0.1 ve 0.5 mg/l) kombinasyonlarını içeren MS ve B5 ortamlarında kültüre alınmıştır. Elde edilen sürgünlerin alt kültür denemelerinde BAP (0.0, 1.0, 2.0 ve 3.0 mg/l) ve NAA (0.1 mg/l) kombinasyonlarını ve ayrı ayrı kinetin (2.0 ve 3.0 mg/l) ve BAP (2.0 ve 3.0 mg/l) içeren MS ve B5 ortamları kullanılmış ve farklı hormon kombinasyonlarını içeren değişik besin ortamları ve eksplant tiplerinin sürgün oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Fidelerin köklendirilmesi için ise 0.0, 1.5, 3.0, 4.5 ve 10 mg/l IBA içeren besin ortamları kullanılmış ve kök oluşumu üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Böylece her iki türün doku kültürü koşullarında rejenerasyonu için en uygun eksplant tipi, ortam, hormon kombinasyonu, alt kültür sayısı ve çoğaltım katsayısı ortaya konmuş ve köklenen bitkicikler başarıyla dış koşullara alıştırılmıştır.

Çalışmamızda *O. minutiflorum* tohumlarının çimlenme oranı MS besin ortamında % 100, B5 besin ortamında ise % 20 olarak tesbit edilmiştir (Bkz. Bölüm 4.2.1). Benzer olarak, Cellároá (1992) *Mentha*'nın, Arrebola ve Socorro (1997) *Satureja obovata*'nın, Erdağ ve Yürekli, (2000) *Thymus sipyleus* tohumlarını MS besin ortamında, Kumari ve Saradhi (1992) ise *Origanum vulgare* tohumlarını B5 besin ortamında çimlendirmeyi başarmışlardır.

Denemelerimizde *S. stricta* tohumları ne MS ne de B5 ortamında çimlenmemiş ve çimlenme problemi ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, tohumları çimlendirmek amacı ile farklı metotlar uygulanmıştır (Bkz. Bölüm 4.1.1). *Sideritis* cinsine ait farklı türlerin çimlenme problemi olduğu ve bunun tohum testasının sert olmasından kaynaklandığı bildirilmektedir (Martin, 2003).

Tohum çimlenmesi bitki yaşamının en önemli evrelerinden biri olup (Ghoulam and Fares, 2001), yalnızca genotipik karakterler (dormansi, integüment kalınlığı,

testanın sert olması gibi) tarafından değil aynı zamanda çevresel koşullar tarafından da kontrol edilebilmektedir (Sy et al., 2001). Tohum dormansisini kırmak amacıyla değişik uygulamalar yapılmaktadır. Değişik kimyasallar (Kinetin, GA₃ gibi büyüme düzenleyicileri, potasyum nitrat (KNO₃), polietilen glikol (PEG)) kullanılmakta, yüksek sıcaklık veya düşük sıcaklık uygulaması ve mekaniksel uygulama gibi yollar izlenmektedir (Bewley and Black, 1982).

Çalışmamızda tohum çimlendirmesi için uygulanan metotlar içinde tohum kabuğunun 0 numara su zımparası ile zımparalanarak inceltilmesi durumunda da tohumlarda çimlenme gerçekleşmemiştir. Bu bulgunun aksine Martin (2003), *Sideritis* cinsine ait farklı türlerin tohum testasının 0 numara su zımparası ile zımparalanmasının, tohum yüzeyini incelterek % 90 oranında *in vivo* koşullarda çimlenmesini sağladığını belirtmiştir. Ancak, çalışmamızda bu uygulamanın *S. stricta* türü için tohum yüzeyini inceltmede yetersiz kaldığı belirlenmiştir.

Tohum kabuğundan kaynaklanan dormanside, tohum kabuğunun tamamen çıkarılması gerekmeden tohum kabuğuna yapılan fiziksel ve kimyasal uygulamalar (tohum yüzeyinin inceltilmesi, kısmen uzaklaştırılması, perforasyon, mekaniksel skarifikasyon, soğuklama, ısıtma, radyasyon, basınç, tohuma konsantre sülfirik asit veya etanol uygulanması) embriyonun çimlenmesini sağlayabilir. Tohum kabuğundan kaynaklanan dormanside tohum kabuğu embriyo için gerekli su alımını, gaz alışverişini engelleyebilir, inhibitör maddeler içerebilir, embriyodaki inhibitörlerin çıkışında bariyer olarak yer alabilir, embriyoya ışık ulaşımını engelleyebilir, mekaniksel direnç gösterebilir (Bewley and Black, 1982).

Çalışmamızda *S. stricta* tohumlarının + 4-5 °C'de 24 saat bekletildikten sonra kültüre alınması sonucunda ne *in vitro* ne de *in vivo* koşullarda çimlenme gözlenmemiştir (Bkz. Bölüm 4.1.1). Bunun sebebinin çalışmada uygulanan + 4-5 °C'de 24 saat düşük sıcaklık uygulamasının, hem süre hem de miktar olarak yetersiz kalmasından kaynaklanmış olabilir. Nitekim düşük sıcaklık uygulamasının 1-15 °C'ler arasında olduğu ve süresinin bitki türüne göre değiştiği Bewley ve Black (1982) tarafından da bildirilmiştir.

Bu araştırmada, *S. stricta* tohumlarını kaynamış su (100 °C) ile muamele etmekte ne *in vitro* ne de *in vivo* koşullarda çimlenmeyi sağlayamamıştır (Bkz. Bölüm 4.1.1). Tohumların kaynamış suda bekletilmesinin tohum kabuğunun strofiol kısmının suya geğirgen hale gelmesini sağladığı bildirilmektedir (Bewley and Black, 1982). Ancak, çalışmamızda bu uygulamanın tohum kabuğundan kaynaklanan dormansinin ortadan kaldırılmasında yetersiz kaldığı görülmektedir.

GA₃'in tohum dormansisinin ortadan kaldırılmasında önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Bewley and Black, 1982). GA₃ embriyo dormansisinin ortadan kaldırılmasında rol oynadığı gibi embriyoda yer alan yedek maddelerin hareketinde ve aynı zamanda perikarpın kırılmasından sorumlu olan kotiledon genişlemesinde de etkilidir (Bradbeer, 1988). Literatürde GA₃'in çimlenmeyi stimüle edici etkisinin tohumda enzim sentezini ve ribonükleaz aktivitesinin aktivasyonunu uyararak sağladığı bildirilmektedir (Shepley and Chang, 1972).

Bu araştırmada, *S. stricta* tohumlarına 24 saat süreyle 25×10^{-2} M GA₃ çözeltilisi uygulanması *in vitro* koşullarda MS ortamında % 10, B5 ortamında % 25 oranında, *in vivo* koşullarda ise % 10 gibi düşük oranda çimlenmeye neden olmuştur. Bu araştırma sonuçları aşağıda verilen literatür bilgileri ile örtüşmektedir. GA₃'in bildirilen etkisinin tersine, Arrebola ve Socorro (1997)'nin adaçayının (*Satureja obovata*) mikroçoğaltımını araştırdıkları çalışmalarında, tohumların 0.57 mM GA₃ ile muamele edilmesiyle, embriyo dormansisi ortadan kaldırılmış ancak GA₃ uygulaması kontrole göre *in vitro* koşullarda çimlenme oranında önemli etki yapmamıştır. Başka bir çalışmada (Garcia-Granados et al., 1994) *Sideritis foetens* tohumlarına 0.57 mM GA₃ uygulanmasının çimlenme üzerinde etkili olmadığı, % 80 oranında çimlenmenin GA₃ uygulaması yapılmayan tohumlarda gerçekleştiği bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada da (Socorro et al., 1998) *in vitro* koşullarda bitkilerin çoğaltımı için, *O. bastetanum* tohumlarının çimlenme oranını arttırmak amacıyla tohumlar farklı sürelerde 0.57 mM GA₃ ile muamele edilmiş ancak en yüksek çimlenme (% 95) GA₃ uygulaması yapılmayan tohumlarda gerçekleşmiştir.

Bu çalışmada tohumların testasının bir bistüri yardımıyla çıkarılarak geri kalan endosperm ve embriyo kısmının MS ve B5 besin ortamlarında kültüre alınmasından iki hafta sonra MS besin ortamında % 20, B5 besin ortamında ise %

100 çimlenme sağlanmıştır (Bkz. Bölüm 4.1.1). Böylece *S. stricta* tohumlarının sert ve musilajsız olan testasının su alınımını engelleyerek tohum çimlenmesini inhibe etmesi problemi, tohumların testalarının çıkarılması ile ortadan kaldırılmış ve çimlenmenin gerçekleşmesi sağlanmıştır.

Bu araştırmada, farklı eksplant tiplerinin (hipokotil, tek boğum, sürgün ucu ve yaprak parçaları) ve değişik hormon (BAP ve NAA) kombinasyonlarındaki farklı besin ortamlarının (MS ve B5) sürgün oluşumuna etkisi incelendiğinde her iki tür içinde BAP ve NAA'nın farklı kombinasyonlarını içeren MS ve B5 besin ortamlarının ve eksplant etken ve etkileşimlerinin sürgün oluşumu üzerinde önemli etki yaptığı belirlenmiştir (*S. stricta* için, Bkz. Çizelge 4.1 ve Ek-1, Çizelge 1; *O. minutiflorum* için, Bkz. Çizelge 4.4 ve Ek-1, Çizelge 4).

S. stricta ve *O. minutiflorum* için kullanılan diğer eksplantlarla (hipokotil, sürgün ucu ve yaprak parçaları) karşılaştırıldığında tek boğum eksplantlarının kullanılan tüm hormon kombinasyonlarında sürgün oluşumu bakımından en başarılı eksplant olduğu saptanmıştır (*S. stricta* için, Bkz. Çizelge 4.1; *O. minutiflorum* için, Bkz. Çizelge 4.4).

Mikroçoğaltım aşamalarının başarıyla tamamlanması için uygun eksplant seçimi önemli ve temel faktörlerden biridir. *In vitro* sürgün oluşumu kullanılan eksplant tipine bağlı olarak değişmektedir (Gupta and Conger, 1998; Zobayed and Saxena, 2003; Ayan et al., 2005). Çalışmamızda kullanılan eksplant tiplerine benzer olarak değişik türlerin mikroçoğaltımında farklı eksplant tiplerinin kullanıldığı ve sürgün oluşumu üzerinde farklı etkilere sahip olduğu bir çok araştırmacı tarafından da rapor edilmiştir. Kumari ve Saradhi (1992), *O. vulgare*'nin kallus kültüründen bitki rejenerasyonunu ve hızlı çoğaltımını araştırdıkları çalışmalarında kotiledon, hipokotil ve kök segmentlerini eksplant olarak kullanmışlardır. Nanenin (*Mentha* sp.) doku kültürü ile çoğaltılma olanaklarının araştırıldığı çalışmalarda (Ćellárová, 1992; Ellialtıoğlu vd., 1998) sürgün ucu ve tek boğumları kullanılmıştır. Erzen-Vodenik ve Baricevic (1996) *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis*, *Hypericum perforatum*'un doku kültürü ile çoğaltılmasında sürgün uçlarını, Yürekli ve Baba (1995) *Thymus sipyleus*, *Sideritis sipylea*'de yaprak sapı, yaprak parçaları, tek boğum ve sürgün uçlarını, Arrebola ve Socorro (1997)

mikroçoğaltımında tek boğumları eksplant olarak kullanmışlardır. Sajina vd. (1997) *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*'nin *in vitro* olarak çimlendirilmiş fidelerinden alınan sürgün ucu ve tek boğum eksplantlarını, Faria vd (1998) *Sideritis angustifolia* yapraklarından elde edilen protoplastları kullanarak bu türlerin mikroçoğaltımı için gerekli koşulları optimize etmişlerdir. *Origanum majorana*'da *in vitro* koşullarda yürütülen çalışmada tek boğum eksplantlarından çok sayıda sürgünler elde edilmiştir (Iyer and Pai, 1998; 2000). Minas (2001) *Origanum dictamnus*'ün ve Goleniowski vd. (2003) *Origanum vulgare x appeli*'nin *in vitro* koşullarda çoğaltılmasında apikal meristemleri kullanmışlardır. Tepe vd. (2002) *Mentha longifolia*'nın tek boğum ve sürgün ucu eksplantlarını kullanmışlardır. Bizim bulgularımızla da benzer olarak diğer çalışma sonuçları, genellikle tek boğum eksplantlarının kullanılmasının sürgün oluşumu üzerinde önemli etki yaptığını ve birçok bitki türünün mikroçoğaltımında başarıyla kullanıldığını göstermektedir.

Çalışmamızda *S. stricta* için sürgün oluşumu bakımından en başarılı hormon kombinasyonu ve ortamın 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA ve 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA kombinasyonlarını içeren B5 besin ortamlarının olduğu (Bkz. Çizelge 4.1), *O. minutiflorum* için ise 2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonlarını içeren MS besin ortamlarının olduğu (Bkz. Çizelge 4.4) belirlenmiştir.

O. minutiflorum için 1., 2. ve 3. alt kültürlerde en fazla sürgün oluşumu 2.0 mg/l BAP içeren ortamda gerçekleşmiş ve 3 alt kültürde sırasıyla eksplant başına ortalama 3.04, 3.73 ve 1.42 adet sürgün oluşmuştur (Bkz. Çizelge 4.5). 3. alt kültür sonunda çoğaltım katsayısı 19.32 olarak tespit edilmiştir.

S. stricta için, 1. ve 2. alt kültürlerde en fazla sürgün oluşumu 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonunu içeren ortamda gerçekleşmiş 2 alt kültürde sırasıyla eksplant başına ortalama 4 ve 2.11 adet sürgün oluşmuştur (Bkz. Çizelge 4.2). 2. alt kültür sonunda da çoğaltım katsayısı 33.76 olarak belirlenmiştir. 2. alt kültürde 3.0 mg/l BAP içeren ortamda ve 3. alt kültürde tüm ortam kombinasyonlarında oluşan yeni sürgünler vitrifiye olmuş veya rozet şeklinde gelişmiştir (Bkz. Şekil 4.5).

Mikroçoğaltım çalışmalarında genel olarak bitki türleri için kullanılan besin ortamları benzer maddeleri içermektedir. Bunlar, inorganik maddeler (makro ve mikro elementler), organik maddeler (myo-inositol, tiamin-HCl, adenin sülfat, pridoksin-HCl, nikotinik asit), bitki büyüme düzenleyicileri (sitokininler, oksinler, gibberellinler) ve şeker, agar gibi diğer maddelerdir. Fakat, kültür amacına ve bitki özelliğine bağlı olarak ortam bileşimi ve konsantrasyonlarında değişiklik olabilmektedir. MS ortamının birçok bitki için hem kültür başlangıcında hem de sürgün çoğaltımında kullanılması ve iyi sonuçlar elde edilmesine karşın, bu ortamdaki tuzların oranı bazı bitkiler için toksik etki yapmakta ya da fazla gelmektedir (Werbrouck and Debergh, 1994).

Benzer şekilde çalışmamızda *O. minutiflorum* türü için hem kültür başlangıcında hemde sürgün çoğaltımında da MS ortamı başarılı sonuçlar vermiştir (Bkz. Bölüm 4.2.2.). Ancak *S. stricta* türü için kültür başlangıcında ve sürgün oluşumu üzerinde MS besin ortamının etkisi olumsuz olmuştur (Bkz. Bölüm 4.1.2.). Bunun nedeni bu ortamdaki tuzların oranının bu tür için toksik etki yapması olabilir. Çünkü *S. stricta* türünde daha kuvvetli bir ortam olan B5 ortamı kullanılması hem kültür başlangıcında hem de sürgün çoğaltımında olumlu etki yapmıştır. Bu sonuç muhtemelen B5'e göre daha zayıf bir ortam olan MS ortamındaki tuzların oranının bu tür için fazla gelmediğini ancak yetersiz kaldığını düşündürmektedir.

Bitki dokularından organ farklılaşmasında oksin ve sitokininler önemli rol oynamaktadır. Bilindiği gibi sitokinin/oksin oranının yüksek olması sürgün oluşumunu, oksin/sitokinin oranının yüksek olması kök oluşumunu, oksin ve sitokinin oranlarının eşit olması ise kallus oluşumunu desteklemektedir (Werbrouck and Debergh, 1994). BAP çok sık kullanılan ve genellikle olumlu sonuçlar veren bir sitokininidir. Genel olarak 1.0-2.0 mg/l sitokinin çoğu sistemde yeterlidir. Yüksek düzeyler, adventif sürgün oluşumunu artırma eğilimindedir. IAA ortamda çok az stabil olduğundan, sentetik oksinlerden NAA tercih edilmektedir. Bunların sürgün çoğaltım aşamasında kullanılan oranları 0.1-1.0 mg/l'dir (Skoog and Miller, 1957; Werbrouck and Debergh, 1994). Doku kültürü çalışmalarında kullanılan oksin ve sitokinin etkileri, üzerinde çalışılan türlere göre değişmektedir. Mikroçoğaltımda, aksiller dallanmayla sürgün çoğalmasının artırılması uygun konsantrasyonda ve

tipte sitokinin içeren (oksinli ya da oksinsiz) besin ortamlarında sağlanmaktadır (Bhojwani and Razdan, 1983).

Bu araştırma sonuçlarına benzer olarak BAP'in, birçok bitki türü için sürgün oluşumu üzerinde en etkin hormon olduğu ve sürgün oluşumunu indüklemek için NAA ile birlikte de kullanılabileceği bir çok araştırmacı tarafından da bildirilmektedir (Ćellárová, 1992; Kumari and Saradhi, 1992; Garcia-Granados et al., 1994; Sajina et al., 1997; Ellialtıoğlu vd., 1998; Iyer and Pai, 1998; 2000; Tepe vd., 2002; Arafah et al, 2003; Özkum and Tıprıdamaz, 2004; Tisserat ve Vaughn, 2004). BAP'in protein sentezini ve enzim aktivitesini artırarak adventif sürgün oluşumunu sağladığı Lòpez-Escamilla vd. (2000) tarafından rapor edilmiştir.

Yaptığımız çalışmada her iki türde de eksplant başına en fazla sürgün oluşumu yüksek BAP konsantrasyonlarında (1.0, 2.0 ve 3.0 mg/l) ve düşük NAA konsantrasyonunda (0.1 mg/l) elde edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.4). Benzer olarak, Miachir vd. (2004) mikroçoğaltımın BAP bağımlı olduğunu ve yüksek NAA konsantrasyonlarında sürgün oluşumunun engellendiğini ancak, BAP'in düşük NAA konsantrasyonları ile birlikte kullanılmasının sürgün oluşumunu arttırdığını bildirmişlerdir.

Değişik türler ile yapılan pek çok araştırmalarda da, tek başına BAP veya farklı BAP, NAA kombinasyonlarını içeren MS ve B5 besin ortamlarının ve değişik eksplantların sürgün oluşumu üzerindeki etkileri gösterilmiştir;

Ćellárová (1992) ve Ellialtıoğlu vd. (1998) *Mentha* sp. mikroçoğaltımı için sürgün ucu ve tek boğumları eksplant olarak kullanılmışlar ve 30 g/l sukroz ve 2.0 mg/l BAP içeren MS ortamının etkin bir sürgün rejenerasyonu için uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Yürekli ve Baba (1995) bazı endemik türler ile yaptıkları çalışmada sürgün oluşumu ve köklenmenin 0.4 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BA içeren MS besin ortamında gerçekteğiğini belirlemişlerdir.

Arrebola ve Socorro (1997) Adaçayının (*Satureja obovata*) mikroçoğaltımı için *in vitro* ve *in vivo* koşullarda yetiştirilen bitkilerden alınan tek boğum eksplantlarından optimum sürgün rejenerasyonu 2.22 mM BA içeren ortamda elde etmişlerdir.

Origanum majorana'da *in vitro* koşullarda yürütülen çalışmada 2.0 mg/l BA içeren MS ortamında tek boğum eksplantlarından çok sayıda sürgünler elde edilmiştir (Iyer and Pai, 1998). Sürgünler 0.2 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendirilmiş, bitkicikler güçlendirilip toprağa aktarılmış ve yaşama oranı yaklaşık % 50 olarak belirlenmiştir. *O. majorana*'da yapılan bir başka *in vitro* rejenerasyonu çalışmasında (Iyer and Pai, 2000), bitkinin tek boğum eksplantlarından ve kallustan bitki rejenerasyonu sağlanmıştır. 2.0 mg/l BA ve karbon kaynağı olarak maltoz içeren MS ortamında kültüre alınan tek boğum eksplantları 40 kadar sürgün vermiştir.

Socorro ve ark. (1998) *Origanum bastetanum*'dan *in vitro* koşullarda elde ettikleri bitkilerinden alınan tek boğum eksplantlarınının 8 g/l agar ve 0.22 µM BA içeren MS ortamında çoğaltımını sağlamışlardır.

Erdağ ve Yürekli (2000), *Thymus siphyleus*un mikroçoğaltımında sürgün rejenerasyonu için 0.4 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BA içeren MS ortamı kullanmışlar ve bu ortamın sürgün oluşumu üzerinde önemli etki yaptığını bildirmişlerdir.

Polygonum microcephalum'un tek boğum eksplantları, 3 mg/l BAP ve 0.1 mg/l IAA kombinasyonu içeren MS ortamında kültüre alındığında sürgün rejenerasyonu ve çoğaltımı sağlanmıştır (Jhumur and Handique, 2002).

Sarker vd. (2002) *Paederia foetida* L.'nin tek boğum eksplantlarından elde edilen sürgünlerden kinetin, BAP ve IBA'nın sırasıyla 1.5, 1.0 ve 1.5 mg/l olacak şekilde kombinasyonunu içeren MS ortamında bitki oluşumu sağlanmıştır. NAA veya BAP'ın 0.5-3.0 mg/l konsantrasyonları da bitki oluşumunu sağlamış ancak kinetin, BAP ve IBA kombinasyonunun bitki oluşumu üzerindeki etkisinin daha iyi olduğu bulunmuştur. 0.5-5.0 mg/l BAP çoklu sürgün oluşumunu uyarmış ve sürgün gelişimini arttırmıştır.

Goleniowski vd. (2003) *Origanum vulgare x appeli*'nin meristem kültürü ile mikroçoğaltımını araştırdıkları çalışmada 0.28 µM BA ve 0.5 µM NAA hormon kombinasyonunu içeren MS ortamı sürgün oluşumu üzerinde en etkin ortam bileşimi olduğunu belirlemişlerdir. Eksplant başına ortalama 22.2 adet sürgün elde edilmiştir.

Perica (2003) *Centaurea rupestris*'de en yüksek çoğaltım katsayısını eksplant başına 11.88 sürgün olarak 1 µM BAP ve 2.9 µM 2-4-D içeren MS besin ortamında 3. alt kültürde elde etmiştir.

Sophora flavescens'in *in vitro* koşullarda çoğaltımında tek boğum eksplantları farklı konsantrasyonlardaki (2.27 ve 4.54 µM) TDZ, (4.44 ve 8.88 µM) BA ve (1.07 ve 2.69 µM) NAA kombinasyonlarını içeren 30 g/l sukroz ve 7 g/l agar içeren MS ortamlarında, 24 µmol. m⁻². sn⁻¹, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında kültüre alınmıştır (Zhao vd., 2003/4). Oluşan sürgünler de farklı konsantrasyonlarda (5.37 ve 10.74 µM) NAA, (5.71 ve 11.42 µM) IAA ve (4.92 ve 9.84 µM) IBA içeren MS besin ortamlarında alt kültüre alınmıştır. En iyi sürgün oluşumu 8.88 µM BA ve 2.69 µM NAA kombinasyonu içeren MS ortamında, % 93.4 olarak tesbit edilmiştir. Eksplant başına 4.2 adet sürgün oluşmuştur. Oluşan sürgünler sürgün oluşumunu arttırmak için aynı ortamda 6 kez alt kültüre alınmıştır.

Benniamin vd. (2004) *Crateva magna*'nın tek boğum eksplantlarını farklı konsantrasyonlarda BAP ve 30 g/l sukroz içeren MS besin ortamında kültüre alınmışlar ve 8.8 µM BAP içeren MS ortamında eksplant başına 4.4±0.09 adet sürgün oluştuğunu belirlemişlerdir.

Prasad vd. (2004), sürgün ucu, tek boğum ve kotiledon eksplantları kullanarak *Cryptolepis buchanani*'nin *in vitro* çoğaltımını araştırdıkları çalışmalarında en iyi cevap tek boğum eksplantlarından alınmıştır. Eksplant başına 4.5-5.0 cm uzunluğunda, 12.5-13.0 sürgün oluşumu 2 mg/l BAP, 0.1 mg/l kinetin, 0.05 mg/l NAA ve 0.05 mg/l GA₃ içeren MS ortamında elde edilmiştir. Sürgün oluşum oranı % 60 olarak belirlenmiştir.

Gangaprasad vd. (2005), *Decalepis arayalpathra*'nın tek boğum eksplantlarını 0.1-5.0 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre almışlardır. 1.0 mg/l BAP içeren MS ortamı en uzun sürgün oluşumunu (6.8 cm) 60 günde sağlamıştır. Çoğaltım aşaması için *in vitro* koşullarda elde edilen nodlar ve sürgün uçları 0.5 mg/l BAP içeren ortamlarda kültüre alındığında yeni sürgünler oluşturmuştur.

Sadanandam vd. (2005) *Terminalia bellirica*'nın tek boğum eksplantları farklı konsantrasyonlarda BA (4.4, 8.9, 13.3, 17.8 ve 22.2 µM) ve kinetin (4.6, 9.3, 14, 18.6 ve 23.2 µM) içeren MS ortamında kültüre alındığında en yüksek aksiller sürgün oluşumunun 13.3 µM BA içeren ortamda sağlanmıştır. Sürgünler ayrılıp düşük düzeyde BA (2.2, 4.4, 6.6 veya 8.9 µM) veya kinetin (2.3, 4.6, 6.9 veya 9.3 µM) içeren alt kültürlerle aktarıldığında en etkin sürgün indüksiyonunu ise 4.4 µM BA içeren ortamda sağlanmıştır.

S. stricta'nın alt kültür denemlerinde sürgünlerde ortaya çıkan vitrifikasyonunu (camlaşma) ve rozet oluşumunu engellemek için, elde edilen sürgünlerin, alt kültür ortamı olarak kullanılan ortam bileşimlerine GA₃'in farklı konsantrasyonları (0.1 ve 0.5 mg/l) eklenerek hazırlanan tam ve 1/2 kuvvetteki B5 ortamlarında kültüre alınması da vitrifikasyon ve rozet oluşumunu engelleyememiştir (Bkz. Bölüm 4.1.3).

Vitrifikasyon, aşırı hidrasyon ve zayıf lignifikasyona bağlı malformasyon olarak bilinmekte ve bazı uygulamalarla ortadan kaldırılabileceği rapor edilmektedir; Veno ve Shetty (1997) *Origanum vulgare*'de bazı spesifik olmayan, polisakkarit oluşturan rizosfer bakterilerinin kullanılmasının vitrifikasyonu önlediğini belirlemişlerdir. Ayrıca Eguchi vd. (1999)'e *Origanum vulgare*'de BAP tarafından indüklenen vitrifikasyonu önlemek amacıyla ortamda bazı protein hidrolizatlar, maya ekstraktları, kazein ve baktepepton kullanmışlar ancak bu uygulamalardan sadece 1000 mg/l balık protein hidrolizatlarının vitrifikasyonu kısmen önlediğini göstermişlerdir.

Literatürde sürgünlerde vitrifikasyon oluşumunun ortamdaki sitokin (BAP) varlığı ile indüklenmiş olabileceği bildirilmiştir (Gaspar, 1991; Páques, 1991; Arrebola and Socorro, 1997). Sitokin hücre farklılaşması sırasında hücre bölünmesini aşırı

düzeyle uyarak malformasyon (vitrifikasyon) oluşumuna neden olduğu bildirilmektedir (Phan, 1991). Bu araştırmada sürgünlerdeki vitrifiksiyonu önlemek amacıyla ile kullanılan tüm ortam kombinasyonları da BAP içermektedir. Bu durum sürgünlerdeki vitrifikasyonun ortamdaki BAP varlığı ile indüklenmiş olabileceğini ve ortama ilave edilen GA₃'in farklı konsantrasyonlarının ve denenen ortam kuvvetlerinin de vitrifikasyonu önlemede yetersiz kaldığını düşündürmektedir.

Ortamda özellikle sitokinin bulunması yanında sıvı ortam kullanılmasında vitrifikasyona yol açabileceği bildirilmektedir. Ancak vitrifikasyonun, ortamın hormon içermemesi, agar ile katılaştırılması ve ortam kuvvetinin tam ve 1/2 kuvvette kullanılması ile ortadan kaldırabileceği rapor edilmektedir (Bouza, 1997; Piatczak et al., 2005). Ancak kullanılan agar cinsinin ve miktarının önemli olduğuna dikkat çekilmektedir (Curtis and Shetty, 1996; Scholten and Pierik, 1998). Besin ortamının agar veya şeker konsantrasyonunun artırılması, ortamın osmotik potansiyelini arttıracığından sürgünlerin su alımını azaltarak vitrifikasyonu ortadan kaldıracağı bildirilmektedir (Brand, 1993). Bu durumda sürgünlerin geliştiği ortamın düşük agar veya şeker konsantrasyonlarına sahip olması, yani besin ortamının osmotik potansiyelinin düşük olması veya sıvı ortam kullanılması, sürgünlerin fazla su almasına yol açarak vitrifikasyon problemine neden olmaktadır (Debergh, 1983; Pierik, 1987). Bu çalışmada doz denemesi yapılmasında kullanılan agar ve şeker dozunun muhtemelen sürgünlerin vitrifikasyonu ortadan kaldırarak düzeyde olmadığı söylenebilir.

Tam bir bitki oluşturmak için sürgünler, sürgün oluşturma ortamından farklı bir hormon kompozisyonuna sahip olan köklenme ortamına aktarılmaktadır. Türlerin çoğunda köklenmenin desteklenmesi için NAA'e gereksinim duyulduğu (Erdağ ve Yürekli, 2000) ya da IBA (0.1-1.0 mg/l)'e gereksinim duyulduğu (Bhojwani ve Razdan, 1983; Prece ve Sutter, 1993) literatürde bildirilmiştir.

Iyer ve Pai (1998; 2000) tarafından yapılan çalışmalarda *Origanum majorana* 'da *in vitro* koşullarda elde edilen sürgünler 0.2 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendirilmiş, bitkicikler güçlendirilip toprağa aktarılmış ve yaşama oranı yaklaşık % 50 olarak belirlenmiştir.

Jhumur ve Handique (2002), *Polygonum microcephalum*'un mikroçoğaltımı çalışmalarında, sürgünleri 0.1-0.3 mg/l IAA veya IBA içeren MS ortamında köklendirmeyi başarmışlardır.

Centaurea rupestris'de sürgünlerin en iyi köklenme oranı % 58 olarak 3.0 µM IBA içeren yarı kuvvetteki MS besin ortamında elde edilmiştir (Perica 2003).

Prasad vd. (2004)'nin çalışmalarında farklı konsantasyonlarda oksin; IAA, IBA ve NAA ve kombinasyonlarını içeren MS ortamında köklendirilmeye alınan *Cryptolepis buchanani*'nin sürgünlerinin % 80'i 1.0 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendiği bildirilmiştir.

Bu araştırmada, kök oluşumu için farklı IBA konsantasyonlarını (0.0, 1.5, 3.0, 4.5 ve 10 mg/l) içeren ortamlar kullanılmıştır. Bu ortamların kök oluşumu üzerindeki etkilerinin önemli olduğu belirlenmiştir (*S. stricta* için, Çizelge 4.3 ve Ek-1, Çizelge 3; *O. minutiflorum* için, Çizelge 4.6 ve Ek-1, Çizelge 6). *S. stricta*'da en yüksek kök oluşumu 4.5 mg/l IBA içeren B5 ortamında, *O. minutiflorum*'da ise 3 mg/l IBA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Ancak *O. minutiflorum* için 2. alt kültürde hormonsuz MS ortamının etkisi 3 mg/l IBA ile benzer bulunmuş ve kök oluşumunu önemli oranda arttırmıştır (Bkz. Çizelge 4.11). Benzer şekilde Piatczak vd. (2005) hormon içermeyen MS ortamının köklenmeyi arttırdığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada hormonsuz ortamda kök oluşumu eksplantların başlangıçtaki içsel IBA düzeyinin alt kültüre alma sürecinde artarak istenilen düzeye gelmiş olmasından kaynaklanabilir. Nitekim Arrebolla ve Socorro (1997) *Satureja obovata*'nın mikroçoğaltımını araştırdıkları çalışmalarında köklendirilme aşamasında, ortamda oksin bulunmaması veya düşük oranda bulunması durumunda bu türün sahip olduğu içsel oksin miktarının köklenme üzerinde kısa bir süre için yararlı olacağını bildirmişlerdir. Gao vd. (2003/2004)'ne göre farklı türlerin *in vitro* koşullarda köklenmelerinin morfogenetik potansiyelleri, içsel büyüme düzenleyicilerin seviyesine bağlıdır.

Köklü fideler steril 'perlit + toprak' karışımından oluşan *ex vitro* koşullara başarıyla aktarılmıştır (*S. stricta* için, Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9; *O. minutiflorum* için, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). *S. stricta*'da 1 yıl süre ile yapılan gözlemlerde fidelerin

canlılık oranı % 90 olarak, *O. minutiflorum*'da ise 3 ay süre ile yapılan gözlemlerde % 58 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak;

S. stricta ve *O. minutiflorum*'un *in vitro* koşullarda çoğaltımı yapılmış ve etkin bir üretime olanak sağlayacak optimal koşullar belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları şöyle özetlenebilir;

1- *S. stricta* tohumları kabuğu çıkarılıp geri kalan embriyo ve endosperm kısmı B5 ortamında ve *O. minutiflorum* tohumları ise MS ortamında kültüre alındığında % 100 oranında çimlenmiştir.

2- Mikroçoğaltım denemelerinde *S. stricta* için B5 ortamında çimlendirilen ve büyütülen 30-40 günlük fidelerden, *O. minutiflorum* için ise MS ortamında çimlendirilen ve büyütülen 30-40 günlük fidelerden eksplant alınmıştır.

3- *S. stricta* ve *O. minutiflorum* için kullanılan tek boğum eksplantı ile diğer eksplantlar (hipokotil, sürgün ucu ve yaprak parçaları) karşılaştırıldığında tek boğum eksplantlarının kullanılan tüm hormon kombinasyonlarında sürgün oluşumu bakımından en başarılı eksplant olduğu saptanmıştır Hipokotil, sürgün ucu ve yaprak parçalarının sürgün rejenerasyonu üzerinde etkili olmadığı ve sürgün oluşturmadığı belirlenmiştir.

4- *S. stricta* için sürgün oluşumu bakımından en başarılı hormon kombinasyonu ve ortamın 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA ve 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA kombinasyonlarını içeren B5 besin ortamlarının olduğu, *O. minutiflorum* için ise 2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonlarını içeren MS ortamlarının olduğu belirlenmiştir.

5- *O. minutiflorum* için 1., 2. ve 3. alt kültürlerde en fazla sürgün oluşumu 2.0 mg/l BAP içeren ortamda gerçekleşmiş ve 3 alt kültürde sırasıyla eksplant başına ortalama 3.04, 3.73 ve 1.42 adet sürgün oluşmuştur. 3. alt kültür sonunda çoğaltım katsayısı 42.99 olarak tespit edilmiştir.

6- *S. stricta* için, 1. ve 2. alt kültürlerde en fazla sürgün oluşumu 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA kombinasyonunu içeren ortamda gerçekleşmiş 2 alt kültürde sırasıyla eksplant başına ortalama 4 ve 2.11 adet sürgün oluşmuştur. 2. alt kültür sonunda da çoğaltım katsayısı 33.76 olarak belirlenmiştir. 2. alt kültürde 3.0 mg/l BAP içeren ortamda ve 3. alt kültürde tüm ortam kombinasyonlarında oluşan yeni sürgünler vitrifiye olmuş veya rozet şeklinde gelişmiştir.

7- *S. stricta*'da en yüksek kök oluşumu 4.5 mg/l IBA içeren B5 ortamında, *O. minutiflorum*'da ise 3.0 mg/l IBA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Ancak *O. minutiflorum* için 2. alt kültürde hormonsuz MS ortamının etkisi 3.0 mg/l IBA ile benzer bulunmuş ve kök oluşumunu önemli oranda arttırmıştır.

8- Köklü fideler steril 'perlit + toprak' karışımından oluşan *ex vitro* koşullara başarıyla aktarılmıştır. *S. stricta*'da 1 yıl süre ile yapılan gözlemlerde fidelerin canlılık oranı % 90 olarak, *O. minutiflorum*'da ise 3 ay süre ile yapılan gözlemlerde % 58 olarak belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen bu çalışma ile *in vitro* koşullarda *S. stricta* ve *O. minutiflorum* bitkilerinin çoğaltılmasına yönelik protokol optimize edilmiştir. Bu araştırma sonuçları diğer tıbbi ve aromatik bitkilerde yapılacak doku kültürü çalışmalarına da temel oluşturacak ve yol gösterecektir. Ayrıca, bu çalışma sonuçları her iki türün doku kültürü ile dünyadaki ilk çalışması olması bakımından Türk ve dünya literatürüne muhtemelen önemli katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Akcoş, Y., 1994, *Sideritis lycia* Boiss. & Heldr. Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara,
- Akcoş, Y., Ezer, N., Çalış, I., Demirdamar, R. and Tel, B.C., 1999, Polyphenolic compounds of *Sideritis lycia* and their anti-inflammatory activity, Pharm. Biol., 37 (2), 118-122.
- Alcaraz, M.J., Jimenez, M.J., Valverde, S., Sanz, J., Rabanal, R.M. and Villar, A., 1989, Anti-inflammatory compounds from *Sideritis javalambrensis* n-hexana extract, J. Nat. Prod., 52 (5), 1088-1091.
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Chinou, I.B., Mitakou, S., Gikas, E. and Tsrabopoulos, A., 2001, Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece, J. Agr. Food Chem., 49 (2), 811-815.
- Alves-Pereira, I.M.S. and Fernandes-Ferreira, M., 1998, Essential oils and hydrocarbons from leaves and cali of *Origanum vulgare* ssp. *Virens*., Phytochem., 48 (5), 795-799.
- Arafah, R.M, Mahmoud, M.S, and Shibli, R.A., 2003, *In vitro* seed propagation of wild syriana marjoram (*Origanum syriacum* L.), Advances in Horticultural Science, 17 (4), 241-244.
- Arı, Ş., Şahin-Hasancebi, S. Arda, N., Turgut, N. and Aytaç, Z., 2002, Optimization of tissue culture conditions of Turkish endemic *Astragalus chrysocholorus*, Second Balkan Botanical Congress, 14-18 May 2000, İstanbul-Turkey, s. 204.
- Arrebola, M.L. and Socorro, O., 1997, Micropropagation of *Satureja obovata* Lag., HortScience, 32 (7), 1278-1280.
- Arslan, K.,1999, *Sideritis vulcanica* Hub-Mor. Üzerinde Anatomik, Morfolojik ve Karyolojik Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Ayan, A.K., Çırak, C., Kevseroğlu, K. ve Sökmen, A., 2005, Effects of explant types and different concentrations of sucrose and phytohormones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforata* L., Tr. J. Agr. For., 29, 197-204.
- Aydın, H., 1993, Cytotaxonomical, anatomical and morphological researches on some *Sideritis* L. species, Master Thesis, Dokuz Eylül University Graduate School of Natural and Applied Sciences, İzmir.

- Aytac, Z. and Aksoy, A., 2000, A new *Sideritis* species (Lamiaceae) from Turkey, *Flora Mediterranea*, 10, 181-184.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M. ve Akbudak, M.A., 2001, Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri, Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları, Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (eds.) S. Ü. Vakfı Yayınları, ISBN 975-6652-04-7, Konya, s. 262-281.
- Başer, K.H.C., 2001, Her derde deva bir bitki: kekik, *Bilim ve Teknik*, Mayıs, s. 74-77.
- Başer, K.H.C., 2006, Sözlü görüşme, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fak. Farmakognozi Anabilim Dalı, 26470, Ankara, khcbaser@anadolu.edu.tr
- Baytop, A., 1983, *Farmasötik Botanik*. İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları, 36, 282-285.
- Baytop, T., 1984, Türkiye’de Bitkilerle Tedavi, İst. Üniv. Yay., 40, İstanbul, 216 s.
- Baytop, 1997, Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Atatürk kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu Türk Dili Kurumu Yayınları, 578, ISBN: 975-16-0542-3, Ankara, 512 s.
- Bejjilali, B., 1996, *Origanum*: What was this mean? The case of Morocco. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, Valenzano (Bari), Italy, 139 p.
- Benniamin, A., Manickam, V.S, Johnson, M. and Joseph, L.H., 2004, Micropropagation of *Crateva magna* (Lour.) DC.-a medicinal plant, *Indian J. of Biotech.*, 3 (1), 136-138.
- Bernáth, J., 1996, Some scientific and practical aspects of production and utilization of oregano in central Europea. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, Valenzano (Bari), Italy, 76-91.
- Bewley, J.D. and Black, M., 1982, *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination, Viability, Dormancy and Enviromental Control*, Vol. 1, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, ISBN 3-540-11656-7, New York, 375 p.
- Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K., 1983, *Plant Tissue Culture: Theory and Pratic*. Amsterdam, Elsevier.
- Bouza, L., 1997, Micropropagation of *Prunus tenella* (Dwarf Russian Almond), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-Tec and Micropropagation VI*, Y.P.S., Bajaj (eds.), Vol. 40, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 276-288.
- Bradbeer, J.M., 1988, *Seed Dormancy and Germination*. Blackie, London.

- Brand, M.H., 1993, Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of Serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*, *Plant Cell Tiss. Org.*, 35 (3), 203-209.
- Čellárová, E., 1992, Micropropagation *Mentha* L., *Biotechnology in Agriculture And Forestry* 19, High Tech. and Micropropagation II, Bajaj, Y.P.S. (eds.) Springer-Verlag, pp. 262-276.
- Chen, Y. and Li, F., 2005, Micropropagation and callus culture of *Saussurea laniceps*, an alpine medicinal plant, *Forestry Studies in China*, 7 (1), 16-19.
- Chu, C.Y. and Huang, M.C., 1983, *In vitro* formation of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort.) plantlets through excised scape culture. *Hort. Abst.*, 53 (11), 779.
- Crutis, O.F. and Shetty, K., 1996, Growth medium effects of vitrification, total phenolics, chlorophyll and water content of *in vitro* propagated oregano clones, *Acta Hort.*, 426, 489-497.
- Çakırlar, H., Tıpırdamaz, R., Özkum, D. ve Çiçek, N., 2000, *In Vitro* Üretilen (Kardelen) *Galanthus elwesii* Hooker Fil. ve *G. ikariae* Baker. Soğancıklarının Köklendirilmesi ve Dış Koşullarda Geliştirilmesi. DPT 97 K 121270 No' lu Proje, Temmuz, 46 s.
- Datta, M.M., Majumder, A. and Jha, S., 2006, Organogenesis and plant regeneration in *Taxus wallichiana* (Zucc.), *Plant Cell Rep.*, 25, 11-18.
- Davis, P.H., Mill, R.R. and Tan, K. (eds.) 1982, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh Univ. Press., Edinburgh. Vol. 7, pp. 186-187 and pp. 307-308.
- Davis, P.H., Mill, R.R. and Tan, K.(eds.) 1988, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, Vol. 10, 590 p.
- Debergh, P.C., 1983, Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 59, 270-276.
- Debergh, P.C. and Read, P.E., 1993, *Micropropagation. Micropropagation - Technology and Application*, Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H (eds.), Kulwer Academic Publishers, Dordrec, Hollanda, pp. 1-15.
- Demo, A., Petrakis, C., Kefalas, P. and Boskou, D., 1998, Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves, *Food Res. Int.*, 31 (5), 351-354.
- Diaz, R.M., Garcia-Granados, A., Moreno, E., Para, A., Quevedo-Sarmiento, J., Saenz de Buruaga, A. and Saenz de Burunaga, J.M., 1988, Studies the relationship of structure to antimicrobial properties of diterpenoid compounds from *Sideritis*, *Planta Med.*, 54 (4), 301-304.

- Duman, H., Başer, K.H.C. and Aytaç, Z., 1998, Two new species and a new hybrid from Anatolia, Tr.J. of Bot., 22, 51-55.
- Duman, H., 2000, *Origanum* L. in: Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, K.H.K., (eds.). Flora of Turkey and East Aegean Islands, Edinburg University Press, Edinburg, Vol 11, pp. 207-208.
- Duman, H., 2006, Sözlü görüşme, Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06500, Ankara, hduman@gazi.edu.tr.
- Eguchi, Y, Milazzo, M.C, Veno, K. and Shetty, K, 1999, Partial improvement of vitrification and acclimation of oregano (*Origanum vulgare* L.) tissue cultures by fish protein hydrolysates, Journal of Herbs Species and Medicinal Plants, 6 (4), 29-38.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. ve Adıgüzel, N., 2000, Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı, Türkiye Tabiatını Koruma Derneği, 99-100:246, ISBN:975-93611-0-8, Van Yüzüncü Yıl Üniv., Ankara.
- Ellialtıoğlu, ř., Özcan, S., Demir, K. ve Tepe, ř., 1998, Nananin (*Mentha* sp.) Doku Kültürü ile Çoğaltma Olanakları, III. Ulusal Biyoteknoloji Simpozyumu, Biyoteknolojide Üniversite-Sanayi İşbirliği, 23-24 Ekim, Eskişehir.
- Erdağ, B.B. and Yürekli, A.K., 2000, *Thymus sipyleus* Boiss. (Lamiaceae)'un *in vitro* çoğaltılması, Tr. J of Biol., 24, 81-86.
- Erzen-Vodenik, M. and Baricevic, D., 1996, Tissue propagation of medicinal and aromatic plants, Novi izzivi v poljedelstvu 96, Zbornik simpozija, Ljubljana, Slovenia, 9-10 decembra, 201-206.
- Faria J.L.C., Kostenyuk, I. and Segura, J., 1998, Isolation, culture and plant regeneration from protoplasts of *Sideritis angustifolia*. J. of Plant Physiol., 153 (1-2), 251-254.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A and Ojima, K., 1968, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, Exp. Cell Res., 50, 151-158.
- Gangaprasad, A., Decruse, S.W., Seni, S. and Nair, G.M., 2005, Micropropagation and ecorestoration of *Decalepis arayalpathra* (Joseph & Chandra) Venter- an endemic and endangered ethnomedicinal plant of Western Ghats, Indian J. of Biotech., 4 (2), 265-270.
- Gao, H.H., Li, W., Yang, J., Wang, Y., Guo, G.Q and G.C. Zheng, 2003/4, Effects of 6-benzyladenine and casein hydrolysate on micropogation of *Amorpha fruticosa*, Biol. Plantarum, 47 (1), 145-148.
- Garcia-Granados, A., Martinez, A., Onorato, M.E., Parra, A., Recondo, M.B., Rivas, F., Arrebola, M.L and Socorro, O., 1994 , Products with biological

activity obtained from in vitro micropropagated *Sideritis foetens*, *Phytochem*, 35 (3), 645-650.

- Gattuso, S., Severin, C., Salinas, A., Gattuso, M., Giubileo, M., Aguirre, A. and Busilacchi, H., 2003, Micropropagation of *Passiflora caerulea* with histological details of tissue regeneration, *Journal of Tropical Medicinal Plants*, 4 (2), 249-255.
- Gaspar, T., 1991, Vitrification in micropropagation. *Biotechnology in agriculture and Forestry, High Tec. And Micropropagation I*, Bajaj, Y.P.S (eds), Vol. 17, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 116-126.
- Gergis, V., Spiliotis, V. and Poulos, C., 1990, Antimicrobial activity of essential oils from greek *Sideritis* species, *Pharmazie*, 45 (1), 70-71.
- Ghoulam, C. and Fares, K., 2001, Effects of salinity on seed germination and early seedling growth of sugar beet (*Beta vulgaris* L.), *Seed Sci. & Technol.*, 29, 357-364.
- Godo, A., de Heras, B.L., Vivas, J.M. and Villar, A., 2000, Anti-inflammatory properties of a lipid fraction obtained from *Sideritis javalambrensis*, *Biol. Pharm. Bull.*, 23 (10), 1193-1197.
- Goleniowski, M.E., Flamarique, C and Bima, P., 2003, Micropropagation of oregano (*Origanum vulgare x appeli*) from meristem tips, *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant.*, 39 (2), 125-128.
- Göktürk, R.S. and Sümbül, H., 2002, The current conservation status of some endemic plants of Antalya province, *The Karaca Arboretum Magazine*, 6 (3), 91-97.
- Gupta, S.D. and Conger, B.V., 1998, Differentiation of multiple shoot clumps from intact seedling of switchgrass. *In Vitro Cell. and Develop.*, 34, 196-202.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. ve Başer, K.H.C., 2000, *Flora of Turkey and East Aegean Islands, Supplement II*, Edinburgh Univ. Press., Vol 11, Edinburgh, s. 618-619.
- Hartman, H.T. and Kester, D.E., 1975, *Plant Propagation - Principles and Practices*. Prentice-Hall. Inc., New Jersey.
- Heywood, V.H., 1996, *Flowering Plants of the World*, BT Batsford Ltd., 239, London.
- Hickey, M. and King, C., 1997, *Common Families of Flowering Plants*, Cambridge Univ. Press., England, pp. 119-127.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I., 1938, The water culture method for growing plants without soil. *Circ. Calif. Agr. Exp. Sta.*, 347-461.

- Huang M.C. and Chu C.Y., 1987, A scheme for commercial multiplication of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort.) through shoot tip culture, Hort. Abst., 57 (5) 374.
- IUCN, 2001, Red List Categories: Version 3.1. Prepared By ICUN Species Survival Commission, ICUN, Gland Switzerland and Cambridge, UK.
- Iyer, P.V. and Pai, J.S.,1998, Micropropagation of sweet marjoram (*Majorana hortensis* Moech.), Journal of Species and Aromatic Crops, 7 (1), 47-79.
- Iyer, P.V. and Pai, J.S., 2000, *In vitro* regeneratiin of *Majorana hortensis* Moench from callus and nodal stem segments, Journal of Species and Aromatic Crops, 9 (1), 47-50.
- İnternet: http://www.bahce.biz/organik/tibbi_organik.htm.
- İnternet: www.kobifinans.com.tr/article/articleview.
- Jhumur, D. and Handique, P.J., 2002, Micropropagation of a rare medicinal plant species- *Polygonum microcephalum* O. Don, through high frequency shoot multiplication, Journal of Phytological Research, 15 (2), 197-200.
- Kaya, A., 1990, *Sideritis germanicopolitana* türü üzerinde morfolojik ve anatomik araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Kırımer, N., Duman, H., Tabanca, N. and Başer, K.H.C.,1997, Comosition of essential oils from three new *Sideritis* species, 28th International Symposium on Essential Oils, Eskişehir.
- Kırımer, N., Tabanca, N., Tümen, G., Duman H. and Başer, K.H.C., 1999, Composition of essential oils of four endemic *Sideritis* species from Turkey, Flavour and Fragrance Journal, 14, 421-425
- Kitiki, A., 1996, Status of Cultivation and Use of Oregano in Turkey , Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, Valenzano (Bari), 122-132.
- Kokkini, S., 1996, Taxonomy, divesity and distribution of origanum species. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, Valenzano (Bari), 2-12.
- Koleva, T.A., Linssen, J.P., de Groot, A. and Evstatieva, L.N., 2002, Screening of plants extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods, Phytochem. Analysis,13 (1), 8-17.
- Kumari, N. and Saradhi, P.P., 1992, Regeneration of plants from callus cultures of *Origanum vulgare* L., Plant Cell Rep., 11 (9), 476-479.

- López-Escamilla, A.L., Olguin-Santos, L.T., Marquez, J., Chavez, V.M. and Bye, R., 2000, Adventitious bud formation from mature embryos of *Picea chihuahuana* Martinez, an endangered Mexican spruce tree, *Ann. Bot.*, 86, 921-927.
- Makowczynska, J. and Andrzejewska-Golec, E., 2003, Micropropagation of *Plantago asiatica* L. through culture of shoot-tips, *Acta-Societatis Botanicorum Poloniae*, 72 (3), 191-194.
- Mansuroğlu, S. and Gürel, E., 2001, Mikroçoğaltım, Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları, Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (eds.) S. Ü. Vakfı Yayınları, ISBN 975-6652-04-7, Konya, s. 262-281.
- Mariska, I., Gati, E. and Sukmadjaja, D., 1991, *In vitro* clonal propagation of gerbera, *Plant Breeding Abst.* 61 (4), 499.
- Martin, E., 2003, Türkiye *Sideritis* L. (Lamiaceae) türleri üzerinde karyolojik bir araştırma, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 184 s.
- Miachir, J.I., Romani, V.L.M., de Campos Amaral, A.F., Mello, M.O., Crocomo, O.J. and Melo, M., 2004, Micropropagation and callogenesis of *Curcuma zedoaria* Roscoe, *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 61 (4), 427-432.
- Minas, G.J., 2001, Certain dittany apical meristem micropropagation in vitro, *Miscellaneous-Reports Agricultural Research Institute Ministry of Agriculture, Natural Resources and the Environment*, No. 80, 7pp.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plantarum*, 15, 473-497.
- Nakano, M., Niimi, Y., Kobayashi, D. and Watanabe, A., 1999, Adventitious shoot regeneration and micropropagation of hybrid tuberous begonia (*Begoniaxtuberhybrida* Voss.). *Sci. Hort.*, 79 (3-4), 245-251.
- Navarro, A., de las Hegas, B. and Villar, A.M., 2001, Anti-inflammatory and immunomodulating properties of sterol fraction from *Sideritis foetida* Clem., *Biol. Pharm. Bull.*, 24 (5), 470-473.
- Özhatay, N., Koyuncu, M., Atay, S. ve Byfield, A., 1997, Türkiye'nin Doğal Tıbbi Bitkilerinin Ticareti Hakkında Bir Çalışma, Doğal Hayatı Kotuma Derneği.
- Özkum D. and Tıpırdamaz, R. 2004, Effects of Different Nutrient Media and Explant Types on *in vitro* Shoot Regeneration of Medical Species of *Origanum minutiflorum*, 3rd Balkan Symposium on Vegetables & Potatoes, 6-10 September, 2004, Bursa- Turkey, p.14.
- Palomino, O.M., Gomez-Serranillos, P., Cerretero, E. and Vilar, A., 1996, High performance liquid chromatography of flavonoids from *Sideritis* species, *Journal of Chromatography*, 731, 103-108.

- Páques, M., 1991, Vitrification and micropropagation: Causes, remedies and prospects. *Acta Hort.*, 289, 283-290.
- Pelkonen, V.P. and Kauppi, A., 1999, The effect of light and auxins on the regeneration of lily (*Lilium regale* Wil.) cells by somatic embryogenesis and organogenesis. *Int. J. Plant Sci.*, 160 (3), 483-490.
- Perica, M. 2003. *In vitro* propagation of *Centaurea rupestris* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 45 (2), 127-130, 2003.
- Phan, C.T., 1991, Vitreous state *in vitro* culture; ethylene versus cytokinin, *Plant Cell Rep.*, 9 (9), 517-519.
- Piatczak, E., Wielanek, M. and Wysokinska, H., 2005, Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaureum erythraea* Rafn., *Plant Science*, 168, 431-437.
- Pierik, R.L.M., 1987, *In vitro* Culture of Higher Plants, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, p. 344.
- Pierik, R.L.M., Voorst, A., Booy, G., Acker C.A.M., Lelivet, C.L.C and Wit J.C., , 1988, Vegetative propagation of *Alstroemeria* hybrids *in vitro*, *Acta Hort.* 226 (1), 81-91.
- Prasad, P.J.N., Chakradhar, T. and Pullaiah, T., 2004, Micropropagation of *Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult, *Taiwania*, 49 (1), 57-65.
- Preece, J.E. and Sutter, E.G., 1993, Acclimatization of micropropogated plants to thr green house and field. *Micropropagation Thecnology and Application*, Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H. (eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 71-95.
- Rios, J.L., Manez, S., Paya, M. and Alcaraz, M.J., 1992, Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*, *Phytochem.*, 31 (6), 1947-1950.
- Rodriguez-Linde, M. E., Diaz, R.M., Garcia-Granados, A., Quevedo-Sarmiento, J., Moreno, E., Onorato, M.R., Parra, A. and Ramos-Cormenzana, A., 1994, Antimicrobial activity of natural and semisynthetic diterpenoids from *Sideritis* spp., *Microbios*, 77 (310), 7-13.
- Sadanandam, A., Ramesh, M., Umate, P. and Venugopal R.K., 2005, Micropropagation of *Terminalia bellirica* Roxb.-a sericulture and medicinal plant, *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*, 41 (3), 320-323(4).
- Sajina, A., Geetha, S.P., Minoo, D., Rema, J., Babu, K.N., Sadanandan, A.K. and Ravindran, P.N., 1997, Micropropagation of some important herbal species, *Biotechnology of species medicinal and aromatic plants*, *Proceedings of the national seminar on biotechnolgy of species and aromatic plants*, Calicut, India, 24-25 April 1996, pp. 79-86.

- Sarı, O., Oğuz, B., Fırat, A.E., Açıkgöz, N. ve Aydın, A., 2002, Kekik, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Yayın No: 108, İzmir, 82 s.
- Sarker, M.R., Handique, G.K. and Handique, A.K., 2002, Clonal micropropagation of *Paederia foetida* L-a potenet herbal medicinal plant, Journal of Phytological Research, 15 (2), 125-131.
- Scholten, H.J and Pierik, R.L.M., 1998, Agar as gelling agent. Differential biological effects *in vitro*. Scientia Horticulturae, 77 (1-2), 109-116.
- Schwenkel, H.G. and Grunewaldt, J., 1988, *In vitro* propagation of *Cyclamen persicum* Mill. Acta Hort. 226 (2), 659-663.
- Shepley, S.C.C. and Chang, L.L., 1972, Does gibberrellic acid stimulate seed germination via amylase synthesis?, Plant Physiol., 49, 441-442.
- Shishkin, B.K. and Yuzepchuk, S.V., 1976, Flora of U.S.R.R., Isreal Program For Scientific Traslations, XX, Jerusalem, 168-181.
- Skoog, F. and Miller, C.O., 1957, Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol., 11, 118-130.
- Socorro, O., Terrega, I. and Rivas, F., 1998, Essential oils from wild and micropropagated plants of *Origanum batetatum*, Phytochem., 48 (8), 1347-1349.
- Sokal, R. and Rohlf, F.J., 1995, Biometry, The Principles and Practice of Statistics in Biological Research, Third Edition, W.H. Freeman and Co., New York, USA, 887 p.
- Sy, A., Grouzist, M. and Danthu, P., 2001, Short communication seed germination of seven Sahelian legumen species, J. of Arid. Environments, 49, 875-882.
- Tepe, Ş., Ellialtıoğlu, Ş., Yenice, N. ve Tıpırdamaz, R., 2002, *In vitro* kolhisin uygulaması ve poliploid nane (*Mentha longifolia* L.) bitkilerinin elde edilmesi, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi., 15 (2), 63-69.
- Tıpırdamaz, R., Ellialtıoğlu, Ş. ve Çakırlar, H., 1999, Kardelenin (*Galanthus ikariae* Baker.) doku kültürü yoluyla çoğaltımı; eksplant tipi, ortam pH'sı ve karbonhidrat kaynağının soğancık oluşumuna etkisi, Tr. J. Agr. For. 23, 823-830.
- Tıpırdamaz, R., 2003, Rooting and acclimatization of *in vitro* micropropagated snowdrop (*Galanthus ikariae* Baker.) bulblets, Akdeniz Üniv. Ziraat Fak. Dergisi, 16 (2), 121-126.

- Tissart, B. and Silman, R., 2000, Ultra-high carbon dioxide levels enhances *in vitro* shoot growth and morphogenesis in Lamiaceae, *Journal-of-Herbs; Species and Medicinal Plants*, 7 (2), 43-55.
- Tisserat, B. and Vaughn, S.F., 2004, Techniques to improve growth, morphogenesis and secondary metabolism responses from Lamiaceae species in vitro, *Proc. XXVI IHC-Future for Medicinal and Aromatic Plants* Eds. L.E.Craker et al., *Acta Hort.* 629, ISHS, 333-339.
- Triantaphyllou K., Blekas, G. and Boskou, D., 2001, Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of species Lamiaceae, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52 (4), 313-317.
- Tyagi, R.K. and Prakash, S., 2004, Genotype-and sex-specific protocols for in vitro micropropagation and medium-term conservation of jobjoba, *Biol. Plantarum*, 48 (1), 19-23.
- Uphof, J. C. T.H., 1968, *Dictionary of Economic Plants*, Verlag Von J. Cramer, 484 p.
- Ünal, O., 2003, Antalya için Endemik olan *Origanum* L. (Lamiaceae) Türlerinin Bazı Biyolojik ve Ekolojik Özelliklerini Saptanması Üzerinde Araştırmalar, Akdeniz Üniversitesi, Fen Fak. Biyoloji Anabilim Dalı, 172 s.
- Vainöle, A. and Repo, T., 2000, polyploidisation of *Rhododendron* cultivars in vitro and how it affects cold hardiness. 4th Int. Symp. On *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding, 2-7 July 2000, Tampere-Finland, 99 p.
- Veno, K.I. and Shetty, K., 1997, Effects of selected polysaccharide-producing soil bacteria on hyperhydricity control in oregano tissue cultures, *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (2), 767-770.
- Villar, A., Esplugues, J. and Alcaraz, M.J., 1982, Acute anti-inflammatory activity of *Sideritis mugronensis* flavonoid, *Arch. Farmacol. Toxicol.*, 8 (2), 99-106.
- Villar, A., Gasco, M.A. and Alcaraz, M.J., 1984, Anti-inflammatory and anti-ulcer properties of hypolaetin-8-glucoside, a novel plant flavonoid, *J. Pharm. Pharmacol.*, 36 (12), 820-823.
- Villar, A., Gasco, M.A., Alcaraz, M.J., Manez, S. and Cortes, D., 1985, Hypolaetin-8-glucoside, an anti-inflammatory flavonoid from *Sideritis mugronensis*, *Planta Med.*, 1, 70.
- Villar A., Recio, M.C., Rios J.L and Zafra-Pola, M.C., 1986, Antimicrobial activity of essential oils from *Sideritis* species, *Pharmazie*, 41 (4), 298-299.
- Villena, C., Vivas, J.M. and Villar A.M., 2000, Suppression of croton oil-induced rabbit corneal edema by *Sideritis javalambrensis*, *J. Ethnopharmacol*, 71 (1-2), 301-305.

- Werbrouck, S.P.O. and Debergh, P.C., 1994, Applied aspects of plant regeneration (micropropagation). Plant Cell Culture – A Practical Approach, Dixon, R.A and Gonzales, R.A. (eds.) Oxford Uni. Press., New York, pp. 127-135.
- Xhuveli, L. and Lipe, Q., 1996, Oregano (*Origanum vulgare* L.) in Albania, Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, Valenzano (Bari), 133-137.
- Yücel, E.,1996, *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *germanicopolitana* ve *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm.' in tohum çimlenme özellikleri üzerine bir araştırma, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi, 2, 71-85.
- Yürekli, A.K. ve B., Baba, 1995, Ekonomik Öneme Sahip Endemiklerin Doku Kültürü Teknikleri ile Çoğaltılması, TBAG-1190, 61 s.
- Zhao, D.L., Guo, G.Q, Wang, X.Y. and Zheng, G.C, 2003/4, *In vitro* micropropagation of a medicinal plant species *Sophora flavescens*, Biol. Plantarum, 47 (1), 117-120.
- Zobayed, S.M.A. and Saxena, P.K., 2003, *In vitro*-grown roots: a superior explant for perlic shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv "New Stem") in a temporary immersion bioreactor. Plant. Sci., 165, 463-470.

EKLER

Ek-1.

Çizelge 1. *S. stricta*'nın değişik eksplantlarında ve farklı BAP ve NAA kombinasyonlarındaki B5 ortamlarında sürgün oluşumu oranlarına ait varyans analiz sonuçları.

Varyasyon Kaynaklar	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	P-değeri
Eksplant (A)	876,188	3	292,063	3749,938	0,000*
Hormon kombinasyonu (B)	223,062	9	24,785	318,224	0,000
A x B	578,188	27	21,414	274,950	0,000
Hata	121,500		0.079		
Toplam	1798,938	1599			

* p<0.01 düzeyinde önemli.

Çizelge 2. *S. stricta*'da 1. ve 2. alt kültürlerde farklı BAP ve NAA kombinasyonlarının sürgün oluşum oranlarına ait varyans analiz sonuçları.

1. alt kültür					
Varyasyon Kaynaklar	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	P-değeri
Hormon kombinasyonu	98,076	3	32,692	8,503	0,000*
Hata	538,250	140	3,845		
Toplam	636,326	143			
2. alt kültür					
Hormon kombinasyonu	98,972	3	32,991	14,448	,000
Hata	319,667	140	2,283		
Toplam	418,639	143			

* p<0.01 düzeyinde önemli.

Çizelge 3. Mikroçoğaltım ve alt kültür aşamalarından elde edilen *S. stricta* sürgünlerinin farklı IBA konsantrasyonlarındaki kök oluşum oranlarına ait varyans analiz sonuçları.

Mikroçoğaltım aşaması					
Varyasyon Kaynaklar	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	P-değeri
Hormon konsantasyonu	2328,000	4	582,000	78,649	0,000*
Hata	74,000	10	7,400		
Toplam	2402,000	14			
1. alt kültür aşaması					
Hormon konsantasyonu	3069,600	4	767,400	426,333	0,000
Hata	18,000	10	1,800		
Toplam	3087,600	14			
2. alt kültür aşaması					
Hormon konsantasyonu	1821,600	4	455,400	284,625	0,000
Hata	16,000	10	1,600		
Toplam	1837,600	14			

* $p < 0.01$ düzeyinde önemli.

Çizelge 4. *O. minutiflorum*'un değişik eksplantlarında ve farklı BAP ve NAA kombinasyonlarındaki MS ortamlarında sürgün oluşum oranlarına ait varyans analiz sonuçları.

Varyasyon Kaynaklar	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	P-değeri
Eksplant (A)	5,157	9	0,573	4,567	0,000*
Hormon kombinasyonu (B)	15,602	3	5,201	41,445	0,000
A x B	15,473	27	0,573	4,567	0,000
Hata	145,567	1160	0,125		
Toplam	181,799	1199			

* $p < 0.01$ düzeyinde önemli.

Çizelge 5. *O. minutiflorum*'da 1., 2. ve 3. alt kültürlerde farklı BAP ve NAA kombinasyonlarının, farklı BAP ve kinetin dozlarının sürgün oluşum oranlarına ait varyans analiz sonuçları.

1. alt kültür					
Varyasyon Kaynaklar	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	P-değeri
Hormon kombinasyonu	1452,238	6	242,040	3,340	0,003*
Hata	23840,021	329	72,462		
Toplam	25292,259	335			
2. alt kültür					
Hormon kombinasyonu	607,363	6	101,227	11,107	0,000
Hata	2998,562	329	9,114		
Toplam	3605,926	335			
3. alt kültür					
Hormon kombinasyonu	50,976	6	8,496	12,108	0,000
Hata	230,854	329	0,702		
Toplam	281,830	335			

* p<0.01 düzeyinde önemli.

Çizelge 6. Mikroçoğaltım ve alt kültür aşamalarından elde edilen *O. minutiflorum* sürgünlerinin farklı IBA konsantrasyonlarındaki kök oluşum oranlarına ait varyans analiz sonuçları.

Mikroçoğaltım aşaması					
Varyasyon Kaynaklar	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	P-değeri
Hormon konsantrasyonu	9963,600	4	62490,900	691,917	0,000*
Hata	36,000	10	3,600		
Toplam	9999,600	14			
1. alt kültür aşaması					
Hormon konsantrasyonu	11886,000	4	2971,500	353,750	0,000
Hata	84,000	10	8,400		
Toplam	11970,000	14			
2. alt kültür aşaması					
Hormon konsantrasyonu	11545,067	4	2886,267	432,940	0,000
Hata	66,667	10	6,667		
Toplam	11611,733	14			
3. alt kültür aşaması					
Hormon konsantrasyonu	11438,400	4	2859,600	1191,500	0,000
Hata	24,000	10	2,400		
Toplam	11462,400	14			

* 0.01 düzeyinde önemli.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Dudu ÖZKUM
Doğum yeri : Lefkoşa/K.K.T.C.
Doğum Yılı : 25.02.1976

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise : 1990-1993 Lefkoşa Türk Maarif Koleji
Lisans : 1993-1997 Ankara Hacettepe Üniversitesi
Y. Lisans : 1997-2000 Ankara Hacettepe Üniversitesi
Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi

1999- : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji
Bölümü Botanik Anabilim Dalında Araştırma
Görevlisi