

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BİBERİYE (*Rosmarinus officinalis* L.) BİTKİSİNİN
***IN VITRO* KOŞULLARDA KLONAL ÇOĞALTIMI**
ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Yunus ERME

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 612.01.00

Sunuş Tarihi : 28.01.2013

Bornova-İZMİR
2013

Yunus ERME tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “**Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L) Bitkisinin *In Vitro* Koşullarda Klonal Çoğaltımı Üzerine Araştırmalar**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 28.01.2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

.....

Üye: Prof. Prof. Dr. Bahattin TANYOLAÇ

.....

Üye: Yrd. Doç. Dr. Bülent YAĞMUR

.....

ÖZET

BİBERİYE (*Rosmarinus officinalis* L.) BİTKİSİNİN IN VITRO KOŞULLARDA KLONAL ÇOĞALTIMI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

ERME, Yunus

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur Gürel

Ocak 2013, 50 sayfa

Bu tezde, tıbbi açıdan büyük önem arz eden üç farklı genotipe ait *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinin *in vitro* klonal çoğaltım potansiyeli araştırılmıştır. Nod eksplantlarından *in vitro* kültürün başlatılması amacıyla, farklı sterilizasyon yöntemleri uygulanarak, sterilizasyon prosedürünün oturtulması ve dokularda meydana gelen kararma sorununun çözümüne çalışılmıştır. Ayrıca, farklı besin ortamları kullanılarak *in vitro* kültür koşullarında biberiye nod eksplantlarının rejenerasyonları incelenmiştir.

Sürgün nod eksplantları ile yapılan çalışmada, en iyi sterilizasyon başarısı % 1'lik HgCl₂'nin kullanıldığı yöntemde % 78.6 olarak elde edilmiştir. Sterilizasyon sırasında eksplantlarda görülen en az kararma oranı ise % 30,4 ile 1 saat fungusit, 30 dk askorbik asit (100 mg/ L) + sitrik asit (50 mg/L) içeren solüsyonda bekletildikten sonra % 1'lik NaOCl'de bırakılan yöntemde sağlanmıştır. Araştırmada besin ortamlarına göre eksplantların kararma yüzdeleri de incelenmiştir. 0.1 mg/L BAP (benzilaminopurin) içeren MS (Murashige & Skoog, 1962) ortamında kararma gözlenmemiştir.

Besin ortamlarına göre nod eksplantlarında en yüksek sürgün oluşumları; Genotip 1 için % 30.7, genotip 2'de % 6.7, Genotip 3'de % 7.6 olarak gerçekleşmiştir. Genotip 1'de sürgün oluşumları en iyi 0.2 mg/L BAP, 50 mg/L malt ekstraktı, 20 mg/L adenin sülfat, 1000 mg/L NH₄NO₃, 2500 mg/L KNO₃ içeren modifiye MS ortamında elde edilmiştir. Genotip 2'de 0.1 mg/ L IAA ve 5 mg/L GA₃ içeren B5 ortamına alınan eksplantlarda % 6.7 oranında doğrudan köklü sürgün meydana gelmiştir.

Tüm kültürler, floresan ışığında 4.000 lux aydınlatma altında, 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık periyotta ve 24 ± 2 °C sıcaklıkta tutulmuştur.

Anahtar sözcükler: *Rosmarinus officinalis* L., biberiye, sterilizasyon başarısı, kararma, sürgün, kök, rejenerasyon, *in vitro*.

ABSTRACT

RESEARCHS ON *IN VITRO* CLONAL PROPAGATION OF ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis* L.) PLANTS

ERME, Yunus

M. Sc. in Bioengineering Department

Supervisor: Prof. Dr. Aynur GÜREL

January 2013, 50 pages

In this thesis, *in vitro* clonal proliferative potential of the plant *Rosmarinus officinalis* L. belonging to three different genotypes which possess a great importance from a medical perspective, has been investigated. To initiate *in vitro* culture from Nod explants, it was attempted to establish sterilization procedures and to solve darkening problems occurring in tissues by using different sterilization methods. Besides, regenerations of Nod explants in *in vitro* culture conditions were examined by using different nutrient media.

In a study carried out by using shoot nod explants, the best successful sterilization was obtained as 78.6 % in the method where HgCl_2 of 1 % was used. The least darkening rate (30.4 %) seen in explants during sterilization has been achieved through the method placed in NaOCl of 1 % after placed one hour in fungisit, 30 minutes in solution containing ascorbic acid (100 mg/L) and + citric acid (50 mg/L). In research explants' darkening rates according to nutrient media were investigated. Darkening has not been observed in MS (Murashige & Skoog, 1962) media containing 0.1 mg/L BAP (benzylaminopurin)

According to nutrient media the highest shoot formation in nod explants are as follows; 10-30.7 % for genotype 1, 6.7 % for genotype 2 and 7.6 % for genotype 3. In genotype 1, 0.2 mg/L BAP has been obtained in modified MS media containing 50 mg/L malt extract and 20 mg/L adenin sulfate. (Modified MS media contains 1000 mg/L NH_4NO_3 , 2500 mg/L KNO_3 except CaCl_2 and myo-inositol). In genotype 2, in explants taken from B5 media containing 0.1 mg/L

IAA ve 5 mg/L GA₃ a direct rooted shoot occurred at a rate of 6.7%. But in genotype 3 the best shoot formation with 7.6 % occurred in modified White media containing 2.5 mg/L BAP and 1 g/L active carbon (modified media contains 1 g/L NH₄NO₃, 2500 mg/L KNO₃).

All cultures were kept under fluorescence light of 4.000 lux, during periods of 16-hour brightness/8-hour darkness at a temperature of 24 ± 2 °C.

Key words: *Rosmarinus officinalis* L., rosemary, sterilization success, browning, shoot, root, regeneration, *in vitro*.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasına beni yönlendiren ve her türlü desteği sağlayan sevgili hocam Prof. Dr. Aynur Gürel'e, çalışmamda kullandığım biberiye bitkilerini sağlayan Arhan Medikal A.Ş.'ye, Prof. Dr. Emine Bayram'a, Ar. Gör. Dr. Hasan Yıldırım'a, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Ar.Gör. Dr. Şadiye Hayta'ya, Ar.Gör. Meltem Bayraktar'a ve Ar. Gör. Pınar Nartop'a ve her zaman arkamda olan kız arkadaşım Joanna Urszula Pekar'a teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Bitkisel Özellikleri	4
2.2. Tıbbi Özellikleri	5
2.3. Biberiye ile İlgili Yapılan Çeşitli Çalışmalar	6
2.4. Biberiye ile İlgili Yapılan Doku Kültürü Çalışmaları	11
3. MATERYAL VE METOD	15
3.1. Materyal	15
3.2. Metod	15
3.2.1. Besin ortamlarının hazırlanması	16
3.2.2. Kültüre alınan eksplantların sterilizasyonu	19
3.2.3. Eksplantların kültür ortamına alınması	21
3.2.4. Kültür koşulları	24
3.2.5. Denemenin kurulması ve verilerin değerlendirilmesi	24
4. BULGULAR	25
4.1. Kontaminasyon ve Kararma Durumları	25
4.1.1. Genotip 1’den alınan eksplantlarda gözlenen kontaminasyon ve kararma durumları	25
4.1.2. Genotip 2’den alınan eksplantlarda gözlenen kontaminasyon ve kararma durumları	29
4.1.3. Genotip 3’ten alınan eksplantlarda gözlenen kontaminasyon ve kararma durumları	32

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.2. Kültüre alınan sap eksplantlarındaki gelişmeler	35
4.2.1. Genotip 1’de görülen gelişmeler	35
4.2.2. Genotip 2’de görülen gelişmeler	37
4.2.3. Genotip 3’te görülen gelişmeler	39
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
KAYNAKLAR DİZİNİ	46
ÖZGEÇMİŞ	50
EKLER	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. genel görünüşü	1
2.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. gövde ve yaprakları	4
2.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. çiçeği	5
3.1. a: <i>Rosmarinus officinalis</i> 'ten alınan örnekler b: Eksplant haline getirilmiş gövde segmentleri.....	15
4.1. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 1'de görülen kontaminasyon ve kararma yüzdelerinin karşılaştırılması	27
4.2. Genotip 1'in aktarıldığı besin ortamı ve eksplantlarda görülen kararmalar	27
4.3. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 1'in aktarıldığı besin ortamlarına göre eksplantların kontaminasyon ve kararma durumları.....	28
4.4. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 2'de görülen kontaminasyon ve kararma yüzdelerinin karşılaştırılması	30
4.5. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 2'nin aktarıldığı besin ortamlarına göre eksplantların kontaminasyon ve kararma durumları.....	31
4.6. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 3'de görülen kontaminasyon ve kararma yüzdelerinin karşılaştırılması	33
4.7. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 3'ün aktarıldığı besin ortamlarına göre eksplantların kontaminasyon ve kararma durumları.....	34
4.8. Genotip 1'e ait eksplantlarda elde edilen sürgün oluşum yüzdeleri	36
4.9. a) 16 ve b) 17 no'lu modifiye MS ortamlarında görülen Genotip 1'e ait sürgün gelişimleri	36
4.10. Sürgün oluşumu gözlenen ve yine 18 no'lu ortama altkültüre alınan Genotip 1'e ait eksplant.....	36
4.11. Sürgün oluşumu gözlenen ve yine 17 no'lu ortamda altkültüre alınan Genotip 1'e ait eksplant.....	37
4.12. Genotip 1'de sürgün oluşumu görülen eksplant	37

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.13. Genotip 2’de yapraklardan doğrudan oluşan kökler	38
4.14. 22 no’lu ortamdaki Genotip 2’ye ait eksplantlarda görülen gelişmeler. a ve b) oluşan sürgünler, c ve d) gelişen sürgün ve kökler.	39
4.15. Genotip 3’e ait a ve b) 8 no’lu ortamda oluşmaya başlayan sürgünler. c ve d) 9 no’lu ortama aktarılan sürgünlerin gelişimleri	40
4.16. Genotip 3’e ait gelişimlerini sürdüren sürgünler	41
4.17. Genotip 3’e ait üçüncü altkültürlemeden sonra kararmaya başlayan sürgünler	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Kullanılan biberiye genotiplerinin kökenleri.....	15
3.2. White, MS, B5 ve VW ortam bileşenleri.....	16
3.3. Modifiye olarak kullanılan ortamlar.....	18
3.4. Genotip 1'den alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon yöntemleri.....	19
3.5. Genotip 2'den alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon yöntemleri.....	20
3.6. Genotip 3'den alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon yöntemleri.....	20
3.7. Genotip 1'e ait nod eksplantlarının alındıkları besin ortamları.....	21
3.8. Genotip 2'ye ait nod eksplantlarının alındıkları besin ortamları.....	23
3.9. Genotip 3'e ait nod eksplantlarının alındıkları besin ortamları.....	24
4.1. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 1'in kontaminasyon ve kararma durumları.....	26
4.2. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 2'de görülen kontaminasyon ve kararma durumu.....	29
4.3. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 3'e ait eksplantlarda görülen kontaminasyon ve kararma yüzdeleri.....	32
4.4. Genotip 1'e ait nod eksplantlarında elde edilen sürgün sayısı ve yüzdesi.....	35
4.5. Genotip 2'ye ait eksplantlarından elde edilen sürgün sayısı ve yüzdesi.....	38
4.6. Genotip 2'ye ait nod eksplantlarının köklenme yüzdesi.....	39
4.7. Genotip 3'e ait eksplantlarından elde edilen sürgün sayısı ve yüzdesi.....	41

1. GİRİŞ

Lamiaceae familyasına dahil olan *Rosmarinus officinalis* L. (kuşdili, biberiye, hasalban, akpüren), çok eskiden beri kültürü yapılan ve esas kökeni Akdeniz Bölgesi olan bir bitkidir. Biberiye bitkisi 50-100 cm yükseklikte, çalı görünümünde, yapraklarını dökmeyen, soluk mavi renkte çiçeklere sahip, her daim yeşil çok yıllık bir bitkidir (Baytop, 1984) (Şekil 1).

Türkiye'nin batı ve güney kıyılarında doğal olarak yetişmekle birlikte yaygın olarak Çanakkale, Mersin, Adana, Tarsus, Hatay illerinde özellikle Mersin ve Adana yöresinde maki florası içerisinde, orman içi boşluklarda, tarla ve üzüm bağları kenarlarında, koruma altındaki ağaçlandırma sahaları içerisinde geniş yayılım göstermektedir. Türkiye'de biberiyenin kültürü yapılmamasına rağmen Fransa, İtalya, İspanya, Portekiz, Yunanistan gibi ülkelerde ekimi ve kültürü yaygındır (Malayoğlu, 2010).



Şekil 1.1. *Rosmarinus officinalis* L. genel görünüşü

Rosmarinus officinalis L., yapraklarının antioksidan özelliklerinden dolayı en yüksek antioksidan aktiviteli baharatlardan biri olarak kabul edilmektedir. Baharat olarak kullanılmasının yanı sıra, güçlü antibakteriyel ve antimutajenik özelliklerinden dolayı tıbbi amaçlı olarak değerlendirilebilmektedir (Wang et al., 2008).

Biberiye bitkisinden % 1-2.5 arasında uçucuğu yağ elde edilmektedir. Bu uçucu yağda temel olarak %20-25 arasında 1,8-cineole, %15-25 arasında α -pinene, %10-25 camphor ve diğer çeşitli oranlarda borneol, isobutyl acetate, camphene, limonene, linalool, 3-octanone, terpineol, verbenol, apigenin, diosmetin, diosmin flavonoidleri, rosmarinik asit ve diğer fenolik asitler, diterpenler, rosmarinin, ursolik asit, oleanolik asit ve türevlerini içermektedir. (Khare, 2007).

Biberiyede lezzet verici temel bileşik cineol'dür. Bunun yanında borneol, linalool, eucalyptol, camphor, bornyl acetate, α -pinene, camphene, sabinene, phellandrene ve α -terpinen de diğer lezzet verici bileşiklerdir. Ayrıca bunlardan karnosik asit, karnosol, rosmarinik asit ve rosmanol antioksidan özelliklere sahiplerken; borneol, 1,8-cineole, camphor ve bornyl asetat gıdaların korunmasında kullanılan bileşiklerdir (Sasikumar, 2004).

Biberiye bitkisinin ham, kurutulmuş veya ezilmiş olarak pazarlama olanağı bulunmaktadır. Ege İhracatçılar Meclisi'nin verilerine göre 2011 yılında Ege Bölgesi'nden ihraç edilen toplam biberiye miktarı 627.000 tona ulaşmış ve bundan ülkemize 1.557.000 dolar döviz girdisi sağlanmıştır. Bu rakamlarda Türkiye'den ham olarak ihraç edilen biberiye miktarı yaklaşık 94.000 bin ton olarak gerçekleşirken, ezilmiş ve öğütülmüş olarak ihraç edilen biberiye miktarı ise toplam 533.000 ton olarak gerçekleşmiş ve bundan 1.314.025 dolar gelir elde edilmiştir. Ezilmiş ve öğütülmüş olarak yapılan bu ihracatın büyük bir kısmı Ege Serbest Bölge'de gerçekleşmiştir (Ege İhracatçı Birlikleri, 2012).

Biberiye bitkileri tür içerisinde yaprak ve uçucu yağ verimi ve özellikle de uçucu yağdaki etken maddeler açısından çok farklılıklar gösterebilmektedir. Böyle üstün niteliklere sahip bireyleri klonlayarak yapılan çalışmalarda günümüze kadar çelikleme yöntemi kullanılmıştır. Ancak bu şekildeki üretimlerde bitki kısımları büyük parçalar halinde değerlendirilmektedir. Böylelikle belli özelliklere sahip bir bitkiden fidan üretimi de belli sayılarda yapılabilir. Ayrıca bitkilerin tohumla üretiminde yüksek oranda heterojenlik bulunduğu ve çelikle üretimde de çeşitli fungus, virüs ve bakteri zararlıları verim ve kalitede kayıplara yol açtığından sayıca üretim kısıtlanmaktadır (Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Müdürlüğü, 2010).

Bir tek bitkiden vejetatif olarak çoğaltılan ve aynı genotipi taşıyan bitkiler grubu bir "klon" oluşturmaktadır. Günümüzde geleneksel yöntemlerle vejetatif

retimi yavaş, zor hatta imkansız olan bazı bitkilerin klonal çoğaltımı *in vitro* kültürlerde sağlanabilmektedir. Ayrıca, mikroüretim, mevsime bağlı olmadan kontrollü koşullarda yıl boyunca yapılabilmektedir; ve çoğaltım potansiyelinin fazlalığı, stok bitkilerin muhafaza edilebilmesi, yer ihtiyacının az olması, olumsuz hava koşullarına, hastalık ve zararlılara karşı korunma gibi avantajları da vardır (Sökmen ve Gürel, 2001).

Günümüzde sentetik maddelerin kullanımının bir takım yan etkilerinin olması, özellikle ilaç ve besin sanayinde, doğal ürünlere karşı talebi arttırmaktadır (Sökmen ve Gürel, 2001). Bitkisel kökenli doğal ürünlerin elde edilmesinde, bitki doku ve hücre kültürü yöntemleri çevresel etkenlerden (iklim, mevsimsel kısıtlamalar) etkilenmeden, doğa tahribatı engellenerek, daha sabit kalitede ve verimlilikte üretimleri açısından uygun bir seçenek olarak görülmektedir.

Çalışmamızda; uçucu yağ oranının ve drog yaprak veriminin yüksek olduğu saptanan biberiye klonlarının *in vitro* koşullarda çoğaltımına yönelik olarak; farklı yüzeysel sterilizasyon yöntemleri kullanılarak kontaminasyon ve değişik uygulamalarla da kararmaların önlenmesi hedeflenmiş, daha sonra da eksplantlardan sürgün ve kök rejenerasyonlarının elde edilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1.Bitkisel Özellikleri

Biberiye bitkisinin gövdesi lifsi yapıda, ince, narin, çok dallı ve diktir. Genç dalları dört köşelidir. Yaprakları karşılıklı, sapsız ve kulakçısızdır. Yaprakları çam yapraklarına benzer. Yaprak ayası uzunca, oldukça etli, üst tarafı tüysüz, koyu renkli; alt tarafı ise çok tüylü ve beyazımtırak yeşil renklidir. Yaprak kenarları alt tarafa doğru kıvrık olup kışın yapraklarını dökmez. Yaprakları dil şeklinde, 2-3 cm uzunlukta, 2-4 mm genişliktedir. Yaprak ayası derimsi, dar, şeritsi veya mızraksıdır. Taban kısmı çok kısa sap şeklinde daralmıştır (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2012) (Şekil 2).



Şekil 2.1. *Rosmarinus officinalis* L. gövde ve yaprakları

Çiçekleri, dalların ucunda ve yaprak koltuklarında küçük topluluklar halindedir. Bütün sene çiçeklidir ve çiçekleri bir eksen üzerinde salkım şeklindedir. Çanak yaprakları tüp şeklinde, iki dudaklı ve çok tüylüdür. Taç yaprakları da tüp şeklinde ve iki dudaklıdır. Çiçekleri mavimsi beyaz, mor ve eflatun renklidir. Üst dudakta iki dar lop, alt dudakta üç dar lop bulunur. Alt dudağın orta lobu diğerlerinden daha büyük ve çukurdur. Stamenler iki tanedir. Filament, korolla tüpünden daha uzun, kıvrık, mor renklidir ve tabanında küçük bir diş yapısında çıkıntısı vardır. Dişi organ iki karpelli, stilusu uzun ve kıvrık, stigmatı iki parçalıdır. Çiçeklerinde nektarium bulunur. Meyvesi esmer, küçük fındıksı yapıdadır (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2012) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. *Rosmarinus officinalis* L. çiçeği

2.2. Tıbbi Özellikleri

Biberiye bitkisi genel olarak sindirim, dolaşım problemleri, kabızlık, idrar yolları enfeksiyonları, nöralji, depresyon, halsizlik, unutkanlık, uykusuzluk, egzama, siyatik, selülit, saç dökülmesi, romatizma, kas ağrıları, hafif spazmlar, kolestrol, karaciğer, migren, şeker, astım, bronşit, nefes darlığı, kansızlık, ağrı, dişeti iltihapları ve yara tedavisinde kullanılmaktadır. Ateş düşürücü ve idrar söktürücü etkiye sahiptir. Gıda, baharat, parfümeri, aromaterapi ve kozmetik sanayinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 2012).

Bitkinin çiçek ve yapraklarından elde edilen uçucu yağlar anti-inflamatuar, kanamayı durdurucu, antiseptik, mideyi iyileştiren ve karminatif etkiye sahiptir. Ayrıca haricen dolaşım bozukluklarına karşı da kullanılmaktadır. Çiçekli kısımları ve yaprakları karminatif ve diüretik etki gösterirken, biberiye kullanılarak yapılan buhar banyosu romatizma ve kasları rahatlatmaktadır. Yapraklar, hazımsızlık problemlerine, romatizmal hastalıklara ve dolaşım problemlerine karşı yardımcı tedavi olarak kullanılmaktadır. Karaciğer ve safrada iyileştirmelere yol açmaktadır. Farelerde yapılan çalışmalarda biberiyenin etanolik ekstraktı ve esansiyel yağının ilaçların neden olduğu karaciğer toksisitesini azalttığı ve kemik iliği hücrelerini baskıladığı gösterilmiştir (Khare, 2007).

Biberiyenin anti-inflamatuar etkisi rosmarinic asit, ursolic asit ve apigenin aracılığı ile sağlanmaktadır. Flavonoidler arasında disomin, kılcal damar kırılabilirliğine karşı rutin'den daha etkilidir (Rutin, quercetin ve rutinose'dan oluşan bir flavanoid). Biberiye yapraklarından ve uçucu yağından izole edilen

fenolik fraksiyon antioksidan aktiviteye sahiptir. Yapraklarının preslenmesiyle elde edilen suyu *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*'e karşı güçlü antibakteriyel etki göstermektedir. Boraks ile birlikte infüzyon halinde saç dökülmesine karşı saç yıkamada kullanılmaktadır. Kekik, lavanta ve sedir ağacından elde edilen esansiyel yağlarla birlikte biberiye yağının kısmi kelliğe karşı 7 ay boyunca uygulaması sonrasında %44 oranında saç gelişmesi sağlanmıştır (Khare, 2007).

Biberiye bitkisi antioksidan özelliklerini süperoksit radikallerinin tutulmasını, lipidlerin antioksidasyonun sağlanması ile ve metallerin şelatlanması yolu ile gerçekleştirmektedir. Deodorize edilmiş sıvı, monoherbal veya polimerbal form olarak ticari antioksidan formülasyonları bulunmaktadır (Sasikumar, 2004).

Yukarıda da belirtildiği gibi birçok özelliğe ve kullanım alanına sahip biberiye *Lamiaceae* familyasının en önemli bitkilerinden birisidir.

2.3. Biberiye ile İlgili Yapılan Çeşitli Çalışmalar

Guillen et. al. (1996), İspanya'da endüstriyel amaçlı kültürü yapılan *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia lavandulifolia* V., ve *Lavandula latifolia* M.'nin esansiyel yağ içeriklerini belirlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre biberiyenin esansiyel yağ içeriği daha önce çalışılan biberiye bitkilerinden lezzet anlamında daha zengin ve kompleks olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca farklı coğrafik bölgelerdeki biberiyelerin esansiyel yağları ile karşılaştırıldığında ortalama α -pinen ve 1,8-cineole miktarına sahip oldukları, ancak daha yüksek oranda camphor, verbenon ve linalool içerdikleri gösterilmiştir. Buna göre en büyük yüzde olarak terpen hidrokarbonları (%51) ile oksijen terpen türevleri (%41) kayda değer miktarlardır. Ayrıca bazı ester türevleri (%2), seskiterpen (%2) ve diterpen hidrokarbonlar da (%0.3) belirlenmişlerdir. Temel bileşen olarak camphor, α -terpinene ve 1,8-cineole bulunduğu belirtilmiştir.

Munne-Bosch and Alegre (2000a), tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, biberiye bitkisi kuraklık stresine maruz bırakılmıştır. Sonuçlara göre bu stres koşulları boyunca α -tocopherol miktarının birim kuru ağırlığa göre 9 kat, birim klorofil miktarına göre de 20 kat arttığı bildirilmiştir. Lutein ve β -carotene miktarının kuru ağırlık temelinde azalırken, birim klorofil miktarına göre lutein miktarının %80 arttığı ve beta-karoten miktarının ise sabit kaldığı belirlenmiştir. Ksantofil döngüsünün de-epoksidasyonunda geçici ve sürekli artış gözlenmiştir.

Son olarak karnosik asidin oksidasyonu sonucu yüksek oranda okside olmuş abietan diterpen izorosmanol miktarının 8 kat arttığını da belirlemişlerdir. Sonbahar yağmurları ile birlikte, ilk olarak su durumu, α -tocopherol ve violaksantin miktarı normale gelirken daha sonra fotosentetik pigmentler ve abietan diterpenler ikincil olarak artmıştır.

Barcelona'da (İspanya) bulunan ve Akdeniz ikliminde doğal olarak büyüyen biberiye yapraklarındaki fenolik diterpenlerin oluşumunu araştırdıkları çalışmada Munne-Bosch et al. (2000b), yaz ayları boyunca düşük yağmur ile birlikte yüksek güneş ışığının bitkide su ve ışık stresine neden olduğunu bildirmişlerdir. Temel diterpenlerden carnosic asit ve carnosol miktarının en yüksek olduğu dönem kış boyunca gözlemlenirken, en düşük miktarın yaz döneminde olduğu bildirilmiştir. Diğer tüm diterpenlerin miktarı ise mevsimsel döneme göre değiştiği gözlenmiştir. Karnosik asit miktarı yaprakların bağıl su miktarı ile ilişkili olarak artarken, artan güneş ışığı ve sıcaklıkla birlikte azalma göstermiştir. 11,12-di-O-metilizorosmanol ilk defa biberiye yapraklarında tespit edilmiştir.

Lahlou and Berrada (2003), üç farklı biberiye kemotipinden elde ettikleri esansiyel yağları, *Pediculus humanus capitis* bitinin sirkelerine *in vitro* olarak uygulayarak niticidal (sirke öldürücü) etkisini araştırmışlardır. Kemotip 1'in (Tabat kökenli) esansiyel yağının en etkili olduğu, bunu sırasıyla kemotip 2 (Errachidia kökenli) ve kemotip 3'ün (Oujda kökenli) esansiyel yağları izlemiştir. Bu kemotiplerin esansiyel yağlarının kimyasal analizleri farklılık göstermiştir. Belirlenen temel bileşikler arasında alkolik ve ketonik bileşikler, sirkeler üzerinde en etkili olanları olarak tespit edilmişlerdir. Gözlemlenen niticidal aktivitedeki farklılıklar, kullanılan teknik ve test edilen esansiyel yağların kimyasal kompozisyonu ile ilişkili bulunmuştur. Bu kemotiplerin coğrafi dağılımları da esansiyel yağlarının kimyasal yapılarındaki farklılıklara neden olduğu bildirilmiştir.

Gülbaba ve Özkurt (2002), Adana ve Mersin yöresinde biberiye üretimi yapılabilecek sahaların belirlenmesi amacıyla, biberiyelerin uçucu yağ ile kuru yaprak verimlerinin ve bunların mevsimsel değişimlerinin belirlenmesi, en uygun hasat zamanının saptanması ve bu tür üzerine ileride yapılacak ıslah çalışmalarının temelini oluşturacak bilgilerin üretilmesini amaçlamışlardır. En yüksek kuru yaprak verimi Dedeler/Tarsus popülasyonunda % 2.38 oranında nisan ayında bulunmuştur. En düşük yağ verimi ise Ziyarettepe/Karaisalı popülasyonunda % 1.51 oranında temmuz ayında bulunmuştur. Yağ verimlerinin

mevsimsel olarak değişimleri önemli bulunmakla beraber, ekim ayında genellikle düşük bulunmuştur. Kuru yaprak verimi olarak da en fazla Tarsus/Aladağlı popülasyonunda ekim ayında, en düşük (% 25.48) ise Çamtepe/Yumurtalık popülasyonunda yine ekim ayında bulunmuştur. Yaprak verimi mevsimsel olarak genelde nisan ayında düşük belirlenmiştir.

Nartop (2005) İzmir koşullarında yetişen üç biberiye bitkisinin yaprak ve sap eksplantlarının öncelikle aydınlık ve karanlık koşullarda altı değişik besin ortamındaki kallus oluşturma potansiyellerini incelemiştir. Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen yaprak ve sap parçaları, aydınlık ve karanlık koşullarda farklı konsantrasyonda NAA içeren (1mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L) MS ve aynı konsantrasyonda NAA içeren WPM besin ortamlarında kallus elde edilmek üzere kültüre alındıklarında, aydınlık koşulların karanlık koşullara göre daha etkili olduğunu belirtmiştir. En hızlı büyümenin aydınlık koşullarda sap eksplantı üzerinde gelişen yeşil kalluslarda görüldüğü ve ellialtıncı günde ilk ağırlıklarının 16,4 katına ulaştığı belirtilmiştir. Ayrıca 1 mg/L NAA içeren WPM sıvı kültüründe suspansiyon kültürlerinin gelişimi de incelenmiş ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi analizlerinde tüm kallus örneklerinde karnosik asit ve rosmarinik asidin tespit edildiği bildirilmiştir. En yüksek değerler karnosik asit için 116,71 ppm, karnosol için 1,44 ppm ve rosmarinik asit için 114,91 ppm olarak saptamıştır.

Zaouali et. al. (2005), Tunus'ta farklı bölgelerde bulunan on dört yabancı biberiye popülasyonundaki esansiyel yağ miktarları belirleyerek karakterize etmişlerdir. Populasyona göre değişmekle birlikte, toplam bileşiklerin %93.68-98.77'ni oluşturan 25 bileşik tanımlanmıştır. 1,8-cineole (%20.34-45.79), camphor (% 8.5-30.17), α -pinene (% 6.53-13.1) ve borneol (% 3.73-25) belirlenen temel bileşiklerdir. Ayrıca bileşiklerin ortalama yüzdesi popülasyonlar arasında önemli oranda değişmektedir; α -pinen, 1,8-cineole popülasyonlarda farklılaşan temel bileşenlerdir. Ayrıca bileşenlerin oranı ve doğası popülasyonların biyoklimatik aşamalarına göre değişmektedir ve derin farklılıklar belirlenmiştir. Üst kurak biyoklimada bulunan ve *Rosmarinus officinalis* var *troglodytorum*'un temsil ettiği popülasyonda yüksek oranda α -pinen, kamfor ve düşük oranda 1,8-cineole belirlenmiştir.

Yeşil-Çelikaş ve ark. (2007a) Çanakkale, İzmir ve Mersin'den dört farklı zamanda yabancı biberiye popülasyonlarından aldıkları biberiye örneklerine süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu uygulamış ve *in vitro* antioksidan

aktivitelerini incelemişlerdir. Aktif bileşenlerin miktarlarındaki çeşitliliğin farklı mevsim ve coğrafi bölgelere göre değiştiğini belirlemişleridir. Bileşenlerin miktarları Aralık 2003 ve Eylül 2004'te en yüksek olarak belirlemişlerdir. Ayrıca Eylül ayında toplanan bitkilerin diğer zamanlarda toplanan bitkilere göre daha yüksek aktif bileşen içerdiği ve daha iyi antioksidan kapasitesine sahip oldukları gösterilmiştir. Bölgelere göre değerlendirildiğinde Mersin bölgesinden toplanan bitkilerin daha iyi antioksidan aktivitesi ile sonuçlanan daha yüksek toplam fenol ve aktif bileşene sahip olduğu belirlenmiş ve ayrıca gıda endüstrisi için potansiyel değerleri gösterilmiştir.

Yeşil-Çeliktaş ve ark. (2007b) yılın dört farklı zaman aralıklarında ve üç farklı bölgeden topladıkları biberiyelerin metanolik ekstraktları ve esansiyel yağlarının antimikrobiyal aktivitelerini *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klensiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* ve *Candida albican*'a karşı test etmişlerdir. Sonuçta biberiyeden elde edilen esansiyel yağlar minimum inhibitör miktarı (MIC) olarak etki etmiştir. Sonuçlar test edilen bakterilerin esansiyel yağlara karşı hassas ve metanolik ekstraktlara karşı kısmi olarak hassas olduklarını göstermiştir. Test edilen bakterilere karşı, esansiyel yağların antimikrobiyal etkisi bitkilerin toplandığı bölgelere ve mevsimsel değişimlere göre farklı şekillerde gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Gachkar et. al. (2007) İran'da biberiye ve kimyon bitkilerinin esansiyel yağlarının kimyasal analiz ve biyolojik etkilerini belirlemişlerdir. *Cuminum cyminum* (kimyon) % 29.1 α -pinene, % 17.9 1,8-cineole ve % 10.4 linalool içerirken, *R.officinalis* % 14.9 α -pinene, % 7.43 1,8-cineole ve % 14.9 linalool içermektedir. Kimyonun esansiyel yağı *E.coli*, *S.aureus* ve *L.monocytogenes*'e karşı *R.officinalis*'in esansiyel yağından daha iyi antimikrobiyal etki gösterirken, biberiyenin radikal tutma kapasitesinin ve antioksidan özelliğinin kimyondan daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Wang et. al. (2008), *Rosmarinus officinalis* L'den elde ettikleri esansiyel yağın *in vitro* antioksidan aktivitesini kendi temel bileşiklerinin (1,8-cineole, α -pinen, β -pinene) antioksidan aktivitesi ile karşılaştırmışlardır. Esansiyel yağ (GC-MS) analizinde 19 bileşik belirlemişlerdir ve bu bileşikler yağın % 97.27'sini içermektedir. Bunlar % 27.23 1,8-cineole, % 19.43 α -pinene, % 14.26 camphor, % 11.52 kamphen, % 6.71 β -pinene içermektedir. *R.officinalis* esansiyel yağının DPPH testine serbest radikalleri tutma aktivitesi % 62.45, 1,8-sineol'ün % 47.7, α -

pinene'in % 45.61 ve β -pinene'in % 46.21 olarak belirlenmiştir. β -karoten testinde ise esansiyel yağın % 50 inhibisyon değeri (IC₅₀) % 2.04, 1,8-cineole'ün % 4.05, α -pinene'in % 2.28 ve β -pinene'in % 2.56 olarak belirlenmiştir. Genel olarak esansiyel yağın, kendi bileşiklerine göre her iki test sisteminde de daha iyi aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir ve test edilen örneklerin antioksidan aktivitelerinin miktar ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Sönmez (2008) Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan altı farklı biberiye popülasyonunun bazı agronomik ve teknolojik özelliklerini belirlemek amacıyla gerçekleştirdiği çalışmada, 2005 yılındaki gözlemlere göre ortalama olarak bitki boylarını 35,5-43 cm, herba verimini 529,42-879,56 kg/da, drog herba verimini 177,33-309,43 kg/da, drog yaprak verimini 123,87-218 kg/da ve uçucu yağ oranını % 0,64-1,8 aralığında saptamıştır. 2006 yılında ise bitki boylarının 49,5-59,9 cm, yeşil herba veriminin 2796,23-3875,26 kg/da, drog herba veriminin 657,82-901,29 kg/da, drog yaprak veriminin 940,92-1193,84 kg/da ve uçucu yağ oranının da % 0,59-2,72 arasında değiştiğini ifade ederek, uçucu yağın bileşiminde ise ilk yıl 1,8-cineole, camphor ve borneol, ikinci yıl ise 1,8-cineole, α -pinen, camphor ve borneol oranlarını yüksek olarak belirlemiştir.

Szumny et. al. (2010) kurutma metodunun *Rosmarinus officinalis*'in uçucu bileşiklerine olan etkisini değerlendirmişlerdir. Test edilen kurutma metodları konvektif (K), vakum-mikrodalga (VM), konvektif ön kurutma ve vakum mikrodalga son kurutma (K-VM) beraber gerçekleştirilmiştir. Taze biberiyelerdeki (135 g/kg) uçucu yağ miktarı her iki kurutma metodunda da önemli oranda azalmıştır (K için 87,2 g/kg, VM için 61,9 g/kg). K-VM ile kurutma metodunun ise daha kısa kurutma süresi (30 dk) ve aroma kalitesinden dolayı en iyi yöntem olarak belirlenmiştir.

Zaouali et. al. (2010) Tunus'da farklı biyoklimalarda endemik olarak büyüyen iki farklı biberiye çeşidinin (*Rosmarinus officinalis* var. *typicus* ve var. *trogodytorum*) esansiyel yağ içeriklerini GC ve GC-MS yöntemleriyle belirleyerek, esansiyel yağların antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir. Yağların kimyasal içeriklerinde tespit edilen çeşitliliğin farklı biyoklimalardan ziyade farklı çeşitlerden kaynaklandığını saptamışlardır. 1,8-sineol (%47,2-27,5) ve kamfor (%12,9-27,9) var. *typicus* ve var. *trogodytorum*'un temel bileşikler olarak saptanmışlardır. Test edilen bakterilere karşı yağların orta derecede etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca var. *trogodytorum*'dan elde edilen yağın, var. *typicus*'dan daha yüksek bakterisidal

aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. En yüksek antioksidan aktivitesi var. *trogodytorum*'da ve yukarı yarı-kurak alanlardaki var. *typicus* popülasyonlarında tespit etmişlerdir.

Napoli et. al. (2010) Sicilya'da bulunan yabani biberiye bitkilerinden elde ettikleri esansiyel yağların kantitatif ve kalitatif analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Sonuçlara göre hidrokarbon ve oksijenli formda monoterpenler en yüksek orana sahip bileşikler olarak tespit edilmişlerdir. Ayrıca genel olarak sineoliferum, verbenoniferum ve kamforiferum kemotiplerine ayrılan biberiye esansiyel yağlarının bu çalışmanın sonuçlarına göre Sicilya'daki yabani biberiyelerin çoğunun sineoliferum kemotipinde sınıflandırılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Beretta et. al. (2011) İtalya'da α -pinen kemotipindeki organik bir biberiye çeşidini üç farklı gelişimsel evrede (çiçeklenme, çiçeklenmeden sonra ve vejetatif evrede) toplayarak esansiyel yağ analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Yağların radikal tutma kapasitesi (IC_{50}) $36,78 \pm 0.38$, $79,69 \pm 1,54$, $111,94 \pm 2,56$ μL ve anti-lipoperoksidan aktivitesi (TBARS, IC_{50}) 0.42 ± 0.04 , 1.20 ± 0.06 μL , 4.07 ± 0.05 μL olarak belirlenmiş, her üç evrede de oldukça farklı değerler elde edilmiştir.

2.4. Biberiye ile İlgili Yapılan Doku Kültürü Çalışmaları

Biberiye bitkisinin doku kültürü ile ilgili yapılan çalışmalar, genel olarak mikroçoğaltım ve sekonder metabolit elde edilmesi olarak ikiye ayrılabilir. Özellikle mikroçoğaltım veya klonal çoğaltım ile ilgili yapılan çalışmalar çok az bulunmaktadır.

Banthorpe et. al. (1984), tarafından iki yıllık biberiye ve lavanta kalluslarındaki ve bu kalluslardan rejenere edilen sürgünlerin monoterpen özelliklerini ana dokudaki monoterpen özellikleri ile karşılaştırmışlardır. Çeşitli ortam, ışık ve sıcaklık rejimleri altında büyüyen kalluslarda veya ortam içinde belirlenebilir bir monoterpen birikimi gözlememişlerdir. Bu kalluslardan rejenere olan sürgünlerde ise ana dokudaki karakteristik monoterpenleri depoladıkları görülmüştür. Ayrıca yaklaşık 10 altkültürlemeden sonra (yaklaşık 8 ay) bazı alkan'ların biriktiğini belirlemişlerdir.

Misra and Chaturvedi (1984) biberiye bitkisinin doku kültürü yöntemi ile klonal çoğaltımı yapılması amaçladıkları çalışmada, *Rosmarinus officinalis*'in *genuina* çeşidinin *erectus* formunun tek nod gövde segmentlerinden klonal çoğaltımı gerçekleştirmişlerdir. Yaklaşık 2 cm uzunluğundaki nod ve sürgün

uçları, arazide büyüyen bitkilerden alınmış ve kesik uçları erimiş parafınle kaplanarak önce sıvı deterjan Teepol'da (% 5)'de 5 dk çalkalandıktan sonra 2 sn %95'lik alkolde bekletilmiştir. Daha sonra % 0.1'lik HgCl_2 'de sürgün uçları 3-5 dk, nod eksplantları 5-10 dk bekletilerek yüzey sterilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yüzey sterilizasyonundan sonra uç kısımlardan yaklaşık 2 mm uzaklaştırılarak üç kez steril sudan geçirilerek durulanmışlardır. Kültür başlatılmasında 0,1 mg/L IAA, 5.0 mg/L GA_3 , 5.0 mg/L askorbik asit ve 20 mg/L glutatyon içeren White (1943) ortamı kullanmışlardır. Sürgün çoğaltımı için 10 mg/L adenin sülfat, 0.1 mg/L IAA, 50 mg malt ekstrakt ve 20 mg/L sükroz içeren iki farklı modifiye MS ortamı kullanılmıştır. Ayrıca aseptik olarak büyüyen bitkilerden alınan sürgün uçlarından rejenerasyonun teşvikinde BAP'ın daha iyi sonuç verdiğini göstermişlerdir. 0.2 mg/L BAP'ın 30 gün içinde eksplant başına en fazla 14 sürgün tomurcuğu sayısı elde etmişlerdir. Daha sonra 0.25 mg/L indolpropiyonik asit içeren ortamda 7 gün içinde köklenme sağlanmıştır. *In vitro* olarak elde edilen bitkicikler daha sonra başarılı bir şekilde toprağa aktarılmışlardır.

Misra and Chaturvedi (1991) biberiye yapraklarında kaulogenesis (kallustan sürgün rejenerasyonu) teşvikinde besin ortamındaki sitokininle birlikte anorganik tuzların etkinliğini araştırmışlardır. Sonuçta büyüme hormonu yanında NH_4NO_3 ve KNO_3 'ın sürgün farklılaşması için gerekli olduğunu göstermişlerdir. Optimum sürgün farklılaşması için minimum miktarlarda 6-benzylaminopurine (BAP) ve indol-3-asetik asit (IAA) gerektiğini bildirmişlerdir (0.25 mg/L ve 0.1 mg/L). 1000 mg/L NH_4NO_3 ve 1500 mg/L KNO_3 en iyi miktarlar olarak belirlenmiştir. Benzer olarak CaCl_2 hariç diğer tüm organik tuzlar sürgün farklılaşması için gerekli bulunmuştur. Sürgün farklılaşmasının CaCl_2 varlığında engellendiğini belirtmişlerdir. Yaprakların bazal petiyolar kısımları en fazla rejeneratif potansiyele sahip kısımlar olarak tespit edilmiştir. Yapraklardan rejenere edilen bitkiler sera koşullarında topraklı saksıda normal olarak gelişimlerini sürdürmüşlerdir.

Yang et. al. (1997) biberiye bitkisinde yüksek rosmarinik asit içeren klonal hatların seleksiyonu için doku kültürü yöntemi ile mikrobiyal elisitör olarak *Pseudomonas* sp. F suşunun kullanıldığı bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Heterozigot biberiye tohumlarından *in vitro* olarak çimlenen bitkiciklerden alınan eksplantlar en iyi 1 mg/L benziladenin ve 2 mM prolin içeren Murashige ve Skoog ortamında çoğaltılmıştır. Daha sonra buradan elde edilen sürgünlerdeki sekonder metabolit üretimini arttırmak için *Pseudomonas* sp. F suşu ile inoküle

edilmişlerdir. Hızlı büyüyen ve mikrobiyal elisitörün teşvik ettiği yüksek rosmarinik asit içeren klonal hatlar seçilmiştir. Bu yöntemle 5 farklı klonal hat izole edilmiştir. Bu şekilde genetik olarak uniform fenotiplerin seleksiyonu biberiye bitkisinden sabit kalitede fenolik antioksidanların üretim potansiyelini sağlanabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca genetik olarak uniform klonal hatlar mikrobiyal elisitörlere tepki olarak fenolik antioksidan ile ilişkili biyosentetik yolların regülasyonunu anlamak için de kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Caruso et. al. (2000), biberiye bitkisinin yaprak ve nod segmentleinden elde edilen kallus ve bu kalluslardan rejenere edilen sürgünlerdeki karnosik asit miktarını belirlemişlerdir. Beş haftalık nodüler yeşil kallusların karnosik asit içermesine rağmen, yeşil olmayan, farklılaşmamış ve karanlıkta tutulan kalluslarda karnosik asit saptanmamıştır. Ayrıca rejenere edilmiş sürgünlerin köklerinde de karnosik asit tespit etmişlerdir.

Kuhlmann and Röhl (2006), biberiye bitkisinin farklı kültür tiplerini (sürgün kültürü, kallus kültürü ve hücre süspansiyon kültürü) oluşturarak bunların karnosik asit, karnosol ve rosmarinik asit biyosentezleme yeteneğini değerlendirmiş ve aynı klon bitkinin altkültürlerindeki miktarları ile karşılaştırmışlardır. Almanya'da Rühlemann's Krauter&Duftpflanzen'den elde ettikleri *Rosmarinus officinalis* cv. var. *Hangin*'in tohumlarını kullanmışlardır. Sonuçlar 17 aylık araştırma süreci boyunca sürgün ve süspansiyon kültürlerinin çeşitli miktarlarda karnosik asit ve karnosol biriktirdiğini, ancak süspansiyon kültürlerinde sürgün kültüründekinin 20-80 kat daha az olduğunu belirlemişlerdir. Süspansiyon kültürde sadece karnosik asit ve karnosol belirlenebilmiştir. Süspansiyon kültürdeki karnosik asit miktarı kallus kültüründe belirlenen miktardan üç kat daha azdır. Sürgün ve kallus kültürlerinde üretilen rosmarinik asit miktarı birbirine yakın olmasına rağmen süspansiyon kültüründe daha yüksek miktarda rosmarinik asit belirlenmiştir. Ekstraktlardaki karnosik asit, karnosol ve rosmarinik asit içeriği hücre kültür tiplerinin farklılaşma derecesine bağlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Ekstraktların DPPH radikal tutma kapasitesi özellikle rosmarinik asit olmak üzere her üç fitokimyasalın miktarına bağlıdır. Ekstraktların anti-enflamatuar özelliği temel olarak bunların karnosik asit içeriği ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Yeşil-Çelikaş et. al. (2007c), biberiye bitkisinin gövde eksplantlarından elde ettikleri kallusları liyofilize ederek solvent ekstraksiyonu uygulamışlardır. 8 kallus ekstraktının aktif bileşenleri HPLC ile analiz edilmiş ve rosmarinic asit

baskın bileşik olarak belirlenmiştir. 1 mg/L NAA içeren WPM ortamında büyüyen hücrelerin 50 °C’de ekstraksiyonunda en yüksek rosmarinic asit miktarı belirlenmiştir (34,4 mg/g kuru ağırlık). Ayrıca kallusların antioksidan aktiviteleri toplam fenol testi, DPPH radikal tutma aktivitesi ve troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi ile *in vitro* olarak belirlenmiştir. Genel bulgulara göre 1 mg/L NAA içeren WPM ortamında yüksek antioksidan aktivitesi ile birlikte yüksek fenolik miktarı elde edildiği belirtilmiştir.

El-Belgati et. al. (2011) biberiye kallus kültürlerinin sekonder metabolit üretimini ve antioksidan özellikleri arttırmak için çeşitli dozlarda γ -radyasyonu (0, 5, 10, 15 ve 20 G) uygulamışlardır. Elde edilen verilere göre artan radyasyon dozlarına tepki olarak antioksidan savunma enzim miktarının da arttığı (APX, CAT, SOD ve GR) ve kimyasal bileşiklerin modifikasyona uğradığını göstermişlerdir. İndirgenmiş glutatyon (GSH), askorbik asit (AsA), toplam çözünebilir protein, toplam çözünebilir amino asit, toplam çözünebilir şeker miktarı ve PAL aktivitesi artan radyasyon dozları ile pozitif ilişkili bulunmuştur. Araştırmacılar sonuç olarak yüksek dozlardaki gama radyasyonunun biberiye kallus kültüründe toplam flavanoidleri ve toplam fenollerin sekonder metabolit birikimlerini olumlu yönde arttırdığını bildirmişlerdir.

Dong et. al. (2012) biberiye yapraklarından kallus teşviki ve bitki rejenerasyonunu etkileyen faktörleri araştırmak için gerçekleştirdiği çalışmada kültür ortamındaki yüksek sükroz miktarının kallus teşvikini arttırdığını göstermişlerdir. En iyi kallus teşvik ortamının %88.8 teşvik oranı 0.5 mg/L BAP, 0.5 mg/L NAA ve 50 g/L sükroz içeren MS ortamı olduğunu ve en iyi sürgün rejenerasyonu sağlayan ortamın %50 rejenerasyon oranı ile 1.5 mg/L BAP, 0.5 mg/L K ve 0.5 mg/L NAA içeren MS ortamında elde edildiğini bildirmişlerdir. 0.8 mg/L BAP ve 0.5 mg/L NAA içeren MS ortamında ise gelişim miktarı %300’den daha fazla oranda arttığını gözlemişlerdir. % 65 köklenme oranı ile 0.1 mg/L NAA içeren MS ortamının köklenme için en iyi ortam olarak belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar eksplantların steril olmasına rağmen, diğer sterilizasyon bileşiklerle beraber % 75 etanol içeren solüsyonların eksplantların ölümüne neden olduklarını belirtmişlerdir.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırmada materyal olarak farklı kökenli üç biberiye genotipi kullanılmıştır. Bu bitkilerden iyi gelişme gösteren ve yüksek uçucu yağa sahip olanlardan alınan sürgün örneklerinden nod eksplantları hazırlanmıştır. 1 ve 3 no'lu genotipler yüksek uçucu yağ oranına sahiptirler (Çizelge 3.1) (Şekil 3.1.a ve b).

Çizelge 3.1. Kullanılan biberiye genotiplerinin kökenleri

Kökeni	Ticari Firma	Ege Üniversitesi Botanik Bahçesi	Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Koleksiyonu Mersin kökenli Eshab-ı Keyf çeşidi
Genotip	1	2	3



Şekil 3.1a: *Rosmarinus officinalis*'ten alınan örnekler b: Eksplant haline getirilmiş gövde segmentleri

3.2. Metod

Araştırmada farklı genotiplerden alınan sürgün nod eksplantları çeşitli sterilizasyon yöntemleri kullanılarak steril edildikten sonra sürgün gelişimi için değişik hormon kombinasyonlarına sahip White (1943), MS (Murashige ve Skoog, 1962), B5 (Gamborg ve ark., 1968) ve VW (Vacin ve Went, 1949) besin ortamlarına aktarılmışlardır (Çizelge 3.2). Oluşan sürgünler alt kültürlemeler yapılarak geliştirilmeye çalışılmıştır. Besin ortamlarının hazırlanması,

eksplantların sterilizasyonu ve kültüre alınması ile ilgili yöntemler aşağıda detaylı şekilde sunulmuştur.

3.2.1. Besin ortamlarının hazırlanması

Araştırmada mineral maddeler, vitaminler, bitki büyüme düzenleyicileri ve agar içeren White, MS, B5 ve VW ortamları kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. White, MS, B5 ve VW ortam bileşenleri

Maddeler	White (mg/L)	MS	B5	VW
NH ₄ NO ₃	-	1650	-	-
KNO ₃	80	1900	2500	525
(NH ₄) ₂ SO ₂	-	-	134	500
K ₂ SO ₄	-	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂	278,72	-	-	-
Ca(PO ₄) ₂	-	-	-	200
MgSO ₄ .7H ₂ O	736,5	370	250	250
MnSO ₄ .4H ₂ O	6,5	22,3	10	0,075
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,0	8,6	2,0	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	0.025	0,025	-
H ₃ BO ₃	1,5	6,2	3,0	-
KH ₂ PO ₄	-	170	-	250
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	-	0.25	0,25	-
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	-	-	150	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	440	150	-
KI	0,75	0.83	0,75	-
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	0.025	0,025	-
myo-Inositol	-	100	100	-
Tritriplex(Na ₂ EDT	-	37,3	37,3	37,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,5	27,8	27,8	27,5
Nikotinik asit	0,5	0.5	1,0	-
Pridoksin-HCl	0,1	0.5	1,0	-
Tiamin-HCl	0,1	0.1	10	-
Glisin	3,0	2,0		-

Ortam Modifikasyonları: Çalışmada ayrıca sürgün oluşumu için White ve MS besin ortamları modifiye edilerek kullanılmıştır. White ortamının birinci modifikasyonunda KNO_3 miktarının 200 mg/L'ye çıkarılırken ikinci modifikasyonunda 2500 mg/L'ye çıkarılmıştır. Ayrıca orjinal White içeriğinde olmayan NH_4NO_3 , 1000 mg/L olarak ortama eklenmiştir. Benzer modifikasyon MS besin ortamında da gerçekleştirilmiştir. KNO_3 miktarı 2500 mg/L'ye çıkarılırken, NH_4NO_3 miktarı 1000 mg/L'ye indirilmiştir. Ayrıca bu ortamda Ca kaynağı olan CaCl_2 ve myo-inositol orijinal MS ortamının içeriğinden çıkarılmıştır. Bazı ortamlarda sürgün gelişimini teşvik etmek amacı ile ortamlara 50 mg/L malt ekstrakt ve 20 – 30 mg/L adenin sülfat eklenmiştir (Çizelge 3.7, 3.8, 3.9).

Antioksidan ve adsorban maddeler: Kullanılan modifiye ortamlar yanında eksplant kararmalarının engellenmesi için çeşitli miktarlarda antioksidan ve adsorbanlar tartılarak besin ortamlarına eklenmiştir. Antioksidan olarak 100 mg/L askorbik asit ve 20 mg/L glutasyon kullanılmıştır. Adsorban madde olarak ise 1-3 g/L aktif karbon, 1 g/L PVP ve 5 g/L silika jel kullanılmıştır (Çizelge 3.7, 3.8, 3.9).

Kültürün başlatılmasında ve sürgün gelişiminde kullanılan yarı katı besin ortamlarının hazırlanması için önceden oluşturulmuş stok çözeltilerden, 1 litre besin ortamı için gerekli olan miktarlar ve büyüme düzenleyicileri behere aktarılmıştır. 30 g/L sükroz eklendikten sonra ortam, distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Sükroz iyice çözüldükten sonra 1M NaOH ve HCl kullanarak pH 5.8'e ayarlanmıştır. 7 g/L agar ilave edildikten sonra sürekli karıştırılarak berraklaşınca kadar kaynatılan ortamlar, sıcak olarak cam kültür kaplarına dökülmüştür. Ağızları kapatılan kaplar, otoklavda 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmişlerdir.

Çizelge 3.3. Modifiye olarak kullanılan ortamlar

Maddeler	Modifiye White 1 besin ortamındaki miktarlar (mg/L)	Modifiye White 2 besin ortamındaki miktarlar (mg/L)	Modifiye MS besin ortamındaki miktarlar (mg/L)
NH_4NO_3	1000	1000	1000
KNO_3	2500	200	2500
K_2SO_4	-	-	-
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	278,72	278,72	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	736,5	736,5	370
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	6,5	6,5	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0	2,0	8,6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	-	-	0.025
H_3BO_3	1,5	1,5	6,2
KH_2PO_4	-	-	170
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	-	0.25
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	-	-
KI	0,75	0,75	0.83
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	0.025
Myo-Inositol	-	-	-
Tritriplex(Na_2EDTA)	-	-	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,5	2,5	27,8
Nikotinik asit	0,5	0,5	0.5
Pridoksin-HCl	0,1	0,1	0.5
Tiamin-HCl	0,1	0,1	0.1
Glisin	3,0	3,0	2,0

Eksplant hazırlığı: Çalışmamızda yıl içinde farklı aylarda olmak üzere bitki dallarına ait 7-8 cm boyundaki 5-6 nodlu sürgün parçaları kullanılmıştır. Bu eksplantlar tek nodlu olarak hazırlanmışlardır. Eksplantların farklı ortamlarda gösterdikleri tepkiler ve ortamların kararına ve sürgün oluşumu üzerine etkilerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen denemeler ışığında farklı ortamların yanı sıra, farklı sterilizasyon uygulamaları yapılarak en iyi sonucu veren yöntem esas alınmış ve 15 günde bir alt kültürlemeler yapılarak çalışmalara devam edilmiştir. Eksplantlar, bitkilerden Temmuz 2010 - Nisan-2012 dönemleri arasında temin edilmişlerdir.

3.2.2. Kültüre alınan eksplantların sterilizasyonu

Yukarıda belirtilen bitkilerin sağlıklı sürgünlerinden alınan tüm nod eksplantları, standart uygulama olarak önce sabunlu suda iyice yıkanıp daha sonra akan musluk suyu altında durulanmıştır. Durulanan eksplantlar akan musluk suyu altında yaklaşık 30 dk süreyle yıkanmışlardır. Daha sonra sterilizasyon işlemleri üç farklı aşamalarda gerçekleştirilmiştir.

- Ön uygulamalarda eksplantlar sterilizasyon sırasında gerçekleşen doku yıpranmalarının engellenmesi ve fungus kontaminasyonuna karşı farklı sürelerde fungusit (Agro-Captan 50 WP, N-(trichloromethylthio)cyclohex-4-eno1,2-dicarboximide) 3 g/L), askorbik asit (100 mg/L), antibiyotik (amoksisilin) ve/veya sitrik asitte (50 mg/L) bekletilmişlerdir.
- Sterilizasyon uygulamalarında eksplantlar laminar hava akışlı kabin içerisinde farklı sürelerde etil alkol (%70'lik), NaOCl (%0.5-2.0) veya HgCl₂ (%0.1 w/v) ile sterilizasyon işlemleri uygulanmıştır. Daha sonra 4 kez steril destile su ile durulanmışlardır.
- Son uygulamalarda ise eksplantlar PVP (Poli-vinil prolidon, 100 mg/L) ve/veya fungusitte (3 g/L Agro-Captan 50 WP) bekletildikten sonra steril filtre kağıdı üzerine bırakılarak fazla sularından arındırılmış ve besin ortamı içeren kaplarda kültüre alınmışlardır (Çizelge 3.4, 3.5, 3.6).

Çizelge 3.4. Genotip 1'den alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon yöntemleri

Ön uygulama	Sterilizasyon Yöntemleri			
	I	II	III	IV
Fungusit (Agro-Captan 50 WP)	3 g/L 30 dk	3 g/L 30 dk	-	-
Askorbik asit	100 mg/L 30 dk	100 mg/L 30 dk	-	-
Sterilizasyon bileşikleri				
Etil alkol	%70'lik 15-20sn	%70'lik 15-20sn	-	-
Tween-20	1 damla	1 damla	1 damla	1 damla
NaOCl	%1'lik 10 dk	%1'lik 15 dk	-	-
HgCl ₂	-	-	%0.1'lik (w/v) 5 dk	%0.1'lik (w/v) 7 dk
Son uygulamalar				
PVP	100 mg/L 30 dk	100 mg/L 30 dk	-	

Çizelge 3.5. Genotip 2’den alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon yöntemleri

Ön uygulama	Sterilizasyon Yöntemleri			
	I	II	III	IV
Fungusit (Agro-Captan 50 WP)	-	3 g/L 30 dk	3 g/L 1 sa	-
Askorbik asit	-	100 mg/L 30 dk	-	-
Antibiyotik	-	-	1 sa	-
Sterilizasyon bileşikleri				
Tween-20	1 damla	1 damla	1 damla	1 damla
NaOCl	% 1’lik 15 dk	% 0.5’lik 15 dk	% 1’lik 15 dk	% 2’lik 15 dk
PVP	30 dk	30 dk	-	-

Çizelge 3.6. Genotip 3’den alınan eksplantlara uygulanan sterilizasyon yöntemleri

Ön uygulamalar	Sterilizasyon uygulamaları										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Fungusit	-		-	10 dk	10 dk	1 sa	1sa	1sa		20 dk	
Askorbik asit	-		-	100 mg/L 10 dk	100 mg/L 10 dk	100 mg/L 30 dk		100 mg/L 30 dk	100 mg/L 20 dk	100 mg/L 30 dk	
Antibiyotik	-		-				1 sa	1 sa			
Sitrik asit	-		-			50 mg/L 30 dk					
Sterilizasyon bileşikleri	-		-								
Tween-20	-		-	1 damla	1 damla	1 damla		1 damla	1 damla	1 damla	1 damla
NaOCl	%0.5’lik 15 dk	%1’lik 15 dk	%1,5’luk 15 dk	%1’lik 10 dk	%1’lik 15 dk	%1’lik 15 dk	%1’lik 15 dk	%1’lik 15 dk	%1lik 6 dk	%1’likl 7 dk	%1’de 7 dk
PVP	-	-	-	25 dk	25 dk						
Fungusit (Agro-Captan 50 WP)	-	-	-	3g/L 25 dk	3 g/L 25 dk				10 dk		

3.2.3. Eksplantların kültür ortamına alınması

Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen nod eksplantarı sürgün teşviki için farklı sitokinin, oksin, antioksidan ve/veya adsorban maddeler içeren (Çizelge 3.7) besin ortamının bulunduğu kültür kaplarına her birine bir adet eksplant olacak şekilde aktarılmışlardır. Kültür kapları daha sonra gelişmeleri incelenmek üzere fotoperiyod koşullarına tutulmuşlardır. En iyi besin ortamını ve bileşimini bulmak üzere Genotip 1’den elde edilen eksplantlar 30 farklı besin ortamında (Çizelge 3.7), Genotip 2’den elde edilen eksplantlar 25 (Çizelge 3.8), ve Genotip 3’den alınan eksplantlar ise 13 farklı besin ortamında kültüre alınmışlardır (Çizelge 3.9). Genotip 2 ve 3’de her tekerrür yaklaşık 9-10 adet eksplant içermektedir. Ancak Genotip 1’de bir bitkiden az sayıda eksplant ön çalışma amacıyla alınmıştır. Bu nedenle tekerrürlerdeki eksplant sayıları 5-7 eksplant içermektedir.

Çizelge 3.7. Genotip 1’e ait nod eksplantlarının alındıkları besin ortamları

Ortam	Besin Ortamları	Bitki Büyüme Düzenleyicileri	Adsorban /Antioksidan Maddeler
1	White	0.5 mg/L IAA ve 5 mg/L GA ₃	100 mg/L Askorbik asit
2	White	0.1 mg/L IAA ve 5.0 mg/L GA ₃	100 mg/L askorbik asit+20 mg/L glutatyon
3	White	0.2 mg/L IAA ve 5 mg/L GA ₃	100 mg/L askorbik asit+20 mg/L glutatyon
4	White	0.1 mg/L IBA ve 5 mg/L GA ₃	100 mg/L askorbik asit+20 mg/L glutatyon
5	White	-	100 mg/L askorbik asit+20 mg/L glutatyon
6	MS	0.2 mg/L BAP ve 0.01 mg/L NAA	-
7	MS	0.2 mg/L BAP ve 0.01 mg/L NAA ve 0.01 mg/L IBA	-
8	MS	0.3 mg/L BAP ve 0.1 mg/L IBA	-
9	MS	0.5 mg/L BAP ve 0.01 mg/L NAA	-
10	MS	1 mg/L BAP ve 0.02 mg/L NAA	-
11	MS	3 mg/L BAP ve 0.1 mg/L NAA	-
12	MS	4 mg/L BAP ve 0.1 mg/L NAA	-
13	MS	2 mg/L BAP, 0.05 mg/L NAA ve 5 mg/L GA ₃	-
14	MS	1 mg/L BAP, 0.01 mg/L NAA ve 10 mg/L GA ₃	-
15	MS	3 mg/L BAP, 0.1 mg/L IAA, 0.01 mg/L NAA ve 0.1 mg/L Kin	-

Çizelge 3.7.(devam) Genotip 1'e ait nod eksplantlarının alındıkları besin ortamları

16	Modifiye MS 1	-	50 mg/L malt ekstraktı, 20 mg/L adenin sülfat (CaCl ₂ ve myo-inositol yok)
17	Modifiye MS 1	0.01 mg/L BAP	50 mg/L malt ekstraktı, 20 mg/L adenin sülfat (CaCl ₂ ve myo-inositol yok)
18	Modifiye MS 1	0.05 mg/L BAP	50 mg/L malt ekstraktı, 20 mg/L adenin sülfat (CaCl ₂ ve myo-inositol yok)
19	Modifiye MS 1	0.1 mg/L BAP	50 mg/L malt ekstraktı, 20 mg/L adenin sülfat (CaCl ₂ ve myo-inositol yok)
20	Modifiye MS 1	0.2 mg/L BAP	50 mg/L malt ekstraktı, 20 mg/L adenin sülfat (CaCl ₂ ve myo-inositol yok)
21	MS	-	pH 5.8
22	MS	-	pH 5.5
23	MS	-	pH 6.2
24	MS	0.1 mg/L BAP	-
25	MS	1 mg/L BAP	-
26	Modifiye White 1	0.1 mg/L IAA, 5 mg/L GA ₃	30 mg/L adenin sülfat, 1 g/L aktif karbon, 50 mg/L malt ekstraktı
27	Modifiye White 1	1 mg/L BAP, 0.02 mg/L NAA	30 mg/L adenin sülfat, 1 g/L aktif karbon, 50 mg/L malt ekstraktı
28	Modifiye White 1	0.5 mg/L IBA, 5 mg/L GA ₃	30 mg/L adenin sülfat, 1 g/L aktif karbon, 50 mg/L malt ekstraktı
29	Modifiye White 1	2.5 mg/L BAP	30 mg/L adenin sülfat, 1 g/L aktif karbon, 50 mg/L malt ekstraktı
30	Modifiye White 1	4 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA	30 mg/L adenin sülfat, 1 g/L aktif karbon, 50 mg/L malt ekstraktı

Çizelge 3.8. Genotip 2'ye ait nod eksplantlarının alındıkları besin ortamları

Ortam	Besin Ortamları	Bitki Büyüme Düzenleyicileri	Adsorban/Antioksidan Maddeler
1	White	0.1 mg/L IAA ve 5 mg GA ₃	1 g/L Aktif karbon
2	White	0.5 mg/L IAA ve 5 mg/L GA ₃	1 g/L Aktif karbon
3	White	0.1 mg IBA ve 5 mg GA ₃	1 g/L Aktif karbon
4	White	0.5 mg IBA ve 5 GA ₃	1 g/L Aktif karbon
5	White	0.1 mg/L BAP ve 5 mg/L GA ₃	1 g/L Aktif karbon
6	White	0.5 mg/L BAP ve 5 mg/L GA ₃	1 g/L Aktif karbon
7	White	0.1 mg/L K ve 5 mg/L GA ₃	1 g/L Aktif karbon
8	White	0.5 mg/L K ve 5 mg/L GA ₃	1 g/L Aktif karbon
9	Modifiye White 2	0.2 mg/L BAP ve 0.01 mg/L NAA	-
10	Modifiye White 2	1 mg/L BAP ve 0.02 mg/L NAA	-
11	Modifiye White 2	4 mg/L BAP ve 0.1 mg NAA	-
12	Modifiye White 2	0.3 mg/L BAP ve 0.01 mg/L NAA	-
13	Modifiye White 2	0.1 mg/L IAA ve 5 mg/L GA ₃	-
14	VW	0.1 mg/L IAA ve 5 mg GA ₃	-
15	VW	0.5 mg/L IAA ve 5 mg GA ₃	-
16	VW	0.1 mg/L BAP ve 5 mg/L GA ₃	-
17	VW	0.5 mg/L BAP ve 5 mg/L GA ₃	-
18	VW	0.1 mg/L K ve 5 mg/L GA ₃	-
19	VW	0.5 mg/L K ve 5 mg/L GA ₃	-
20	VW	0.1 mg IBA ve 5 GA ₃	-
21	VW	0.5 mg IBA ve 5 GA ₃	-
22	B5	0.1 mg/L IAA ve 5 GA ₃	-
23	B5	0.1 mg/L BAP ve 5 GA ₃	-
24	B5	0.1 mg/L IBA ve 5 mg/L GA ₃	-
25	B5	0.1 mg/L K ve 5 mg/L GA ₃	-

Çizelge 3.9. Genotip 3'e nod eksplantlarının alındıkları besin ortamları

Ortam	Besin Ortamları	Bitki Büyüme Düzenleyicileri	Adsorban/antioksidan Maddeler
1	B5	0.1 mg/L BAP ve 5 mg GA ₃	0.5 g/L Aktif karbon
2	White	0.1 mg/L BAP ve 5 mg/L GA ₃	0.5 g/L Aktif karbon
3	B5	-	3 g/L aktif karbon ve 20 mg glutatyon
4	B5	-	1 g/L PVP
5	B5	-	5 g/L silika jel
6	B5	-	1 g/L Aktif karbon, 20 mg/L glutatyon ve 120 mg/L askorbik asit
7	B5	5 mg/L GA ₃	1 g/L Aktif karbon, 20 mg/L glutatyon
8	Modifiye White 1	2,5 mg/L BAP	1 g/L aktif karbon
9	MS	4 mg/L BAP ve 0.1 mg NAA	1 g/L Aktif karbon
10	White	4 mg/L BAP ve 0.1 mg/L NAA	1 g/L Aktif karbon
11	White	0.1 mg/L IAA ve 5 mg/L GA ₃	100 mg/L askorbik asit ve 20 mg/L glutatyon
12	White	0.1 mg/L IBA ve 5 mg/L GA ₃	100 mg/L askorbik asit ve 20 mg/L glutatyon
13	White	0.5 mg IBA ve 5 GA ₃	100 mg/L askorbik asit ve 20 mg/L glutatyon

3.2.4. Kültür koşulları

Kültürler, floresan ışığında 4.000 lux aydınlatmada, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta ve 24 ± 2 °C sıcaklıkta tutulmuşlardır.

3.2.5. Denemenin kurulması ve verilerin değerlendirilmesi

Araştırmamız farklı kökenli biberiyelerden alınan nod eksplantlarının sürgün oluşumu ve gelişimlerinin incelendiği denemeler şeklinde yürütülmüştür. Tek faktör olarak besin ortamlarının ele alındığı denememiz 3 tekerrürlü olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre oluşturulmuştur. Seçilen deneme desenine uygun olarak elde edilen verilerin değerlendirilmesinde TARİST istatistiksel analiz programı kullanılmıştır. Tüm değerlendirmelerde farklılıkların önem düzeylerinin ve boyutlarının saptanabilmesi için asgari önemli fark (AÖF) test yöntemi uygulanmıştır (Açıkgöz, 1988).

4. BULGULAR

4.1. Kontaminasyon ve Kararma Durumları

Çalışmadaki yıllık denemelerde, tüm genotiplerden her bir deneme için farklı sayıda (9-10) eksplant kullanılmıştır. Genotip 1 ile ilgili materyal az olduğundan 5-7 adet eksplant kullanılmıştır. Ayrıca bütün genotipler için farklı besin ortamlarında değişik sterilizasyon yöntemleri uygulanmış ve sonuçlar çizelgelerde ayrı ayrı ifade edilmiştir.

Kararma durumu biberiye bitkilerinin sterilizasyonu sırasında görülen yaygın bir durumdur. Özellikle sterilizasyon sırasında karşılaşılan ve steril ölüm denilen durum çoğu zaman kültürün başlatılmasında çok büyük bir sorun olmaktadır. Gerçekleştirilen sterilizasyon uygulamalarından sonra ortama alınan eksplantlarda 1-3 gün içerisinde kararmalar gözlenmiştir. Kararmalar yaygın olarak eksplantların meristem bölgelerinde gerçekleşirken daha sonra ortama salgılanan fenolikleri oksidasyonu sonucu ortam kararması şeklinde kendini göstermiştir. Bu amaçla sterilizasyon sırasında gerçekleşen kararmaları engellemek için birçok ön ve son uygulama gerçekleştirilmiştir.

4.1.1. Genotip 1'den alınan eksplantlarda gözlenen kontaminasyon ve kararma durumları

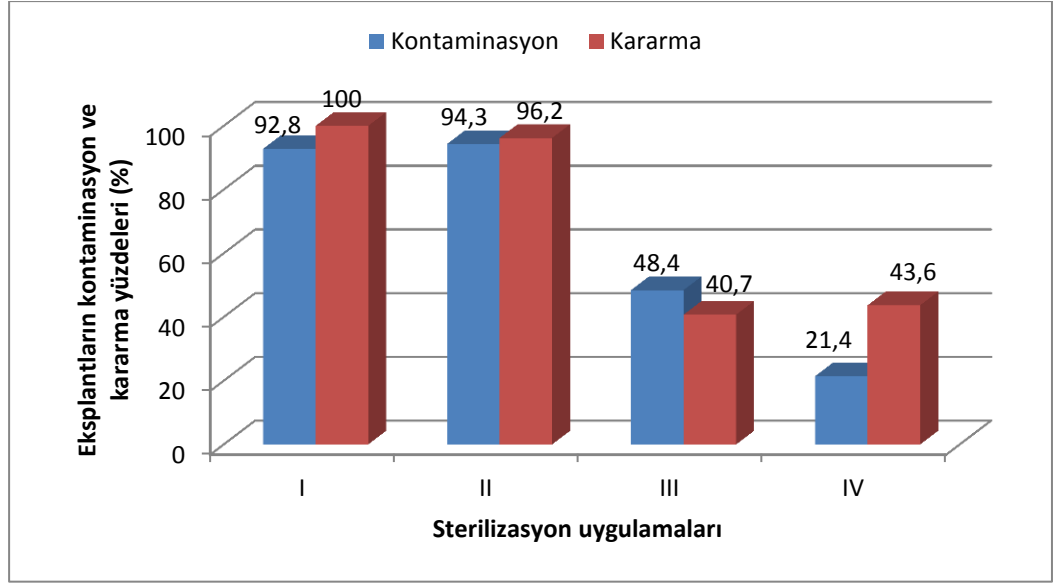
Çalışmada genotip 1'e ait toplam 548 adet eksplanta uygulanan farklı ön uygulamalar, sterilizasyon ve son uygulamalar sonucunda en yüksek kontaminasyon oranı I ve II. yöntemde elde edilirken (% 92,8 ve 94,3), % 0.1 HgCl₂'de 5 dk süreyle eksplantların tutulduğu III. sterilizasyon yönteminde de kontaminasyon önemli oranda azaltılmıştır (% 48,4). IV. sterilizasyon yönteminde en düşük kontaminasyon oranı belirlenmiş ve Genotip 1 için bu sterilizasyon yöntemi kullanılmıştır (% 21,4) (Çizelge 4.1, Şekil 4.1, Şekil 4.3).

Çizelge 4.1. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 1'in kontaminasyon ve kararma durumları

Sterilizasyon yöntemleri	I	II	III	IV
Eksplant sayısı (adet)	42	53	37	416
Kontamine eksplant sayısı (adet)	39	50	18	87
Kontaminasyon yüzdesi (%)	92,8	94,3	48,4	21,4
Kararan eksplant sayısı (adet)	42	51	15	178
Kararma yüzdesi (%)	100	96,2	40,7	43,6

Sterilizasyon uygulamaları sırasında en fazla kararma % 70'lik etil alkolün kullanıldığı I ve II no'lu sterilizasyon yönteminde belirlenmiştir (%100 ve % 96,2). Bu kararma tipleri, eksplantların kültüre alınmasından sonra 1-3 gün içerisinde gözlenmiştir. Dong ve ark., 2012'nin verdikleri bilgiye dayandırılarak, daha sonra kararmaların başlıca nedeninin etil alkolden kaynaklanabileceği düşüncesiyle daha sonraki uygulamalardan çıkartılmıştır (Şekil 4.2).

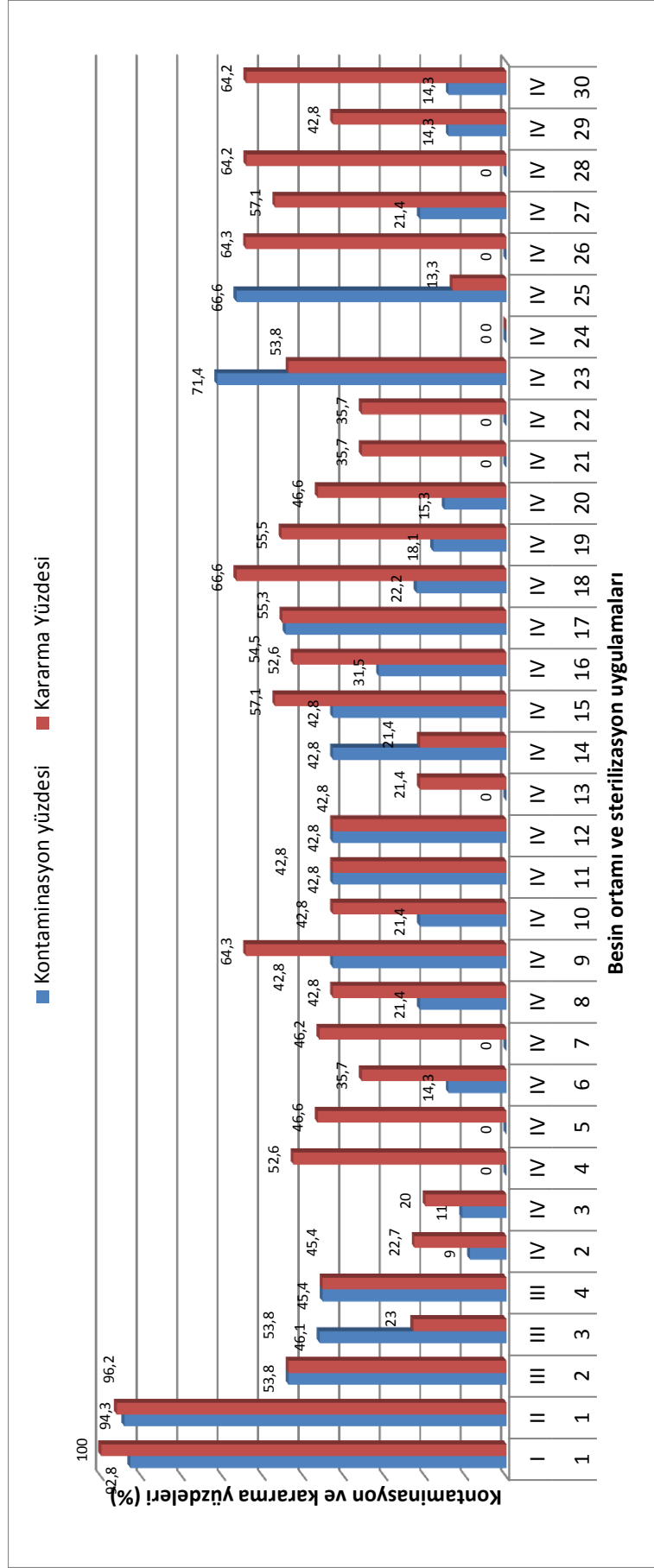
Genotip 1'in besin ortamlarına göre kararma durumlarının incelendiği deneme, tesadüf parselleri deneme desenine göre ve üç tekerrürlü olarak kurulmuştur. Şekil 4.3'de verilen kararma yüzdelere uygulanan istatistiksel analizde besin ortamlarının kararma üzerine etkisi %1 seviyesinde anlamlı bulunmuştur ($F= 4,243$). Ortalamaların karşılaştırılması için yapılan LSD testinde ($HKO = 225,849$; $LSD = 17,352$), 1 no'lu (White, 0.5 mg/L IAA, 5 mg/L GA_3 ve 0.1 g/L askorbik asit) besin ortamında eksplantlar % 100 kararma göstererek birinci gruba dahil olmuşlardır. % 21,66 kararma görülen 14 (1 mg/L BAP, 0.01 mg/L NAA ve 10 mg/L GA_3) ve 13 no'lu ortamlar (2 mg/L BAP, 0.05 mg/L NAA ve 5 mg/L GA_3) sekizinci grupta yer almaktadırlar. Hiç kararmanın görülmediği 24 no'lu (MS, 0.1 mg/L BAP) ortam onuncu grupta, %13,3 kararmanın görüldüğü 25 no'lu (MS, 1 mg/L BAP) ortam dokuzuncu grupta bulunmaktadır.



Şekil 4.1. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 1’de görülen kontaminasyon ve kararma yüzdelерinin karşılaştırılması



Şekil 4.2. Genotip 1’in aktarıldığı besin ortamı ve eksplantlarda görülen kararmalar



Şekil 4.3. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 1'in aktarıldığı besin ortamlarına göre eksplantların kontaminasyon ve kararma durumları

4.1.2. Genotip 2'den alınan eksplantlarda gözlenen kontaminasyon ve kararma durumları

Çalışmamızda genotip 2'ye ait 672 adet eksplant sterilizasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Eksplantlara yapılan sterilizasyon uygulamalarında yüksek oranlarda kontaminasyon ve kararmalar gözlenmiştir. Uygulanan sterilizasyon yöntemleri arasında en iyi uygulamanın % 34,9 kontaminasyon oranı ile I. sterilizasyon yöntemine ait olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.4).

Besin ortamlarına göre kontaminasyon dağılımı incelendiğinde en yüksek kontaminasyonun görüldüğü ortam 22, 23, 24 ve 25 no'lu ortamlar olarak belirlenmiştir. Bu ortamlara uygulanan sterilizasyon yöntemleri sırasıyla II., III., ve IV. uygulamalardır. En az kontaminasyon görülen besin ortamları ise I. yöntemin uygulandığı 4, 7 ve 8 no'lu ortamlar olarak belirlenmişlerdir (Şekil 4.5).

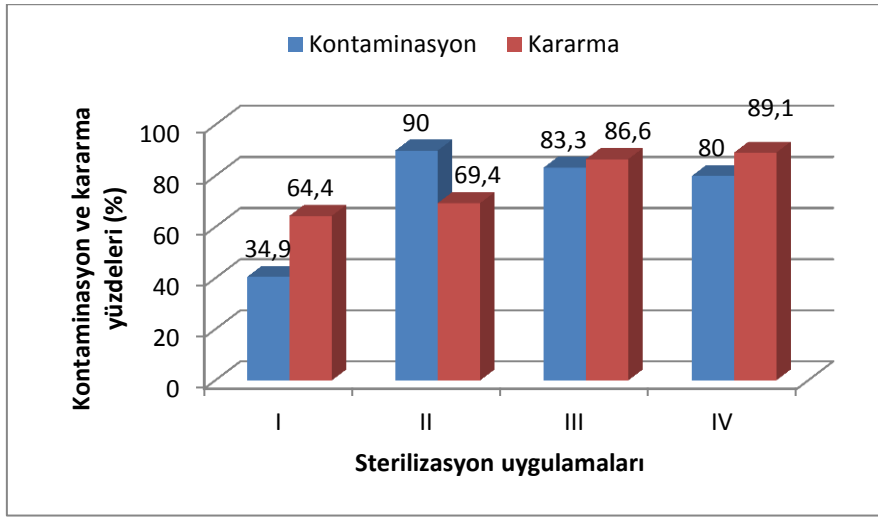
Çizelge 4.2. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 2'de görülen kontaminasyon ve kararma durumu

Sterilizasyon uygulamaları	I	II	III	IV
Eksplant sayısı (adet)	530	30	30	82
Kontamine eksplant sayısı (adet)	185	27	25	44
Kontaminasyon yüzdesi (%)	34,9	90	83,3	53,6
Kararan eksplant sayısı (adet)	376	21	26	72
Kararma yüzdesi (%)	70,9	69,4	86,6	87,8

Genotip 2'den alınan örneklerle uygulanan tüm sterilizasyon yöntemlerinde yoğun eksplant kararmaları gözlemlenmiştir. Tüm yöntemlerin değerleri birbirine yakındır, ancak en iyi yöntem I. ve II. sterilizasyon yönteminde elde edilmiştir (%70,9 ve 69,4). II. sterilizasyon uygulamasından sonra 22, 23, 24 ve 25 no'lu ortamlara aktarılan eksplantlar 1 hafta karanlık ortamda bekletilmişlerdir. Kararma gerçekleşmesine rağmen, diğer eksplantlara göre daha canlı bir görünüme sahip oldukları belirlenmiştir.

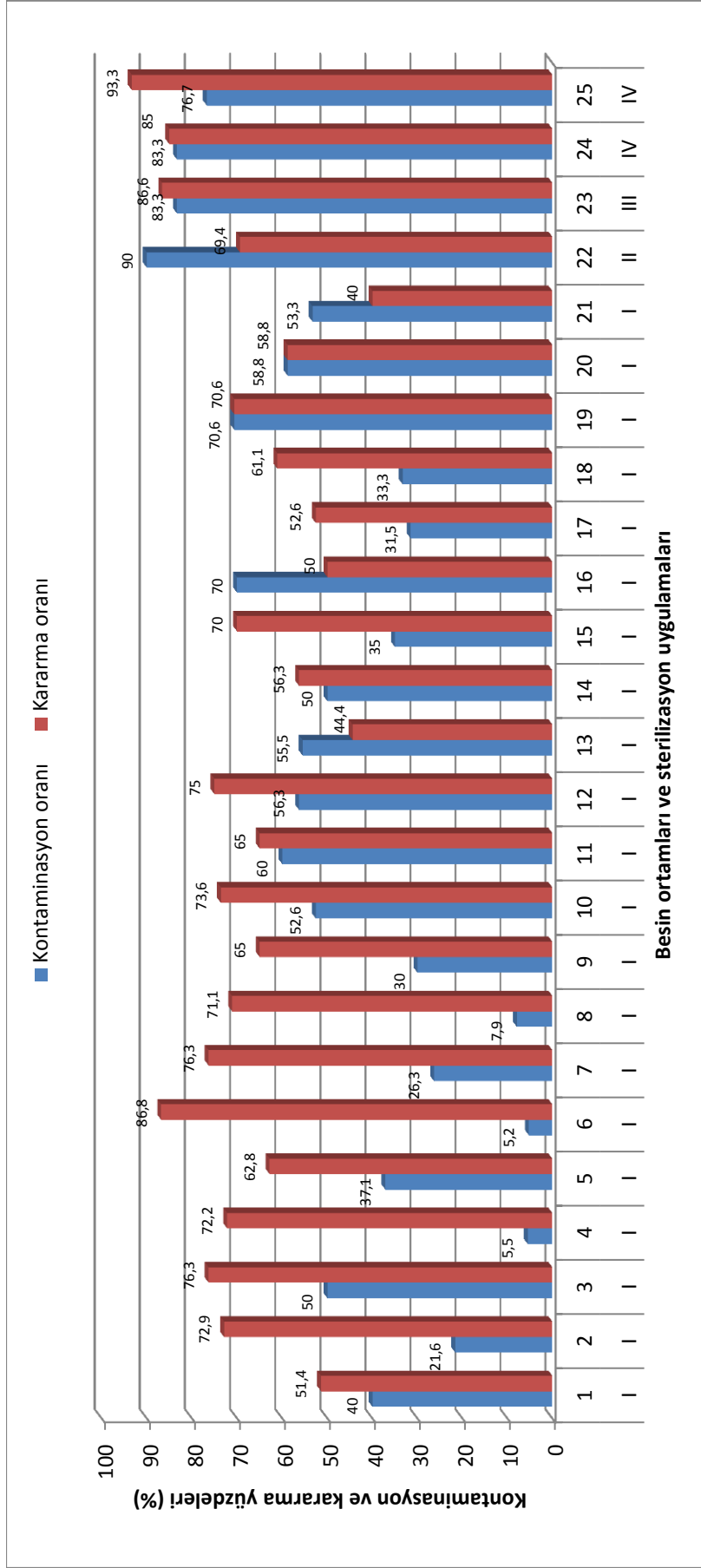
Genotip 2'in besin ortamlarına göre kararma durumlarının incelendiği deneme, tesadüf parselleri deneme desenine göre ve üç tekerrürlü olarak kurulmuştur. Şekil 4.6'te verilen kararma yüzdelere uygulanan istatistiksel analizde besin ortamlarının kararma üzerine etkisi %1 seviyesinde anlamlı

bulunmuştur ($F= 3,723$). Ortalamaların karşılaştırılması için yapılan LSD testinde ($HKO=152.747$; $LSD = 27.022$), % 93,3 ile en fazla kararma görülen 25 no'lu besin ortamı (B5, 0.1 mg/L Kin ve 5 mg/L GA_3) birinci grupta, % 51,4 kararma ile 1 no'lu ortam (White, 0,1 mg/L IAA, 5 mg/L GA_3 ve 1 g/L aktif karbon) on üçüncü grupta, % 44.4 kararma ile 13 no'lu ortam (Modifiye White, 0.1 mg/L IAA ve 5 mg/L GA_3) on dördüncü grupta ve % 40 ile en az kararma görülen 21 no'lu ortam (Vacin ve Went, 0,5 mg/L IBA ve 5 mg/L GA_3) on beşinci grupta yer almaktadır (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 2’de görülen kontaminasyon ve kararma yüzdelerinin karşılaştırılması

İstatistik analizinden sonra en az kararma meydana ortamlar incelendiğinde en iyi ortamın düşük tuz içeriğine sahip olan ve orkide ortamı olarak bilinen VW ortamında elde edilmiştir. 200 mg/L KNO_3 ve 1000 mg/L NH_4NO_3 içeren modifiye White ortamı ile normal White ortamı en iyi ortam olarak belirlenmiştir. B5 ortamı ise kararmanın en çok görüldüğü besin ortamı olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 2'nin aktarıldığı besin ortamlarına göre eksplantların kontaminasyon ve kararma durumları

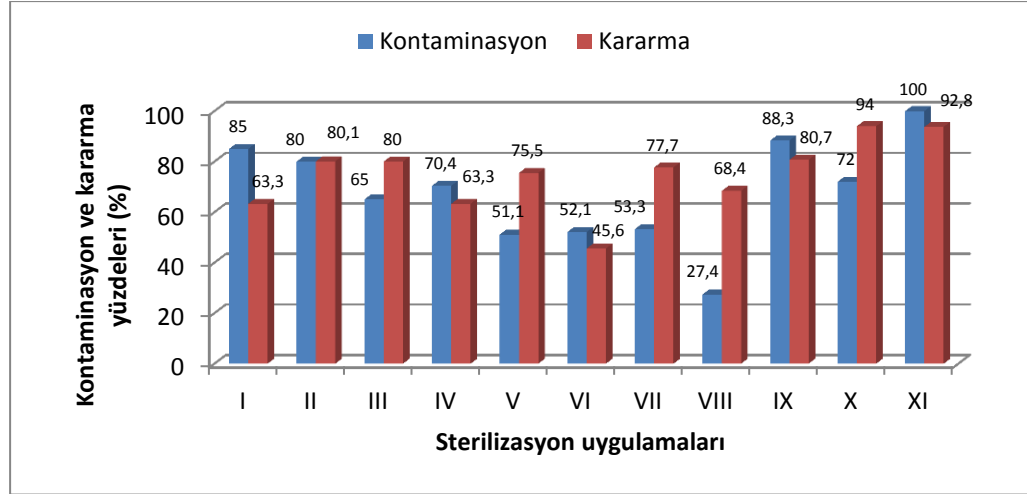
4.1.3. Genotip 3'ten alınan eksplantlarda gözlenen kontaminasyon ve kararma durumları

Çalışmamızda genotip 3'e ait 699 adet eksplant kullanılmıştır. Bitkilerden alınan eksplantların sterilizasyonu sonucunda en iyi kontaminasyon %27,4 ile VIII. sterilizasyon yönteminde elde edilmiştir. Ön uygulama olarak 1 saat fungusit ve antibiyotik içeren suda bekletme kontaminasyon oranını önemli oranda azaltmasına rağmen kararma oranı, %68,4 olarak elde edilmiştir. En az kararmanın görüldüğü yöntem olan VI. yöntemde ise %30,4 kararma olmasına rağmen, kontaminasyon oranı %51,1 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 3'e ait eksplantlarda görülen kontaminasyon ve kararma yüzdeleri

Uygulanan sterilizasyon yöntemleri	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Toplam eksplant sayısı (adet)	60	20	20	71	90	46	94	101	26	101	70
Kontamine olan eksplant sayısı (adet)	51	16	13	50	46	24	50	28	23	73	70
Kontaminasyon yüzdesi (%)	85	80	65	70,4	51,1	51,1	53,3	27,4	88,3	72,2	100
Toplam kararan eksplant sayısı (adet)	39	16	16	45	68	21	73	69	21	95	65
Kararma yüzdesi (%)	63,3	80,1	80	63,3	75,5	30,4	77,7	68,4	76,8	94	92,8

En fazla kontaminasyonun görüldüğü ortamlar 1, 8, 9, 10, 11, 12 ve 13 no'lu ortamlar olarak belirlenmiştir. Bu ortamlarda kontaminasyon seviyesi %80'den fazladır (Şekil 4.7).

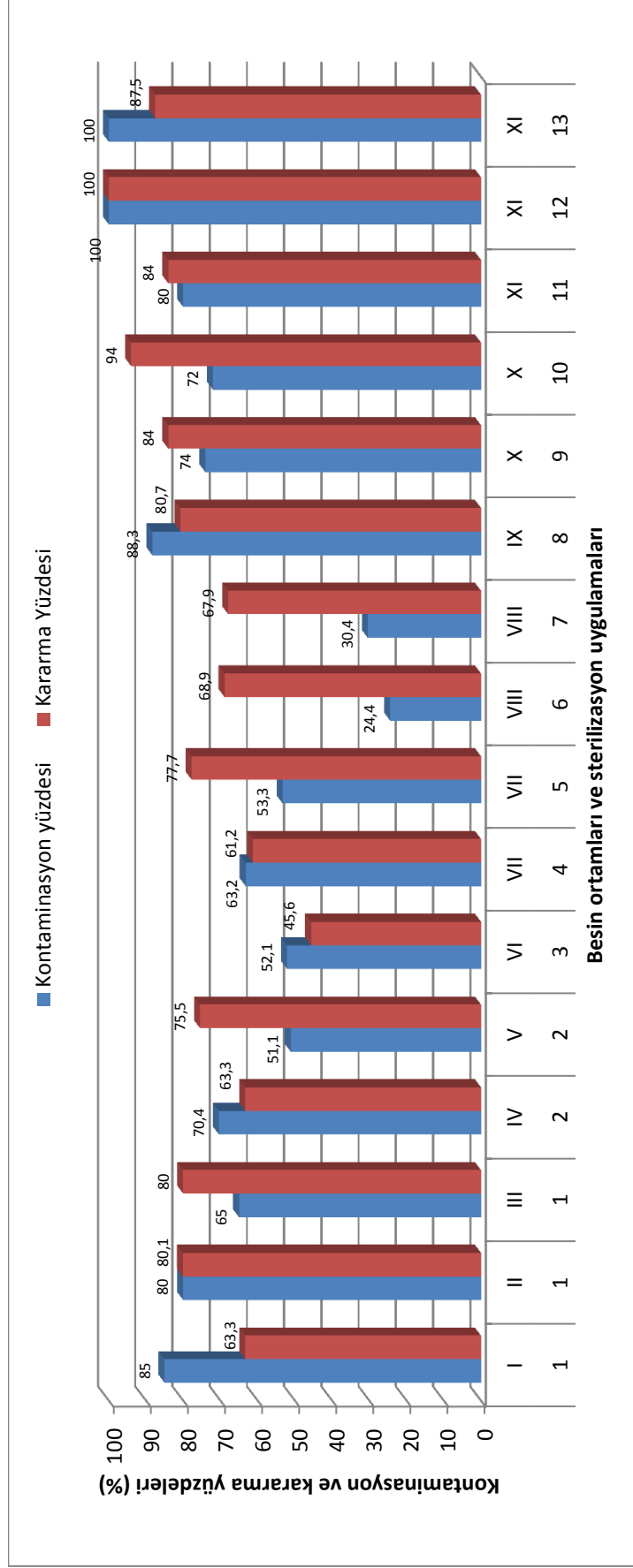


Şekil 4.6. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 3’de görülen kontaminasyon ve kararma yüzdelерinin karşılaştırılması

Eshab-1 keyf kökenli biberiye bitkisinin genç sürgünlerinden hazırlanan eksplantlarda sterilizasyon sonrası en az kararma VI. sterilizasyon uygulamasından sonra elde edilmiştir (% 30.4). VI. sterilizasyonda ön uygulama olarak eksplantlar 1 saat fungusitte bekletildikten sonra 30 dk askorbik asit ve sitrik asitte bekletilmişlerdir.

Genotip 3’ün besin ortamlarına göre kararma durumlarının incelendiği deneme, tesadüf parselleri deneme desenine göre ve üç tekerrürlü olarak kurulmuştur. Şekil 4.8’de verilen kararma yüzdelерine uygulanan istatistiksel analizde besin ortamlarının kararma üzerine etkisi %1 seviyesinde anlamlı bulunmuştur ($F= 17,998$). Ortalamaların karşılaştırılması için yapılan LSD testinde ($HKO = 35,359$; $LSD = 13,492$), % 100 ile en fazla kararma görülen 12 no’lu (White, 0.1 mg/L IBA, 5 mg/L GA3, 10 mg/L askorbik asit ve 20 mg/L glutatyon) besin ortam birinci grupta, % 66,6 kararma oranı ile 2 no’lu (White, 0.1 mg/L BAP, 5 mg/L GA3 ve 0.5 g/L aktif karbon) ortamı onuncu grupta, %61,6 kararma oranı ile 4 no’lu (B5, 1 g/L PVP) ortamı onuncu grupta, % 46 kararma ile 3 no’lu (B5, 3 g/L aktif karbon ve 20 mg/L glutatyon) besin ortamı on birinci grupta yer almaktadırlar.

Bu sonuçlara göre eksplant kararmalarını engellemek için besin ortamlarına eklenen antioksidan ve adsorban maddeler tek başlarına yeterli olmadığı, eksplantların yüzey sterilizasyonları sırasında gerçekleştirilen uygulamaların da kararmayı etkilediği görülmektedir. 12 no’lu besin ortamına aktarılan eksplantlar herhangi bir ön ve son uygulamaya maruz bırakılmadan direkt olarak %1’lik NaOCl içeresinden 7 dk’lık bir sterilizasyon prosedürü uygulanmış ve sonuç olarak en yüksek kararmaların görüldüğü besin ortamı olmuştur.



Şekil 4.7. Sterilizasyon uygulamalarından sonra Genotip 3'ün aktarıldığı besin ortamlarına göre eksplantların kontaminasyon ve kararma durumları

4.2.Kültüre alınan sap eksplantlarındaki gelişmeler

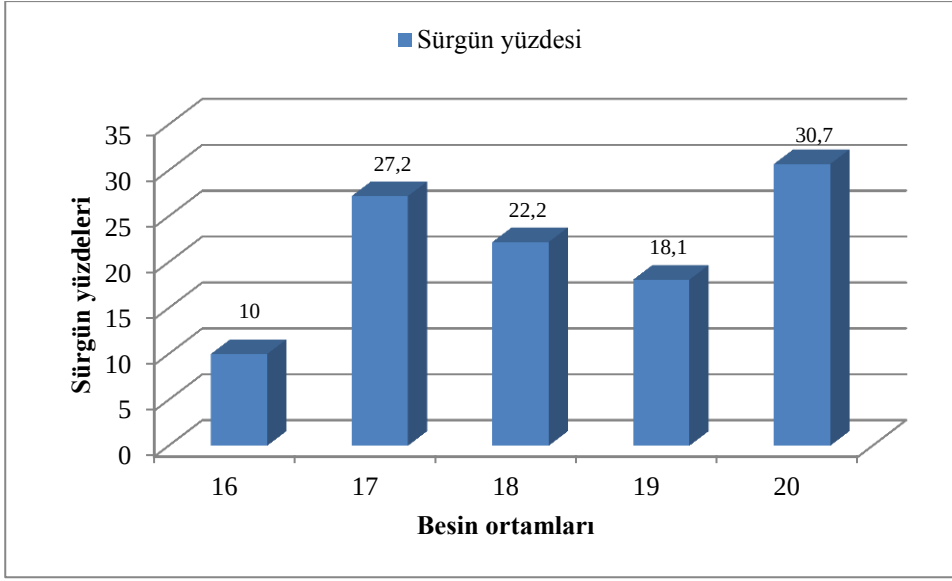
4.2.1. Genotip 1’de görülen gelişmeler

Genotip 1’e ait nod eksplantları toplam 30 farklı besin ortamına aktarılmışlardır. 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ve 14 no’lu besin ortamlarına alınan eksplantlar, ilk bir hafta iyi gözükmelerine rağmen sonradan herhangi bir gelişim gözlenmemiştir.

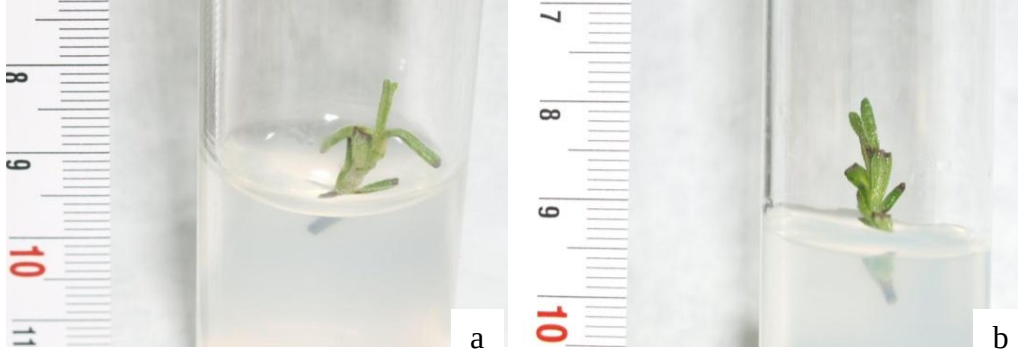
Ca^{++} kaynağının besin ortamından çıkarıldığı 16, 17, 18, 19 ve 20 no’lu ortamlarda çok zayıf sürgün gelişimleri gözlenmiştir. Tomurcuk oluşumu gözlenmeyen bu sürgünler, altkültüre alındıklarında da karararak canlılıklarını yitirmişlerdir. Ayrıca eksplantlarda herhangi bir kallus oluşumu görülmemiştir. Kullanılan besin ortamlarında % 10 – 30.7 oranında sürgün oluşumları elde edilmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.9).

Çizelge 4.4.Genotip 1’e ait nod eksplantlarında elde edilen sürgün sayısı ve yüzdesi

Besin ortamı	Eksplant sayısı (adet)			Sürgün veren eksplant sayısı (adet)	Sürgün yüzdesi (%)
	T1	T2	T3		
16	6	6	8	2	10
17	7	7	8	6	27,2
18	6	6	6	4	22,2
19	7	7	8	4	18,1
20	9	9	8	8	30,7



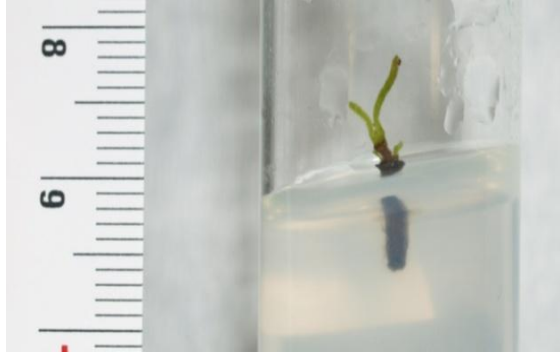
Şekil 4.8. Genotip 1'e ait eksplantlarda elde edilen sürgün oluşum yüzdeleri



Şekil 4.9. a) 16 ve b) 17 no'lu modifiye MS ortamlarında görülen Genotip 1'e ait sürgün gelişimleri

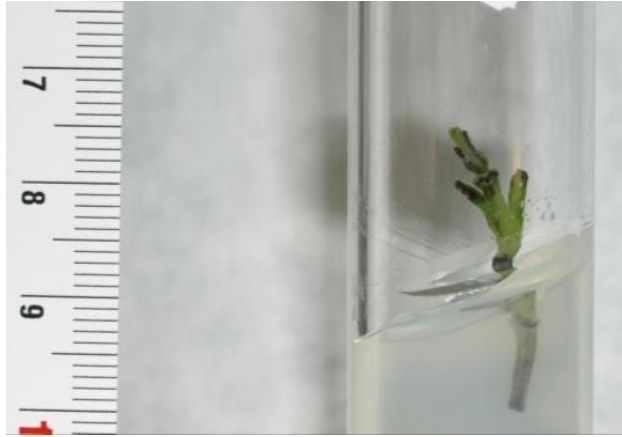


Şekil 4.10. Sürgün oluşumu gözlenen ve yine 18 no'lu ortama altkültüre alınan Genotip 1'e ait eksplant



Şekil 4.11. Sürgün oluşumu gözlenen ve yine 17 no'lu ortamda altkültüre alınan Genotip 1'e ait eksplant

Sürgün gelişimi açısından gözlenen bir diğer önemli durum ise genotip 1'in sterilizasyondan sonra ortama alınan eksplantların çoğunun 2 hafta içerisinde yapraklarını döktükleri ve sadece sap olarak kaldıkları gözlenmiştir. Daha sonra dökülen bu yaprakların yerlerinden yeni sürgün oluşumları başlamakla birlikte, oluşan bu yeni sürgünler de sonraki altkültürlemelerde canlılıklarını yitirmişlerdir.



Şekil 4.12. Genotip 1'de sürgün oluşumu görülen eksplant

4.2.2. Genotip 2'de görülen gelişmeler

Genotip 2'ye ait örneklerden hazırlanan nod eksplantlarında yüksek oranda kararma ve kontaminasyon sorunu gözlenmiş, sürgün rejenerasyonu ise elde edilememiştir. Ancak 11 no'lu ortamda yapraktan çıkan kök oluşumları görülmüştür (Şekil 4.13). Ayrıca 22 no'lu ortamda kontaminasyon olmasına rağmen, eksplantlarda % 6.7 oranında hem sürgün, hem de kök oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.13, Çizelge 4.5 ve 4.6).

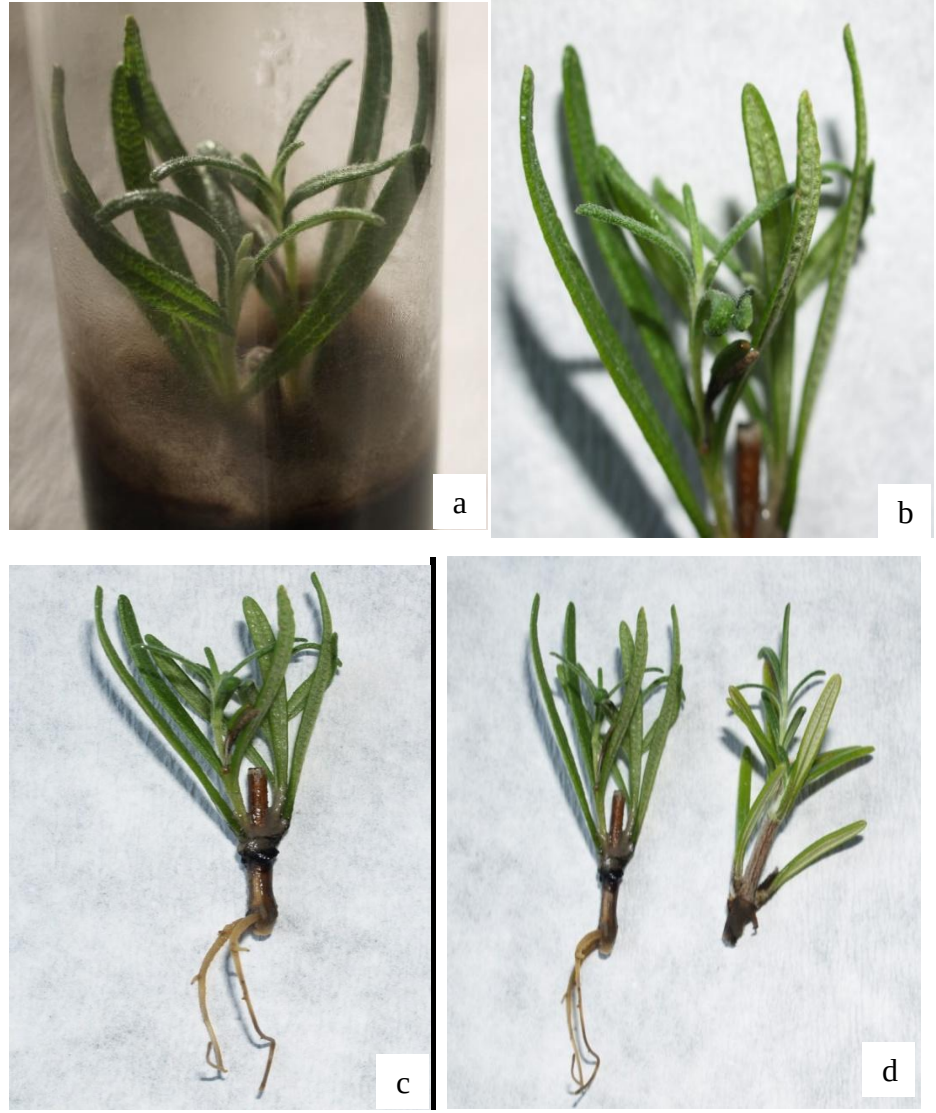


Şekil 4.13. Genotip 2’de yapraklardan doğrudan oluşan kökler

Çizelge 4.5. Genotip 2’ye ait eksplantlarından elde edilen sürgün sayısı ve yüzdesi

Besin ortamı	Eksplant sayısı (adet)			Sürgün veren eksplant sayısı (adet)	Sürgün yüzdesi (%)
	T1	T2	T3		
22	9	9	12	2	6,7

Kültürün başlatılması sırasında oluşan bu kök ve sürgünler, ortamda kontaminasyon ortaya çıkmasından dolayı altkültüre alınamamıştır. Ancak genel olarak değerlendirildiğinde yaklaşık 45 gün kültürde bekletilen eksplantlarda çok sağlıklı sürgün ve kök geliştirdikleri belirlenmiştir. Ayrıca bu genotipte herhangi bir kallus oluşumu meydana gelmemiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. 22 no'lu ortamdaki Genotip 2'ye ait eksplantlarda görülen gelişmeler. a ve b) oluşan sürgünler, c ve d) gelişen sürgün ve kökler.

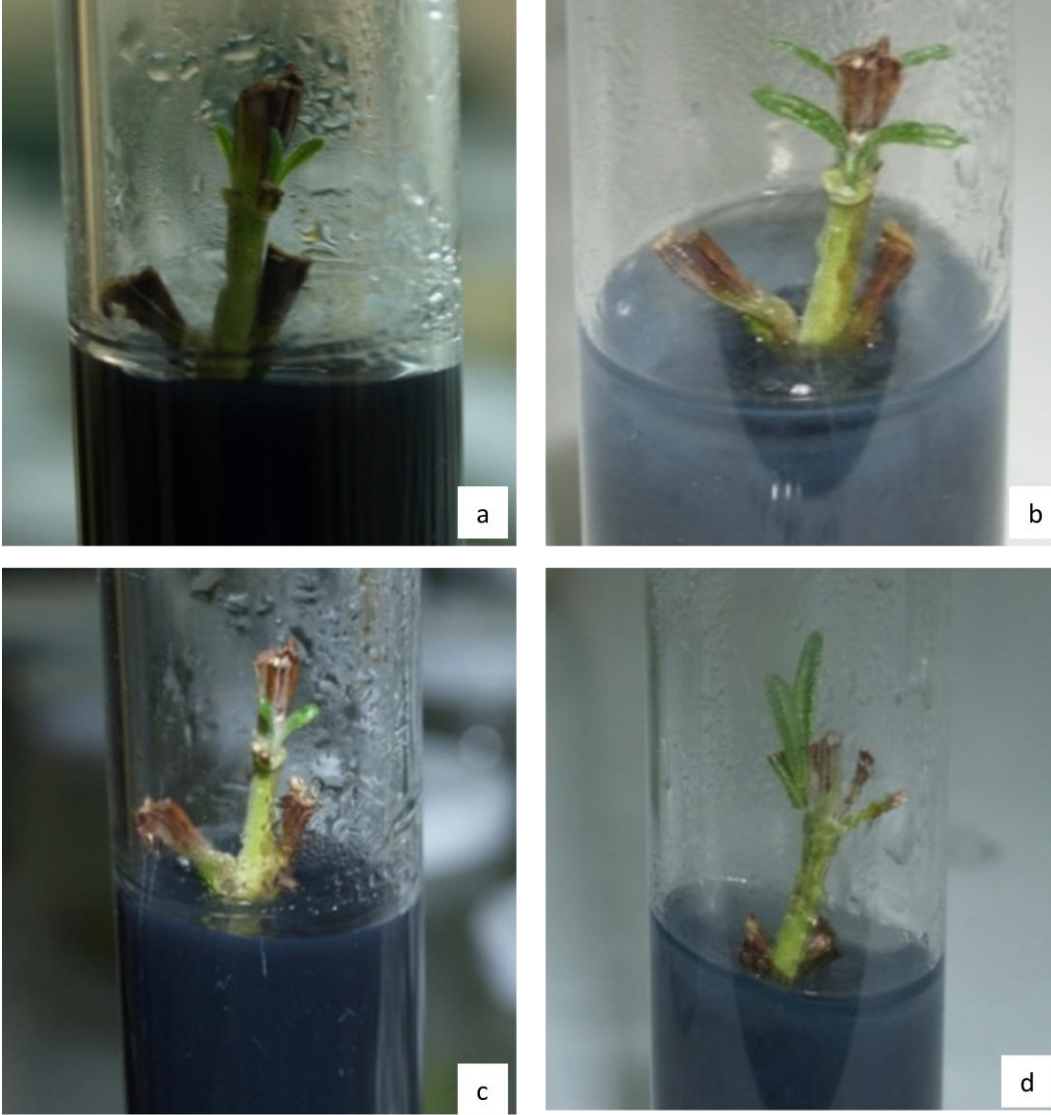
Çizelge 4.6. Genotip 2'ye ait nod eksplantlarının köklenme yüzdesi

Besin ortamı	Eksplant sayısı (adet)			Kök veren eksplant sayısı (adet)	Köklenme yüzdesi (%)
	T1	T2	T3		
22	9	9	12	2	6,7

4.2.3. Genotip 3'te görülen gelişmeler

Genotip 3'den alınan eksplantlarda da diğer genotiplerde olduğu gibi yüksek kontaminasyon ve kararma sorunları ile karşılaşılmasına rağmen, en iyi ortam

olarak % 7.6 sürgün oluşturma yüzdesine sahip 2,5 mg/L BAP ve 1 g/L aktif karbonun bulunduğu 8 no'lu modifiye White ortamı belirlenmiştir (2500 mg/L KNO_3). Bu besin ortamında 2 eksplant son derece iyi görünümlü sürgünler vermiş ve daha sonra bu sürgünler sürgün geliştirme ortamına aktarılmıştır. 10 ve 11 no'lu besin ortamlarında gelişmeye devam eden sürgünlerde 3. altkültürde kararmalar başlamış ve eksplantlar ölmüştür. Diğer genotiplerden elde edilen sürgünlerle karşılaştırıldığında bu sürgünler de gayet sağlıklı gözükmesine rağmen, daha sonraki altkültürlemelerde kararmaya başlayan bu bitkicikler ölmüşlerdir (Şekil 4.15, 4.16, 4.17).



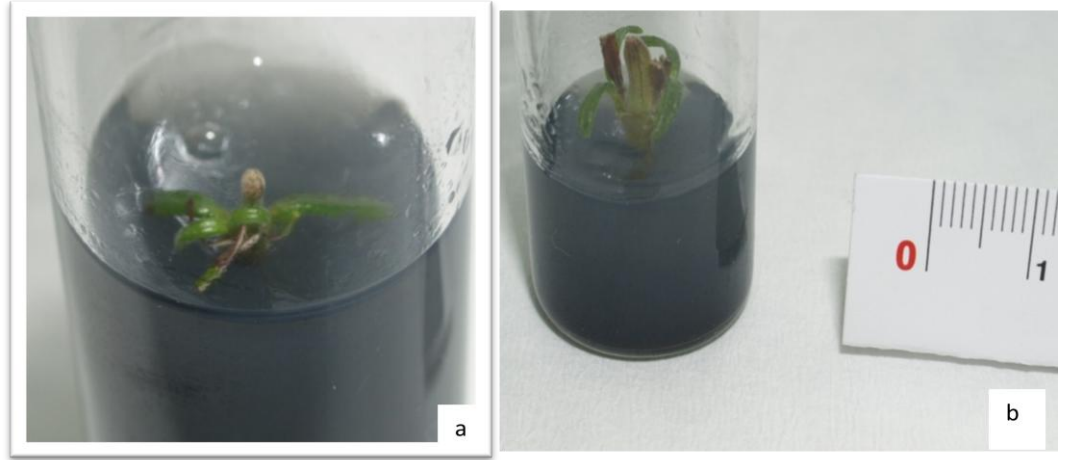
Şekil 4.15. Genotip 3'e ait a ve b) 8 no'lu ortamda oluşmaya başlayan sürgünler. c ve d) 9 no'lu ortama aktarılan sürgünlerin gelişimleri

Çizelge 4.7. Genotip 3'e ait eksplantlarından elde edilen sürgün sayısı ve yüzdesi

Besin ortamı	Eksplant sayısı (adet)			Sürgün veren eksplant sayısı (adet)	Sürgün yüzdesi (%)
	T1	T2	T3		
8	9	9	8	2	7.6



Şekil 4.16. Genotip 3'e ait gelişimlerini sürdüren sürgünler



Şekil 4.17. Genotip 3'e ait üçüncü altkültürlemeden sonra kararmaya başlayan sürgünler

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Eksplant kaynağı olarak ticari bir firmadan sağlanan biberiye bitkisi (Genotip 1), Ege Üniversitesi Herbaryum, Botanik Bahçesinden sağlanan biberiye (Genotip 2) ve Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi koleksiyonundan sağlanan Eshab-ı Keyf (Mersin kökenli) biberiye (Genotip 3) çeşitlerinden alınan nod eksplantları farklı sterilizasyon yöntemleri kullanılarak kültüre alınmışlardır.

Sürgün nod eksplantları ile yapılan çalışmada, en iyi sterilizasyon başarısı % 1'lik $HgCl_2$ 'nin kullanıldığı yöntemde %78,6 olarak elde edilmiştir. En az kararma oranı ise % 30,4 ile 1 saat fungusit, 30 dk askorbik asit ve sitrik asitte (50 mg/L) içeren solüsyonda bekletildikten sonra % 1'lik NaOCl'de bırakılan yöntemde sağlanmıştır.

Araştırmada besin ortamlarına göre eksplantların kararma yüzdeleri de incelenmiştir. 0.1 mg/L BAP (benzil adenin purin) içeren MS (Murashige & Skoog, 1962) ortamında kararma gözlenmemiştir.

Besin ortamlarına göre en iyi sürgün gelişimi; % 30.7 ile 0.2 mg/L BAP, 50 mg/L malt ekstrakt, 20 mg/L adenin sülfat içeren modifiye MS ortamında elde edilmiştir. Ayrıca 0.1 mg/ L IAA ve 5 mg/L GA_3 içeren B5 ortamına alınan eksplantlarda % 6.7 oranında kök oluşumları meydana gelmiştir.

Dong et. al. (2012) biberiyenin yaprak eksplantlarını % 75'lik (v/v) etanol ve % 2'lik (v/v) NaOCl'de bekleterek sterilizasyonlarını gerçekleştirdikleri çalışmalarında eksplantların % 85 oranında ölümü ile karşılaşmışlardır. % 75 etanol ve % 0.2 $HgCl_2$ 'de gerçekleştirdikleri sterilizasyon çalışmasında ise % 25 sterilizasyon başarısı ve % 90 ölüm oranı elde etmişlerdir. Sadece % 2'lik NaOCl ile gerçekleştirilen uygulamada ise % 80 kontaminasyon ve % 35 ölüm oranı elde etmişlerdir. En iyi sonuç ise % 0.2 $HgCl_2$ 'de gerçekleştirilen ve % 5 ölüm ile % 7.5 kontaminasyon oranı elde ettikleri uygulama olmuştur. Sonuçlara göre araştırmacılar etanolün diğer sterilantlar ile uygulamasında *Rosmarinus officinalis* L.'in etanolde çözünen bileşiklerinden dolayı eksplantların ölmesine neden olduğunu ve sterilizasyonda kullanımının uygun olmadığını bildirmişlerdir.

Bizim yaptığımız çalışmada ise genotip 1'in I. sterilizasyon yönteminde % 92,8 kontaminasyon, %100 oranında da kararma belirlenmiştir. II. Sterilizasyon yönteminde ise % 94,3 kontaminasyon ve % 96,2 kararma elde edilmiştir. Bu

sterilizasyon yöntemlerinde kullanılan % 70'lik etanol ve % 1'lik NaOCl'de yüksek kararma ile birlikte elde edilen yüksek kontaminasyon oranı Dong ve ark. (2012) yaptıkları çalışma ile benzerlik göstermektedir. Etanol ve NaOCl çıkarılarak % 1'lik HgCl₂ ile devam edilen III ve IV. sterilizasyon yöntemlerinde kullanılan % 0.1'lik HgCl₂ ile kontaminasyon oranları sırasıyla % 48,4'e ve % 21,6'ya indirilmiştir. Her iki sterilizasyon yönteminde de % 40,7 ve % 43,6 oranlarında kararma oranı elde edilmiştir. Dolayısıyla elde edilen sonuçlar Dong ve ark. (2012) yaptıkları çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Misra and Chaturvedi (1984) *Rosmarinus officinalis* L. var. *genuina*'nın *erectus* formunu kullandıkları mikroçoğaltım çalışmasında besin ortamına aktarılmadan önce PVP'de veya steril suda 30 dk bekletilen sürgün ucu eksplantlarının 7 gün içerisinde karardıklarını bildirmiştir. Besin ortamına alınan eksplantların ise yaklaşık % 10'unun yeşil kaldığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda genotip 2 için % 1'lik NOCl ile gerçekleştirilen I. ve II. sterilizasyon çalışmalarında da benzer şekilde son uygulama olarak 30 dk 1 g/L PVP içerisinde bekletilen eksplantlarda kararmalar daha kısa bir zamanda gözlenmiştir (yaklaşık 3 gün). Araştırmamızda yeşil kalan bitkilerin yüzdesi yaklaşık % 30 olmasına rağmen kontaminasyon yüzdesi % 92 ile daha yüksek elde edilmiştir.

Nartop (2005), biberiye bitkisinin yaprak ve sap eksplantlarına farklı sterilizasyon yöntemleri uygulamıştır. % 70'lik etanolde 5 dk ve % 0.05'lik NaOCl'de 7 dk tutulan yaprak eksplantlarından aydınlık koşullarda % 0 – 36,66 oranında kontaminasyon elde edilirken karanlık koşullarda % 0 – 33,33 oranında kontaminasyon elde etmiştir. Benzer şekilde sap eksplantlarının 5 dk % 70'lik etanolde, 20 dk % 0,05'lik NaOCl'de sterilizasyonları sonucunda aydınlık koşullarda % 19,16 – 63,33 oranında kontaminasyon elde edilmiştir. Karanlık koşullarda ise % 5 – 65 oranında kontaminasyon belirlenmiştir. Bizim çalışmamızla karşılaştırıldığında genel olarak daha düşük miktarda NaOCl kullanılmasına rağmen daha uzun süre etanolde bekletme sterilizasyon başarısını önemli oranda arttırdığı görülmektedir. Ayrıca Nartop (2005)'un gerçekleştirdiği çalışmada kallus oluşturma yüzdeleri incelendiğinde aydınlık koşullarda yaprak eksplantlarının oranı % 1,66 – 8 gibi çok düşük değerler elde edilmiştir. Karanlık koşullarda ise bu değerler % 1,66 – 6,66 ile daha da düşmüştür. Sap eksplantlarında aydınlık koşullarda kallus oluşturma yüzdeleri % 13,33 – 41,66 ile daha yüksek oranda elde edilmiştir.

Özellikle Misra and Chaturvedi (1984)'nin de belirttiği gibi kültür başlatılmasında düşük tuz içeriğinden dolayı White (1943) ortamının daha iyi bir seçenek olduğu için bizim çalışmamızda da kullanılmış ancak benzer sonuçlar elde edilememiştir. Sterilizasyondan sonra besin ortamına aktarılan eksplantlar kısa süre içerisinde karararak canlılıklarını yitirmişlerdir. Yeşil kalan eksplantlar da ise rejenerasyon gerçekleşmemiştir. Yüksek BAP içeren ortamlarda kültüre alınan eksplantlarda genel olarak nod kısımlarında bazı şekil bozuklukları meydana gelmiştir. Kültür süresinin uzamasıyla bu bozukluklardan kallus oluşumları belirlenmiştir. Ancak sürgün rejenerasyonu sağlanamamıştır. Yaklaşık 3 hafta içinde kararma belirtileri gösteren eksplantlar altkültüre alınsalar dahi kararmalar devam ederek eksplant ölümleri gerçekleşmiştir.

Misra and Chaturvedi (1991) yılında gerçekleştirdikleri çalışmada CaCl_2 'nin biberiye bitkisinde sürgün oluşumunu engellediğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da Genotip 1'den elde edilen sürgün ortamında CaCl_2 kaynağı çıkarılmış ve sürgün elde edilmiştir. Ancak gelişen sürgünler çok zayıf görünümlü olmuş ve daha sonra CaCl_2 içeren besin ortamına aktarılmasına rağmen karararak ölmüşlerdir.

Genotip 3 ile ilgili yapılan çalışmada ise daha çok eksplantların kararmalarının engellenmesi ve sürgün teşvikinin sağlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla denenen hormon kompozisyonlarının eksplantların sürgün teşviki için önemli olmadığı, ancak ortamlardaki KNO_3 ve NH_4NO_3 miktarlarındaki modifikasyonların sürgün teşviki için daha iyi sonuç verdikleri belirlenmiştir. Ayrıca besin ortamlarına eklenen aktif karbon, glutatyon ve askorbik asitin eksplant kararmasını önemli oranda engellediği belirlenmiştir.

Yapılan gözlemlerde sterilizasyondan önce yaprakların kesilip kesilmemesi kararmayı ve kontaminasyonu önemli oranda etkilemediği belirlenmiştir. Genotip 3'te 11, 12 ve 13 no'lu ortamlara alınan eksplantların yaprakları kesilmemesine rağmen, yüksek kontaminasyon ve kararma meydana gelmiştir.

Dolayısıyla çalışmamızda yıl boyunca bitkilerin fenolik salgılaması ve eksplantların yüksek oranda fenolik bileşik içermesinden dolayı eksplant ve ortam kararmasının önüne geçilememiş olmakla birlikte sürgün gelişimi ve canlılık sağlanmıştır.

Yüksek ve sabit oranda uçucu yağ oranına sahip elit aromatik ve tıbbi bitki klonlarının hızlı ve klonal çoğaltımları günümüzde ticari olarak büyük öneme sahiptir. Endüstriyel olarak yaygın kullanım alanına sahip bu bitkilerden biri olan *Rosmarinus officinalis* L.'nin *in vitro* klonal çoğaltım olanaklarının araştırıldığı bu çalışmada sürgün oluşumu ve gelişimi için önemli bulgular elde edilmiştir.

Mikroçoğaltım prosedürünün hızlandırılması için bundan sonra yapılacak çalışmalarda daha yüksek oranda uçucu yağ oranına sahip klonların, farklı içeriğe sahip çeşitli besin ortamları ile yeni denemeler kurularak, çoğaltım katsayılarının artırılması sağlanmalıdır. Ayrıca kültür koşullarının optimizasyonuna da çalışılmasına gereksinim bulunmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Açıkgöz, N.**, 1988, Tarımda Araştırma ve Deneme Metodları, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 478, İzmir, 181-189s.
- Banthorpe, D. V., Webb, J. K. and Watson, G. K.**, 1984, Monoterpene synthesis in shoots regenerated from callus cultures, *Phytochemistry*, Vol. 23. No.4, 903-904, Great Britain.
- Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü** “Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Yetiştiriciliği” http://www.batem.gov.tr/urunler/sus_ve_tibbi/tibbi/tibbi_bitkiler.htm (Erişim Tarihi 05.06.2012).
- Baytop T.**, 1984, Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, İstanbul Üniversitesi Yayınları:3255, İstanbul.
- Beretta, G., Artali, R., Maffei-Facino, R. and Gelmini, F.**, 2011, An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: The case of *Rosmarinus officinalis* L., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55: 1255-1264.
- Caruso, J.L., Callahan, J., DeChant, C., Jayasimhulu, K. and Winget, G.D.**, 2000, Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of *Rosmarinus officinalis*, *Plant Cell Reports* 19, 500-503.
- Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Müdürlüğü** “Proje Özetleri” <http://www.doa.gov.tr/yeniprojeozetleri.pdf> (Erişim tarihi, 08.08.2012).
- Dong, Y., Li, Z., Qi, C., Liu, B., Duan, R. and Liu, Y.**, 2012, Callus induction and plant regenerated from rosemary leaves, *Bioscience Methods*, Vol.3, No.3, 21-26, <http://bm.sophiapublisher.com>.
- Ege İhracatçı Birlikleri** “Ege Hub. Bakliyat Yağlı Tohumlar ve Mamul. İhracatçıları Birliği Baharat İhracatı Raporu” http://www.egebirlilik.org.tr/StandartRaporlar/12_20111231.asp (Erişim tarihi 7 temmuz 2012).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- El-Beltagi, H.S., Ahmed, O.K. and El-Desouky, W.,** 2011, Effect of low doses γ -irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) callus culture, Radiation Physics and Chemistry 80: 968-976.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A. and Rasooli, I.,** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils, Food Chemistry 102: 898-904.
- Gamborg, O., Miller, R. and Ojima, K.** Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 1968, vol. 50, no. 1, p. 151-158.
- Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı** “Bitkisel Üretim, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler)
http://www.tarim.gov.tr/uretim/Bitkisel_Uretim,Aromatik_Tibbi_Bitkiler.html?LanguageID=1 (Erişim Tarihi 06.06.2012).
- Guillen, D.M., Cabo, N. and Burillo, J.** 1996, Characterisation of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest, *Journal of Scientific Food Agriculture* 70, 359-363.
- Gülbaba, A.G. ve Özkurt, N.,** Adana ve Mersin yöresi doğal biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) popülasyonlarının alan, yaprak ve yağ verimlerinin belirlenmesi, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir.
- Khare, C. P.** 2007, *Indian Medicinal Plants, An Illustrated Dictionary*, Springer Science and Business Media, LLC
- Kuhlmann, A. and Röhl, C.,** 2006, Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* cultures of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide-activated microglia, *Pharmaceutical Biology*, vol. 44, No. 6, pp. 401-410.
- Lahlou, M. and Berrada, R.,** 2003, Composition and niticidal activity of essensial oils of three chemotypes of *Rosmarinus officinalis* L. acclimatized in Morocco, *Flavour and Fragrance Journal* 18: 124-127.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Malayoğlu, H. B.**, 2010, Biberiyenin (*Rosmarinus officinalis* L) Antioksidan etkisi., Hayvansal Üretim 51 (2):59-67.
- Misra, P. and Chaturvedi, H. C.**, 1984, Micropropagation of *Rosmarinus officinalis* L., Plant Cell Tissue Organ Culture 3:163-168, Netherlands.
- Misra, P. and Chaturvedi, H.C.**, 1991, Influence of inorganic salts on cytokinin induced caulogenesis in leaf segments of *Rosmarinus officinalis* L., Plant Science, 79: 229-235.
- Munne-Bosch, S., Alegre, L. and Schwarz, K.**, 2000 a ve b, The formation of phenolic diterpens in *Rosmarinus officinalis* L. under mediterranean climate, Eur. Food. Res. Technol, 210:263-267.
- Murashige, T. and Skoog, F.**, 1962, A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol.Plant.15:473-497.
- Napoli, E.M., Curcuruto, G. and Ruberto, G.**, 2010, Screening of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary, Biochemical Systematics and Ecology 38: 659-670.
- Nartop, P.**, 2005, *Rosmarinus officinalis* L.'de Kallus ve Hücre Kültürlerini Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi ve Sekonder Metabolit Üretimi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Sasikumar, B.**, 2004, Rosemary, In: K. V. Peter, Editor, Hand Book of Herbs and Spices Volume :2, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, CRC, (2004), pp. 243-255.
- Sökmen, A. ve Gürel E.**, 2001, Sekonder Metabolit Üretimi. Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları (M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Sönmez, Ç.**, 2008, Farklı köklenli biberiye (*Rosmarinus officinalis* L. popülasyonlarının bazı agronomik ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi, Ege Üniv. Fen Bilim. Enst. Yük. Lis. T.
- Szumny, A., Figiel, A., Gutierrez-Ortiz, A. and Carbonell-Barrachina, A.A.**, 2010, Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. Journal of Food Engineering 97: 253-260.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Vacin, E.F. and F.W. Went**, 1949, Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz., 110: 605-613.
- Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G. and Fu, Y.J.**, 2008, Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components, Food Chemistry 108: 1019-1022.
- White, P. W.**, 1943, A Handbook of Plant Tissue Culture, The Jaques Cattel Press, Lancaster, Pennsylvania.
- Yang, R., Potter, T.P., Curtis, O.F. and Shetty, K.**, 1997, Tissue culture-based selection of high rosmarinic acid producing clones of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) using *Pseudomonas* strain F, Food Biotechnology, 11(1), 73-88.
- Yeşil-Çelikleş, Ö., Bedir, E. and Vardar-Sukan, F.**, 2007a, *In vitro* antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide, Food Chemistry 101, 1457-1464.
- Yeşil-Çelikleş, Ö., Hames-Kocabaş, E.E, Bedir, E., Vardar-Sukan, F., Özek, T. and Baser, K.H.C.**, 2007b, Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry 100, 553-559.
- Yeşil-Çelikleş, Ö., Nartop, P., Gürel, A., Bedir, E. and Vardar-Sukan, F.**, 2007c, Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis* 'calli, Journal of Plant Physiology 164, 1536-1542.
- Zaouali, Y., Bouzaine, T. and Boussaid, M.**, 2010, Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities, Food and Chemical Toxicology 48: 3144-3152.
- Zaouali, Y., Messaoud, C., Ben-Salah, A. and Boussaid, M.**, 2005, Oil composition variability among populations in relationship with their ecological areas in Tunisian *Rosmarinus officinalis* L., Flavour and Fragrance Journal 20: 512-520.

ÖZGEÇMİŞ

03.09.1984 Eskişehir doğumlu Yunus ERME orta ve lise öğrenimini Eskişehir’de tamamladıktan sonra 2002 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2008 yılında lisans öğrenimini tamamlayarak mezun oldu. 2008 yılında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünde yüksek lisansa başladı.

EKLER

Ek 1 Genotip 1'e uygulanan I. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 2 Genotip 1'e uygulanan II. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 3 Genotip 1'e uygulanan III. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 4 Genotip 1'e uygulanan IV. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 5 Genotip 2'ye uygulanan I. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 6 Genotip 2'ye uygulanan II. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 7 Genotip 2'ye uygulanan III. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 8 Genotip 2'ye uygulanan IV. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 9 Genotip 3'ye uygulanan I. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 10 Genotip 3'ye uygulanan II. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 11 Genotip 3'ye uygulanan III. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 12 Genotip 3'ye uygulanan IV. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 13 Genotip 3'ye uygulanan V. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 14 Genotip 3'ye uygulanan VI. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 15 Genotip 3'ye uygulanan VII. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 16 Genotip 3'ye uygulanan VIII. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 17 Genotip 3'ye uygulanan IX. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 18 Genotip 3'ye uygulanan X. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 19 Genotip 3'ye uygulanan XI. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine ve kararan eksplant yüzdeleri

Ek 1 Genotip 1'e uygulanan I. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine eksplant yüzdesi ve eksplantların kararına durumları

	Kültüre alınan eksplant sayısı (adet)			Kontamine eksplant sayısı (adet)			Kontamine eksplant yüzdesi (%)			Kararan eksplant sayısı (adet)			Kararan eksplant yüzdesi (%)		
Besin ortamı	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort	
1	15	15	12	13	14	12	86,6	93,3	100	92,8	15	15	12	100	A
Toplam eksplant sayısı (adet)	42			39			Toplam kontaminasyon oranı (%)			92,8	Toplam kararan eksplant sayısı (adet)			Toplam kararma oranı (%)	100

Ek 2 Genotip 1'e uygulanan II. sterilizasyon uygulamasına ait kontamine eksplant yüzdesi ve eksplantların kararına durumları

	Kültüre alınan eksplant sayısı (adet)			Kontamine eksplant sayısı (adet)			Kontamine eksplant yüzdesi (%)			Kararan eksplant sayısı (adet)			Kararan eksplant yüzdesi (%)		
Besin ortamı	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort	
1	18	20	15	18	17	15	100	85	100	94,3	17	20	14	93,3	A
Toplam eksplant sayısı	53			50			Toplam kontaminasyon oranı			94,3	Toplam kararan eksplant sayısı			Toplam kararma oranı	96,2

Ek 4 Genotip 1'e uygulanan IV. sterilizasyon uygulaması

	Kültüre alınan eksplant sayısı (adet)			Kontamine eksplant sayısı (adet)			Kontamine eksplant yüzdesi (%)			Kararan eksplant sayısı (adet)			Kararan eksplant yüzdesi (%)				
Besin ortamı	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	T1	T2	T3	Ort
2	7	7	8	2	0	0	28,5	0	0	9,0	2	2	1	28,5	28,5	12,5	22,7
3	6	6	6	0	0	2	0	0	30,0	10,0	2	2	0	30,0	30,0	0	20,0
4	6	6	7	0	0	0	0	0	0	0	4	4	2	66,6	66,6	28,5	52,6
5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	2	2	3	40	40	60	46,6
6	5	5	4	1	0	1	20	0	25	14,3	2	3	0	40	60	0	35,7
7	5	4	4	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	50	100	0	46,2
8	5	5	4	3	0	0	60	0	0	21,4	2	2	2	40	40	50	42,8
9	5	5	4	2	3	1	40	60	25	42,8	2	3	4	40	60	100	64,3
10	5	5	4	2	1	0	40	20	0	21,4	2	3	1	40	60	25	42,8
11	5	5	4	2	3	1	40	60	25	42,8	2	3	1	40	60	25	42,8
12	5	5	4	2	3	1	40	60	25	42,8	2	3	1	40	60	25	42,8
13	5	5	4	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	20	20	25	21,4
14	5	5	4	2	3	1	40	60	25	42,8	1	1	1	20	20	25	21,4
15	5	5	4	2	3	1	40	60	25	42,8	3	3	2	60	60	50	57,1
16	6	6	7	2	2	2	33,3	33,3	25	31,5	4	4	2	66,6	66,6	28,5	52,6
17	4	4	3	2	2	2	50	50	66,6	55,3	2	2	2	50	50	66,6	55,3
18	3	3	3	1	1	0	33,3	33,3	0	22,2	2	2	2	66,6	66,6	66,6	66,6
19	4	4	3	1	1	0	25	25	0	16,6	2	2	2	50	50	66,6	55,5
20	4	4	5	1	1	0	25	25	0	16,6	2	2	2	50,0	50,0	40	46,6
21	5	5	4	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	50	50	25	35,7
22	5	5	4	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	40	40	25	35,7
23	5	4	4	3	3	4	60	75	100	76,9	3	3	1	60	75	25	53,8
24	5	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	5	5	5	3	3	4	60	60	80	66,6	2	0	0	40	0	0	13,3
26	5	5	4	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	60	60	75	64,3
27	5	5	4	2	1	0	40	20	0	21,4	3	3	2	60	60	50	57,1
28	5	5	4	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	60	60	75	64,2
29	5	5	4	2	0	0	40	0	0	14,3	2	2	2	40	40	50	42,8
30	5	5	4	2	0	0	40	0	0	14,3	3	3	3	60	60	75	64,2
Toplam eksplant sayısı (adet)	416	Toplam kontamine eksplant sayısı (adet)			87	toplam kontaminasyon yüzdesi (%)			20,9	Toplam kararan eksplant sayısı (adet)			178	Toplam kararma yüzdesi (%)			42,7

Ek 5 Genotip 2'ye uygulanan I. sterilizasyon sonrası eksplantların durumları

Besin ortamı	Kültüre alınan eksplant sayısı (adet)			Kontamine eksplant sayısı (adet)			Kontamine eksplant yüzdesi (%)			Kararan eksplant sayısı (adet)			Kararan eksplant yüzdesi (%)			Ort	
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3		
1	13	13	9	6	5	3	46,2	28,4	33,3	40	7	4	53,8	53,8	44,4	51,4	FGH
2	15	15	7	3	2	3	20	20	42,8	21,6	10	7	66,6	66,6	100	72,9	ABCDE
3	15	15	8	7	7	5	46,6	46,6	62,5	50	10	12	66,6	80	87,5	76,3	ABCD
4	12	12	12	1	1	0	8,3	8,3	0	5,5	10	10	83,3	83,3	50	72,2	ABCDEF
5	12	12	11	4	4	5	33,3	33,3	45,5	37,1	9	4	75	75	36,4	62,8	BCDEFGH
6	12	12	14	2	0	0	16,6	0	0	5,2	11	11	91,6	91,6	78,5	86,8	AB
7	13	13	12	3	3	4	23	23	33,3	26,3	10	10	76,9	76,9	75	76,3	ABCDEF
8	12	13	13	3	0	0	25	0	0	7,9	9	9	75	69,2	69,2	71,1	ABCDEFG
9	7	7	6	2	2	2	28,6	28,6	33,3	30	4	5	57,1	71,4	66,6	65	BCDEFGH
10	7	6	6	3	3	4	42,8	50,0	66,6	52,6	5	5	71,4	83,3	66,6	73,6	ABCDEF
11	7	7	6	4	3	5	57,1	42,8	83,3	60	4	3	57,1	42,8	100	65	ABCDEFGH
12	5	5	6	3	3	3	60,0	60,0	50,0	56,3	4	4	80	80	66,6	75	ABCDEF
13	6	6	6	4	4	2	66,6	66,6	33,3	55,5	2	2	33,3	33,3	66,6	44,4	ABCDEFG
14	5	5	6	3	3	2	60,0	60,0	33,3	50	3	3	60	60	50	56,3	DEFGH
15	6	6	8	2	2	3	33,3	33,3	37,5	35	4	4	66,6	66,6	75	70	SBCDEFG
16	7	7	6	4	4	6	57,1	57,1	100	70	3	3	42,9	42,9	66,6	50	EFGH
17	6	6	7	2	2	2	33,3	33,3	28,6	31,5	3	3	50,0	50,0	57,1	52,6	DEFGH
18	6	6	6	2	2	2	33,3	33,3	33,3	33,3	4	4	66,6	66,6	50,0	61,1	BCDEFGH
19	6	6	5	5	4	3	83,3	66,6	60,0	70,6	4	4	66,6	66,6	80,0	70,6	ABCDEFG
20	5	6	6	4	3	3	80,0	50,0	50,0	58,8	4	3	80,0	50,0	50,0	58,8	CDEFGH
21	5	5	5	3	3	2	60,0	60,0	40,0	53,3	2	2	40,0	40,0	40,0	40,0	H
Toplam eksplant sayısı (adet)	530	Toplam kontamine eksplant sayısı (adet)		189	Toplam kontaminasyon yüzdesi (%)		35,6	Toplam kararan eksplant sayısı (adet)		353	Toplam kararma yüzdesi (%)		66,6				

