



T.C.
NIĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI



İN VİTRO KOŞULLARDA *JASMONİK* ASİT VE SALİSİLİK ASİT
UYGULAMALARININ BİBERİYE BİTKİSİNDE (*Rosmarinus officinalis* L.)
ROSMARİNİK ASİT ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

HATİCE ÇEVİK

AĞUSTOS 2024

T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

İN VİTRO KOŞULLARDA *JASMONİK* ASİT VE SALİSİLİK ASİT
UYGULAMALARININ BİBERİYE BİTKİSİNDE (*Rosmarinus officinalis* L.)
ROSMARİNİK ASİT ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

HATİCE ÇEVİK

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Cemil İŞLEK

Ağustos 2024

Hatice ÇEVİK tarafından **Prof. Dr. Cemil İŞLEK** danışmanlığında hazırlanan “**In Vitro Koşullarda Jasmonik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) Bitkisinde Rosmarinik Asit Üretimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoteknoloji** Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Hüseyin SERVİ, İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Cemil İŞLEK, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Özhan ŐENOL, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../20.... tarihinde uygun görölmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/...../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../2024

Prof. Dr. Mustafa KARATEPE
MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Hatice ÇEVİK

ÖZET

İN VİTRO KOŞULLARDA JASMONİK ASİT VE SALİSİLİK ASİT UYGULAMALARININ BİBERİYE BİTKİSİNDE (*Rosmarinus officinalis* L.) ROSMARİNİK ASİT ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ÇEVİK, Hatice

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman

: Prof. Dr. Cemil İŞLEK

Ağustos 2024, 89 sayfa

Bitkiler, ilaç endüstrisinde kullanılan doğal bileşikler için ana kaynaktır. Rosmarinik asit (RA) antiviral, antibakteriyel, anti-inflamatuar, anti-alerjik ve anti-kanser aktiviteleri olan doğal bir antioksidan fenolik bileşiktir. Bu tez çalışmasında, tıbbi açıdan büyük önem arz eden *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) bitkisinin, bitkilerde önemli iki sinyal molekülü olan salisilik asit ve jasmonik asit uygulamaları ile RA üretimi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda ilk aşamada farklı sterilizasyon yöntemleri uygulanarak uygun sterilizasyon yöntemi belirlenmiştir. Daha sonra biberiye bitkilerinin yaprak eksplantlarından kallus elde edilmiştir. Elde edilen kalluslar alt kültürde farklı dozlarda salisilik asit ve jasmonik asit ortamında geliştirilmiştir. Kalluslardaki kallus indüksiyon frekansı ölçülmüştür ve RA birikimi incelenmiştir. Tüm uyarıcı konsantrasyonları karşılaştırıldığında en iyi kallus indüksiyon frekansı % 84 ile 50 mM salisilik asit uygulamasında ölçülmüştür. Aynı zamanda en fazla RA miktarı yine 50 mM salisilik asit uygulamasında 0,753 mg/g t.a. olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler, salisilik asit ve jasmonik asit gibi uyarıcı ilavesi ile biberiye yaprak eksplantları kullanılarak oluşturulan in vitro kültürlerin RA üretimi için alternatif bir yöntem olarak başarıyla kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: *Rosmarinus officinalis* L., *In vitro*, jasmonik asit, salisilik asit, rosmarinik asit

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF JASMONIC ACID AND SALICYLIC ACID APPLICATIONS ON ROSMARINIC ACID PRODUCTION IN ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis* L.) IN VITRO CONDITIONS

ÇEVİK, Hatice

Nigde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biotechnology

Supervisor : Prof. Dr. Cemil İŞLEK

August 2024, 89 pages

Plants are the main sources of natural compounds used in the pharmaceutical industry. Rosmarinic acid (RA) is a natural antioxidant phenolic compound with antiviral, antibacterial, anti-inflammatory, antiallergic, and anticancer activities. In this thesis study, it was aimed to investigate the effects of salicylic acid and jasmonic acid, two important signaling molecules in plants, on the production of rosmarinic acid in *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary), which is of great medical importance. In the first stage, different sterilization methods were applied and the appropriate sterilization method was determined. Then, callus was obtained from leaf explants of rosemary plants. The callus obtained were grown in subculture in different doses of salicylic acid and jasmonic acid medium. The callus induction frequency was measured and rosmarinic acid accumulation was analysed. When all elicitor concentrations were compared, the best callus induction frequency was 84% with 50 mM salicylic acid treatment. At the same time, the highest amount of RA was determined as 0.753 mg/g t.a. in 50 mM salicylic acid treatment. The data obtained showed that in vitro cultures using rosemary leaf explants with the addition of elicitors such as salicylic acid and jasmonic acid can be successfully used as an alternative method for RA production.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* L., In vitro, jasmonic acid, salicylic acid, , rosmarinic acid

ÖN SÖZ

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında bilgisi ve akademik tecrübesi ile bana destek olan ve yönlendiren, maddi-manevi olarak desteklerini esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Cemil İŞLEK'e,

Hem tecrübesi hem de bilgi paylaşımı ile yardımlarını hiç esirgemeyen, bu bağlamda laboratuvarının kapılarını da bana sonuna kadar açan ve bana tam destek sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Bengü TÜRKYILMAZ ÜNAL'a, yine tüm laboratuvar süreçleri boyunca her daim desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin TÜRKER'e

Tüm bu süreçlerde her daim yanımda olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok kıymetli dostum Hacer BOZKURT' a

Tüm öğrenim hayatım boyunca beni her koşulda destekleyip yanımda olan annem Gülhan ÇEVİK ve babam Hüseyin ÇEVİK' e, kız kardeşim İlayda Begüm ÇEVİK'e teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
BÖLÜM I.....	1
GİRİŞ	1
1.1 <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	3
1.1.1 Bitkisel özellikleri.....	5
1.1.2 Tıbbi özellikleri	5
1.1.3 <i>Rosmarinus officinalis</i> L. bitkisinin antioksidan etken bileşenleri.....	7
1.1.4 Rosmarinik asit	9
1.2 Sekonder Metabolitler.....	14
1.2.1 Sekonder metabolitlerin sınıflandırılması.....	15
1.2.2 Sekonder metabolitlerin fonksiyonları	16
1.2.3 Sekonder metabolit kaynakları	17
1.2.4 Bitkilerde sekonder metabolitler.....	17
1.3 Bitki Doku Kültürü	20
1.3.1 Hücre kültürü	21
1.3.2 Organ kültürü.....	22
1.3.3 Kallus kültürü	22
1.4 Bitki Büyüme Düzenleyicileri	23
1.4.1 Oksinler.....	24
1.4.2 Sitokininler	27
1.4.3 Giberellinler	29
1.4.4 Absisik asit	30
1.4.5 Etilen.....	32

1.4.6 Poliaminler.....	33
1.4.7 Salisilatlar	34
1.4.8 Jasmonatlar	39
BÖLÜM II	43
MATERYAL VE METOT	43
2.1 Bitkisel Materyaller	43
2.1.1 Materyallerin temini	43
2.2 Metot.....	44
2.2.1 Kültüre alınan eksplantların sterilizasyonu	44
2.2.2 Besin ortamlarının hazırlanması	45
2.3 Besiyeri Hazırlığı.....	45
2.3.1 Eksplantların kültür ortamına alınması.....	47
2.3.2 Kallusların alt kültüre alınması.....	49
2.4 Kallus İndüksiyonu	50
2.5 Rosmarinik Asit Ekstraksiyonu ve Belirlenmesi	50
2.6 Verilerin Değerlendirilmesi	51
BÖLÜM III.....	52
BULGULAR.....	52
3.1 Kallus İndüksiyonu	52
3.2 Biberiye Kalluslarında Salisilik Asit Uygulamalarının RA Birikimi Üzerine Etkisi.....	52
3.3 Biberiye Kalluslarında Jasmonik Asit Uygulamalarının Rosmarinik Asit Birikimi Üzerine Etkisi	53
BÖLÜM IV	56
TARTIŞMA VE SONUÇ	56
KAYNAKLAR	62
ÖZ GEÇMİŞ	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.'nin bilimsel sınıflandırması	4
Çizelge 1.2. Doğal sekonder metabolitler.....	17
Çizelge 1.3. Bitkilerdeki bazı sekonder metabolitlerin biyolojik aktiviteleri.....	19
Çizelge 1.4. Doğal olarak oluşan sitokininler.....	28
Çizelge 2.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. bitki eksplantlarına uygulanan sterilizasyon yöntemleri	44
Çizelge 2.2. MS (Murashige & Skoog) besin ortamı büyüme düzenleyicileri.....	47
Çizelge 2.3. Uygulanan uyarıcılar ve dozları	49
Çizelge 3.1. Salisilik asit ve jasmonik asit uygulamalarının Kallus indüksiyon frekansı üzerine etkileri.....	52
Çizelge 3.2. Biberiye kalluslarında Rosmarinik asit birikimi üzerine farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulamaları	53
Çizelge 3.3. Biberiye kalluslarında RA birikimi üzerine farklı konsantrasyonlarda jasmonik asit uygulamaları	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Aromatik bitkilerin faaliyetleri ve kullanım alanları	3
Şekil 1.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. genel görünüm.....	4
Şekil 1.3. <i>Rosmarinus officinalis</i> bitki bileşenlerinin biyolojik aktivite çalışmaları	6
Şekil 1.4. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. bitkisi le yapılan biyolojik aktivite çalışmaları	7
Şekil 1.5. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. antioksidan etkiye sahip bileşenleri	8
Şekil 1.6. Rosmarinik asidin yapısı	9
Şekil 1.7. Rosmarinik asit ve bazı türevlerinin yapısı	10
Şekil 1.8. Fenilalanin ve Tirozinden Rosmarinik asit biyosentezi	11
Şekil 1.9. <i>Coleus blumei</i> süspansiyon kültürlerindeki rosmarinik asit biyosentetik yolağı	13
Şekil 1.10. Primer ve sekonder metabolizmanın entegrasyonu	15
Şekil 1.11. Kaurenik asit ve prolin primer metabolit iken yakın ilişkili olan abietik asit ve pipekolik asit sekonder metabolit olarak kabul edilir.....	18
Şekil 1.12. Sekonder metabolit biyosentezi için dört ana yol.....	19
Şekil 1.13. In vitro koşullarda biyoaktif bileşiklerin üretimi için kullanılan mevcut yöntemler	21
Şekil 1.14. Bazı doğal ve sentetik oksinler	26
Şekil 1.14. Bazı doğal ve sentetik sitokininler.....	28
Şekil 1.16. Giberellin yapıları.....	30
Şekil 1.17. ABA ve analoglarının yapısal formülleri	31
Şekil 1.18. Etilen biyosentezi	33
Şekil 1.19. Poliamin sentezi ve katabolik yollarının şematik gösterimi	34
Şekil 1.20. Bitkilerde SA için olası biyosentez yolları	36
Şekil 1.21. Doğal olarak oluşan bazı salisilik asit türevleri	38
Şekil 1.22. Jasmonik asidin (JA) izomerleri	39
Şekil 1.23. Lineloik asitten jasmonik asit sentezi	40
Şekil 1.24. Jasmonik asidin biyosentezi	41
Şekil 1.25. Jasmonik asitte sinyal gelişimi genel bakış	42
Şekil 3.1. Biberiye kalluslarında Rosmarinik asit birikimi üzerine farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulamalarının etkisi.....	53

Şekil 3.2. Biberiye kalluslarında Rosmarinik asit birikimi üzerine farklı konsantrasyonlarda jasmonik asit uygulamalarının etkisi	54
Şekil 3.3. Biberiye kalluslarında rosmarinik asit birikimi üzerine farklı konsantrasyonlarda salisilik asit ve jasmonik asit uygulamalarının etkisi....	55



FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

Fotoğraf 1.1. Kallus kültürü.....	23
Fotoğraf 2.1. Çalışmada kullanılan eksplant kaynağı olan biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) bitkisinin genel görünümü	43
Fotoğraf 2.2. Besiyeri hazırlığı.....	46
Fotoğraf 2.3. Besin ortamı bileşenlerinin homojenizasyonu ve pH ayarlanması	46
Fotoğraf 2.4. Eksplantların besin ortamına aktarılması işlemi	47
Fotoğraf 2.5. Kültür ortamına alınan eksplantlardan bir görünüm	48
Fotoğraf 2.6. Kültüre aktarımdan sonraki 14. güne ait görünüm	48
Fotoğraf 2.7. Kallus gelişimlerine ait görünüm	49
Fotoğraf 2.8. 45 günlük (6 haftalık) süreçte gelişen kalluslar	50

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

ϵ	Ekstinksiyon katsayısı
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar

Kısaltmalar

Açıklama

2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik Asit
ABA	Absisik Asit
ACC	1-Aminosiklopropan-1-karboksilik Asit
APX	Peroksidaz
ASA	Asetilsalisilik Asit
AVG	Aminoetoksivinilglisin
CAT	Katalaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EFE	Etilen Oluşturan Enzim
FRAP	İndirgeme Gücü
GA ₃	Giberellik Asit
GR	Glutasyon Redüktaz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IAA	İndol-3-asetik Asit
IBA	İndol-3-bütirik Asit
IPP	İzopentenil Difosfat
JA	Jasmonik Asit
Kif	Kallus İndüksiyon Frekansı
LPS	Lipopolisakkarit
LS	Linsmaier & Skoog
MDA	Malondialdehit
MeJA	Metil Jasmonat
MEL	Melatonin

MS	Murashige & Skoog
NAA	1-Naftalin Asetik Asit
PA	Poliamin
PAL	Fenilalanin Amonyum Liyaz
RA	Rosmarinik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
SA	Salisilik Asit
SH	Schenk & Hildbrandt
SOD	Süperoksit Dismutaz
UV	Ultraviyole



BÖLÜM I

GİRİŞ

İnsanoğlu yüzyıllar boyunca bitkileri değerli kaynaklar olarak kullanmışlardır. Bu kullanım alanlarına çeşitli ilaçlar, tat verici maddeler, zirai ilaçlar ve çeşitli pigmentler örnek olarak verilebilir (Balandrin ve Klocke, 1988). Antioksidanlar, gıda bitkilerinden elde edilen ve insanlar için oldukça önemli bileşenlerdir. Reaktif oksijen türleri (ROS), birçok hastalığın temel sebebi olarak görülmektedir. Antioksidan maddeler bu yönüyle de reaktif oksijen türleri ile mücadelede oldukça önem arz etmektedir. Genellikle aromatik bitkilerde bulunan biyoaktif bileşenler singlet oksijeni süpürerek, sitokrom ve diğer enzimleri indükleyerek serbest radikallerin vücutta neden olduğu oksidatif stres hasarlarından koruma yeteneğine sahiptirler (Couladis vd., 2003; Li, 2006). Günümüzde tüm dünyada var olan ilaçların bir kısmı sentetik olmasına karşın diğer bir kısmı da doğal bitkisel kökenlidir (Baker vd., 1995; Cordell., 2008). 20. Yüzyıla gelindiğinde tüm dünyada ilaç talebi gitgide artmış, bunun sonucunda araştırmacılar bitkilerden uzun süreçlerde hammadde elde etmek yerine bu maddeleri kimyasal olarak sentezleme yoluna gitmiştir. Fakat kimyasal üretimdeki çeşitli sınırlamalar, bu süreçleri ekonomik olmayacak duruma getirmiştir. Tüm bu durumlar göz önüne alındığında bitkiler, ilaç olarak kullanılan doğal ürünlerin hâlâ önemli bir kaynağıdır (Raskin vd., 2002). Bu bitkilerin kullanımları azalmadan devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nden elde edilen veriler ışığında, dünyadaki nüfusun ortalama %80'i, özellikle de gelişmekte olan ülkelerde, insanlar hâlâ bitkisel ilaçlara bağımlı durumdadır (Peter, 2006; Gurib-Fakim, 2006). Biberiye, kekik, nane, adaçayı ve sarımsak Akdeniz menşeli olmasına karşın tüm dünyada var olan aromatik bitkilerdir (Bampidis vd.,2005; Ocak vd., 2008; Botsoglou vd., 2009; Adel vd., 2011). Polifenoller, kininler, flavonoidler, alkaloidler, polipeptidler ve bunların oksijenli türevleri gibi çeşitli kimyasal maddeleri de içerisinde barındırırlar (Cowan, 1999; Perumalla vd., 2011; Negi, 2012). Bu maddelerin bazıları sinerjistik etkiye sahip olabilir. Bu nedenle biyoaktiviteleri aktiftir (Tiwari, 2008). Bazı biyoaktif bileşikler antioksidan ve antiseptik aktiviteleri nedeniyle terapötik etki gösterirler (Madsen ve Bertelsen, 1995; Li, 2006). Bu özellikleri sebebiyle de kanser ve kardiyovasküler hastalık risklerini düşürürler (Duthie ve Brown, 1994).

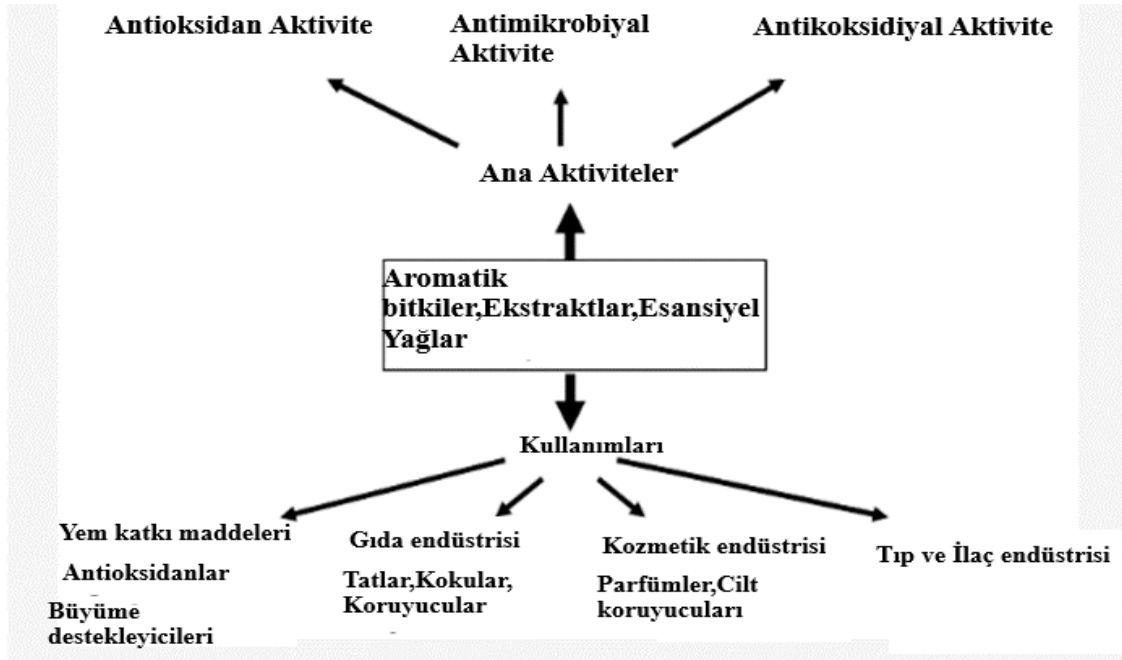
Ayrıca gıda maddelerinde, özellikle de atıştırılmalık ve et ürünlerinde mikrobiyal çoğalmayı geciktirmeye yardımcı olan antimikrobiyal bileşikler içerirler (Elgayyar, 2001; Li, 2006; Giannenas, 2008).

Aromatik bitkiler, uçucu yağlar adı verilen kokulu, yüksek konsantrasyona sahip, hidrofobik bileşiklere sahiptirler. Bunlar, bir bitkide yaprak, tomurcuk, meyve, tohum kök ve çiçek gibi çeşitli kısımlarında bulunurlar (Brenes vd., 2010; Negi, 2012). Uçucu yağlar, oldukça düşük kaynama noktasına sahip fenilpropen ve terpenlerden meydana gelen sekonder metabolitlerin kompleks halidir (Greathead, 2003).

Uçucu yağ bakımından en önemli familyalar; *Asteraceae* veya *Compositae*, *Lamiaceae* veya *Labiatae*, ve *Apiaceae* ya da *Umbelliferae*'dir (Bernáth vd., 2009). Bu uçucu yağların ayrıntılı analizleri gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi ile yapılabilir (Brenes vd., 2010). α -terpineol, borneol, linalool, thujanol, geraniol, menthol ve cintronillol gibi terpenoidlerin yanı sıra fenoller (timol, karvakrol, ojenol, gaiakol) aromatik aldehytler (sinnamaldehyt, cuminal, phellandral) gibi düşük moleküler ağırlığa sahip hidrokarbonların karışımlarını içerdği kanısına varılmıştır (Bakkali vd., 2008).

Yağlar genellikle buhar damıtma yöntemi ile çıkarılırken, şu anda süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu gibi yöntemlerin kullanımı gittikçe artmaktadır (Lubbe vd., 2011).

Uçucu yağ içerikleri sebebiyle kullanımı popüler olan 3000'den fazla bitki vardır. Yaklaşık olarak 300 tanesi ticari olarak kullanıma sahiptir (Van de Braak vd., 1999).



Şekil 1.1. Aromatik bitkilerin faaliyetleri ve kullanım alanları (Lubbe, vd., 2011)’ den değiştirilmiş)

Dünyanın her yerinde tüketiciler sentetik kimyasalların gıdalarda meydana getirdiği olumsuz etkilerden dolayı endişe duymaktadır. Bu nedenle, ”temiz etiketli ürünler” bulmaya yönelmişlerdir. Bu sebeple diğer koruma yöntemleri ile olan uyumları, güvenilir olmaları ve çeşitli spesifik özellikleri (antioksidan, antidiyabetik, antimutajenik, anti-toksijenik, antibakteriyel) nedeniyle sentetik gıda maddelerine alternatif olarak doğal ekstraktlara büyük bir rağbet vardır (Nieto vd., 2011). Genel olarak şifalı bitkiler vitamin, glutatyon, enzim ve fenolik bileşikler gibi antioksidan özelliklere sahip bileşenler açısından oldukça zengindir (del Baño vd., 2004).

1.1 *Rosmarinus officinalis* L.

Ülkemizde kuşdili, hasalban ve akpüren gibi farklı isimlerle nitelendirilen biberiye bitkisi ortalama 50-100 cm yükseklikte, çalı formunda, kışın yaprağını dökmeyen, çiçekleri soluk mavi renkli çok yıllık bir bitkidir (Baytop, 1984) (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. *Rosmarinus officinalis* L.'nin bilimsel sınıflandırması (Begum vd., (2013)'den değiştirilmiş)

Alem	Bitkiler
Alt alem	Tracheobionto
Süper bölüm	Spermatofit
Bölüm	Magnoliophyto
Sınıf	Manoliyopsida
Alt sınıf	Astergiller
Emir	Lamiales
Aile	Lamiaceae
Cins	<i>Rosmarinus</i> L.
Türler	<i>officinalis</i>
Binom terminolojisi	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.

Rosmarinus officinalis L. tıbbi amaçlar için yaygın olarak kullanılan, aynı zamanda baharat olarak da kullanım alanına sahip olan aromatik bir bitkidir (Werker vd., 1985). 50-100 cm uzunluğuna sahip, çiçek rengi soluk mavi olarak tonlarında olan çok yıllık bir bitkidir (Baytop, 1984). Kendine has bir kokuya sahip, yaprak dökmeyen çalı formunda olan bu bitkinin 200'e yakın cins ve 3500'e yakın tür içeren bir familyaya üyedir.

Akdeniz bölgelerinin tüm kıyı şeritlerinde doğal olarak bulunur (Amaral Franco vd., 1973). Türkiye'nin Ege ve Akdeniz şeridinde doğal olarak yetişmektedir. Hatay, Adana, Mersin ve Çanakkale gibi illerde orman içi florada, tarla ve bağların kenarları gibi alanlarda yayılım göstermektedir (Basmacıoğlu Malayoğlu, 2010).



Şekil 1.2. *Rosmarinus officinalis* L. genel görünüm (Sarı, 2019)

1.1.1 Bitkisel özellikleri

Rosmarinus officinalis L., ülkemizin zengin florası içerisinde yer alan çok yıllık bir bitkidir. Genç köklerin renkleri beyazımsı, daha yaşlı kökler ise kahve tonlarındadır. İğne şeklinde yerleşmiş olan yapraklar kısa saplıdır. Yapraklarının üst yüzeyi kaygan, yeşil renkte ve çok az tüylü yapıdadır. Yaprak üstü stomasız ve oldukça kuvvetli kutikula tabakasına sahiptir. Yapraklarının alt kısmında ise değişik tiplerde tüy yapıları bulunur. Bunlar, çok hücreli dallanmış tüylerdir.

Lamiaceae familyasına ait yağ keseleri ve küçük tüylerdir. Sürgünlerinin ucunda yer alan çiçekler tek tek bulunurlar ve 5 ile 10 tanedirler. Çan şeklinde çanak yaprakları vardır. Taç yaprak renkleri ise mavimsi tonlardadır. Bitkide iki adet erkek organ bulunur. Meyvesi yaklaşık olarak 2 mm çapındadır (Ceylan, 1987). Dişi organ iki karpelli, stilusu uzun ve kıvrılmış şekildedir. Meyvesi esmer ve küçüktür (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2012).

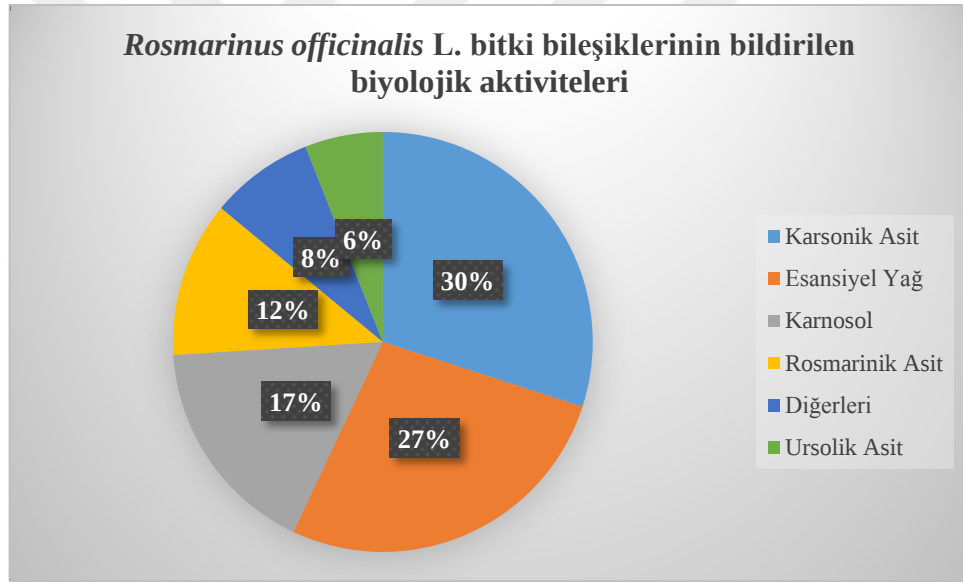
1.1.2 Tıbbi özellikleri

Rosmarinus officinalis L. karakteristik aroması nedeniyle mutfak kullanımlarının yanı sıra (Jardak vd., 2017) elde edilen özleri sebebiyle çabuk bozulabilecek olan gıda maddelerinin raf ömrünü uzatan doğal bir antioksidan kaynağıdır (Habtemariam, 2016). *Lamiaceae* familyası antibakteriyel, antiviral, antioksidan ve anti-inflamatuvar özelliklere sahip olan rosmarinik asit gibi büyük miktarlarda fenolik asit içeriğine sahip bitki türlerini içerir (Naghibi vd., 2022). Geleneksel tıpta *Rosmarinus officinalis* L. 'nin yaprakları antibakteriyel aktiviteleri (Bozin vd., 2007), gaz giderici (Evans, 2009; Begum, A. vd., 2013; Heinrich vd., 2017), kas ve eklemlerde analjezik (Al-Sereiti, vd., 1999; Begum vd., 2013; Cardoso vd., 2019), temelinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çiçek ve yapraklarından elde edilen uçucu yağ özleri küçük yaralar, döküntüler, baş ağrısı, hazımsızlık ve dolaşım sistemi problemlerinin tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. Bunun yanında balgam söktürücü, idrar söktürücü ve anti-spazmodik olarak kullanımları mevcuttur (Al-Sereiti vd., 1999; Ulbricht vd., 2010; Begum vd., 2013; Cardoso vd., 2019). Antioksidan etkilerinin yanında otçullara, patojenlere ve yırtıcılara karşı bitki savunmasında önemli rollere sahiptirler. Bu sebeple insanlarda enfeksiyöz ajanların kontrolünde uygulamaya sahiptirler (Doughari, 2012). *Rosmarinus*

officinalis L. 'de bulunan en yaygın polifenoller özellikle rosmarinik asit, klorojenik asit ve kafeik asit ve apigenin, diosmin, luteolin, genkwanina ve fenolik asitlerdir (>%3) (Wagstaff vd., 1998; Al-Sereiti vd., 1999; Samuelsson vd., 2017; Cardoso vd., 2019).

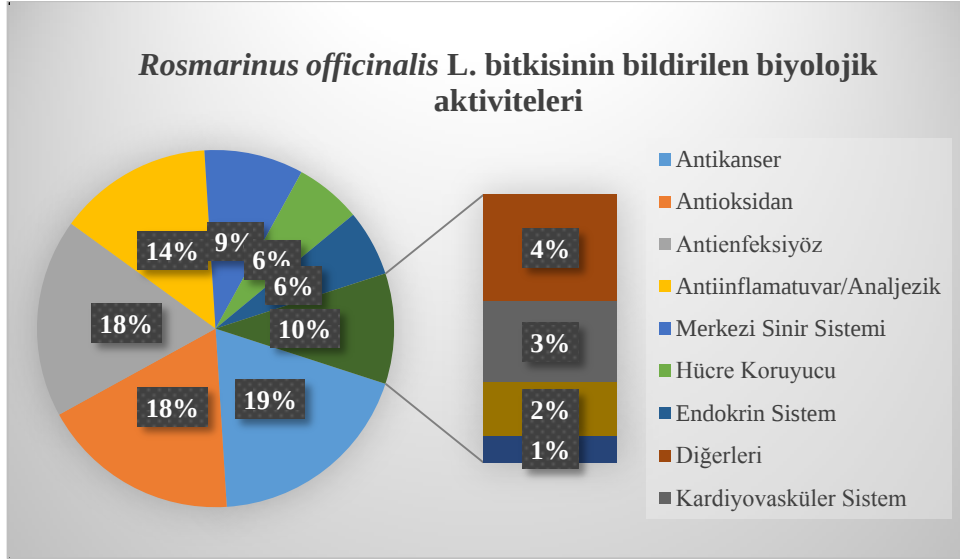
Diabetes mellitus bilinen adıyla şeker hastalığı, tüm dünyada var olan ve görülme sıklığı en yüksek metabolik bozuklukların başında gelmektedir. Bu metabolik hastalığın tedavisinde yaygın olarak insülin ve oral hipoglisemik ajanlar kullanılmaktadır.

Ancak bu yöntemler hastalığı tam manasıyla iyileştirmez ve ayrıca önemli yan etkilere davetiye çıkarmaktadır (Rahimifard vd., 2014). *Rosmarinus officinalis* L. ile yapılan çeşitli in vivo çalışmalarda kan şekerini normal seviyelerde tuttuğu gösterilmiştir (Tu vd., 2013).



Şekil 1.3. *Rosmarinus officinalis* bitki bileşenlerinin biyolojik aktivite çalışmaları (Andrade vd., (2018)'den değiştirilmiş)

Rosmarinus officinalis L. 'nin biyolojik aktiviteleri iki bileşik grubuna atfedilmiştir: uçucu bir fraksiyon ve fenolik bileşikler (Romo Vaquero vd.,2012).



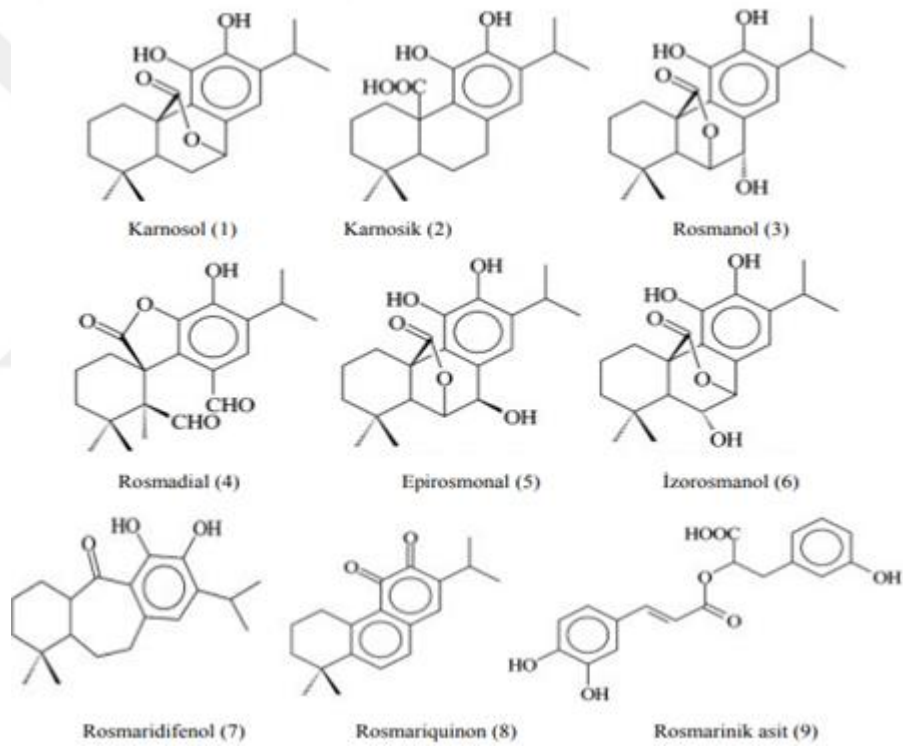
Şekil 1.4. *Rosmarinus officinalis* L. bitkisi le yapılan biyolojik aktivite çalışmaları (Andrade vd., (2018)'den değiştirilmiş)

Biyolojik aktivite etkisi olarak meme kanserleri, melanom, kolon kanseri, karaciğer karsinomu ve lösemi gibi hastalıklar en çok çalışılanlardır. Aslında, karnosol ve karnosik asidin insan kanser hücrelerine (HepG2, COLO 205 ve HL-60), meme kanseri hücrelerine ve kolon kanseri hücrelerine karşı sitotoksitesine ilişkin birkaç in vitro çalışmalar yapılmıştır (Dörrie vd., 2001; Bai vd., 2010). Bu çalışmalar, karnosik asidi doza bağlı bir şekilde kullanarak, dirençli tümör hücreleri de dahil olmak üzere, hücre canlılığında bir azalma bildirmiştir ve bu bileşik, tamamlayıcı bir anti-tümöral yaklaşım olarak önerilmiştir (Gonzalez-Vallinas vd., 2013). Uçucu yağlar, antibakteriyel özelliklerinin yanı sıra, mikrobiyal kaynaklı insan hastalıklarının kontrolü için önemli olan böcek öldürücü, anti-paraziter ve anti-fungal aktivitelere de sahiptir (Luqman vd., 2007). Bazı deneysel çalışmalar, uçucu yağın ve karnosik asit, karnosol, ursolik asit ve betulinik asit gibi biyolojik olarak aktif terpenlerin yanı sıra rosmarinik asit, rosmanol ve oleanolik asidin anti-inflatuvar ve analjezik aktivitelerini bildirmiştir (Benincá vd., 2011).

1.1.3 *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinin antioksidan etken bileşenleri

Rosmarinus officinalis L. bitkisinin farmakolojik etkilerinin birçoğu rosmarinik asit, kafeik asit, karnosol, ursolik asit ve karnosik asit gibi ana kimyasalların yüksek antioksidan aktivitesinin bir sonucudur (Ngo vd., 2011). Biyolojik aktiviteleri nedeniyle

esansiyel yağların gıdaların muhafaza edilmesinde, koku endüstrisi ve aromaterapi gibi alanlarda faydalı olduğu bildirilmiştir (Kadri, vd., 2010). *Rosmarinus officinalis* L. bitki içeriğinden sağlanan uçucu yağ ekstraktlarının bileşenleri kendi içerisinde farklılık gösterebilir. Buna rağmen elde edilecek ana bileşenler şöyle sıralanabilir; α -terpineol, β -caryophyllene, limonene, camphene, α -pinene, verbenone, bornly acetate, 1,8- cineole, camphor, borneol, linalool ve sabinene (Bayrak ve Akgül, 1989; Baratta vd., 1998a; Fu vd., 2007; Gachkar vd., 2007). Ekstre içeriği ise şöyledir; rosmarinik asit, karnosol, rosmariquinon, rosmadial, karnosik asit, isorosmanol, rosmanol, rosmaridifenol ve epirosmanol (Bracco vd., 1981; Nakatani ve Inatani, 1981; Nakatani ve Inatani 1984; Houlihan vd., 1984; Houlihan vd., 1985) olarak saptanmıştır.



Şekil 1.5. *Rosmarinus officinalis* L. antioksidan etkiye sahip bileşenleri (Yanishlieva vd., (2006)'den değiştirilmiş)

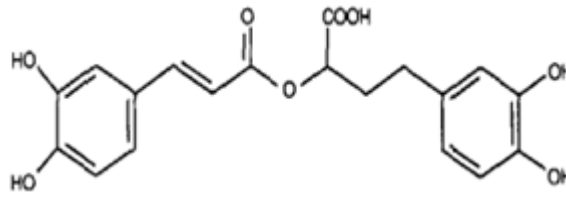
EFSA (European Food Safety Authority) biberiye özütlerinin güvenliğini gözden geçirmiştir (Aguilar vd., 2008). Bunun sonucunda karnosol ve karsonik asit için günde yaşlılar için 0.09, çocuklar için ise 0.81 mg/kg arasında değişebilen yüksek alım tahminleri olduğu sonucuna varmıştır. Günümüzde ise Avrupa Birliği'nde biberiye özleri gıdalara 400 mg/kg'a varan değerlerde eklenmektedir.

Antioksidan özellikler meyve verme aşamaları ile doğrudan ilişkilidir. Karnosol, rosmarinik asit ve hesperidin içeren polifenollerin konsantrasyonlarında meydana gelen artış, ekstraktın antioksidan kapasitesinin gelişmesiyle doğrudan ilişki içerisindedir (Kontogianni vd.,2013).

Rosmarinus officinalis L.'nin antioksidan aktivitesinin en elzem yönlerinden biri, diterpenler ve radikal yakalama aktivitesi arasındaki ilişkidir. Bu bağlamda yapılan bir çalışmada diterpenlerin antioksidan kapasitesi açıklanmaktadır. *Rosmarinus officinalis* L. yapısındaki en önemli unsurlar katekol grubunda bulunan aromatik halka (C₁₁-C₁₂) ile beraber üç temel halkanın konjugasyonudur. Katekol grubu, oksidasyon sonucu oluşan radikal elektronu süpürmekten sorumludur. Üç halkanın meydana getirdiği iskelet, yükün yer değiştirmesine izin verir. Karboksilik grubun varlığı, özellikle sulu sistemlerde bu konjugasyonu artırır. Yağlar gibi hafif polar ortamlarda ise daha fazla stabilite sağlayan lakton yapısıdır (Munné-Bosch vd., 2001).

1.1.4 Rosmarinik asit

Rosmarinus officinalis L.' den ilk kez izole edilen saf bir bileşik olan rosmarinik asit, adını yine bu bitkiden almıştır. Yapı, 3,4-dihidroksifenillaktik asit ester ve bir de kafeik asit olarak aydınlatılmıştır. (Scarpati vd., 1958).



Şekil 1.6. Rosmarinik asidin yapısı

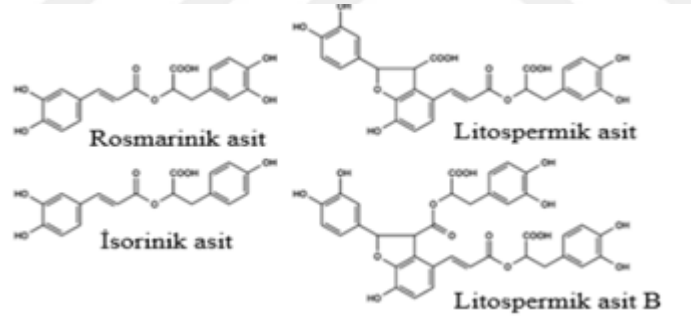
Rosmarinik asit (RA) ve RA türevleri (RAD), şikimat/fenilpropanoid biyosentetik yolağından üretilir. RA başlangıçta bazı eğrelti otu ve boynuz otu türlerinin yanı sıra Boraginaceae'nin daha yüksek bitki türlerinde ve Lamiaceae'nin Nepetoideae alt familyasında bulunmuştur (Petersen ve Simmonds, 2003). Çeşitli bitki türlerinin yakın zamanda taranması ile birlikte rosmarinik asidin kara bitkilerinin en eski gruplarından, bitkilerin oldukça gelişmiş türlerine kadar 26 bitki familyasına dağılmıştır (Petersen vd., 2009).

Rosmarinik asidin yapısı henüz tam olarak aydınlatılmamışken benzeri yapılar aydınlatılmıştır. Bu bileşikler ‘‘Labiatergerbstoffe’’ olarak bilinmektedir.

Bunlar *Lamiaceae* familyasından bilinen bir tanen türüdür. Rosmarinik asit, kafeik asit ile bitkiler aleminde klorojenik asidin yanı sıra en sık bulunan kafeik asit esterlerinden biri olan 3,4-dihidroksifenillaktik asidin bir esteridir.

Kimyasal yapı ilk olarak Scarpati ve Oriente tarafından 1958 yılında tanımlanmıştır. *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinden izole edilmiştir. Rosmarinik asit çok sayıda biyolojik ve farmakolojik aktiviteye sahiptir. Ayrıca bitkinin vakuollerinde depolanır (Chaprin vd.,1984; Häusler vd., 1993).

Rosmarinik asit, ekonomik kullanım imkânı sunan in vitro kültür bitki hücrelerinde yüksek miktarlarda üretilebilir (Petersen, 2013). Her ne kadar yüksek düzeyde RA üreten süspansiyon kültürleri kullanılmış olsa da çeşitli birçok bitkiden elde edilebilir (Matkowski., 2008).



Şekil 1.7. Rosmarinik asit ve bazı türevlerinin yapısı (Scarpati vd., (1958)’den değiştirilmiş)

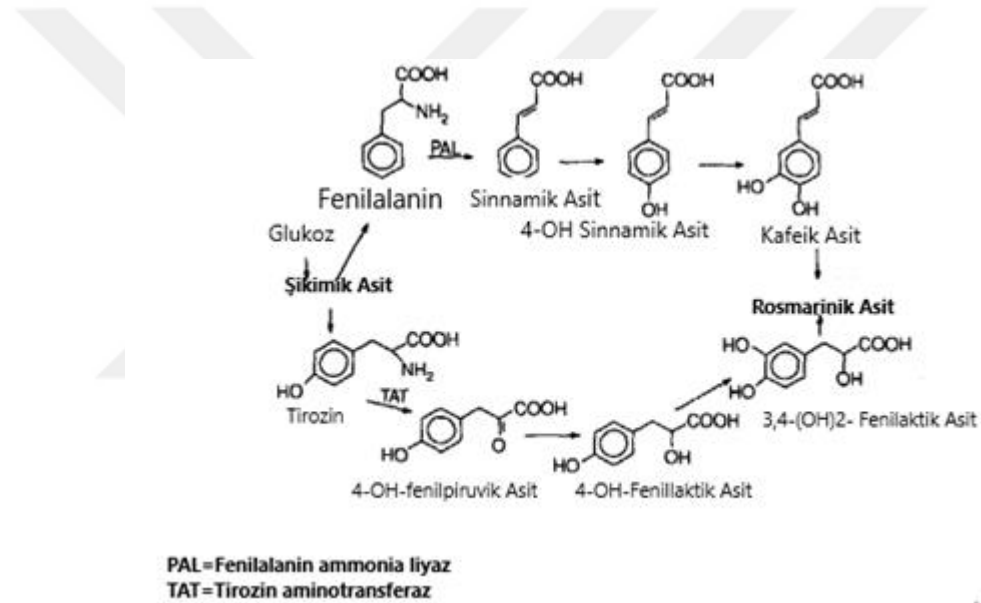
1970 yılında Ellis ve Towers’ın biyogenetik çalışmaları ile birlikte radyoaktif olarak işaretlenmiş aminoasitler ve iki aromatik aminoasit olan fenilalanin ve tirozinin rosmarinik aside dahil edildiğini göstermiştir. Kafeik asit içeren kısım yalnızca fenilalanin ve 3,4-dihidroksifenillaktik asitten oluşur (Ellis ve Towers, 1970).

Rosmarinik asit (α -O-caffeoyl-3,4 dihidroksifenil laktik asit; RA), insan sağlığını iyileştirmek ve gıda bozulmasını önlemek için önemli biyolojik özelliklere sahip olan,

en yaygın olarak Boraginaceae ve Lamiaceae familyalarının türlerinde bulunan, iyi bilinen bir hidroksisinnamik asit esteridir. (Petersen ve Simmonds, 2003).

En çok bilinen rosmarinik asit türevleri, rosmarinik asidin eşleniği olan litospermik asit ve karsonik asittir. Litospermik asit B ise rosmarinik asidin dimeridir (Kelley vd., 1975; Tanaka vd., 1989).

Landmann vd., 2011 yaptıkları çalışma sonuçlarına göre RA' nın farklı bitki sistemlerinde alternatif yollarla sentezlenme olasılığını da artırmaktadır. Fenilalanin ve tirozin amino asitlerinin rosmarinik asit biyosentezinin öncüleri olduğu gösterilmiştir (Ellis ve Towers, 1970).



Şekil 1.8. Fenilalanin ve Tirozinden Rosmarinik asit biyosentezi (Mizukami ve Ellis, 1991; Sumaryono vd., 1991; Petersen vd., (1993)'den değiştirilmiş)

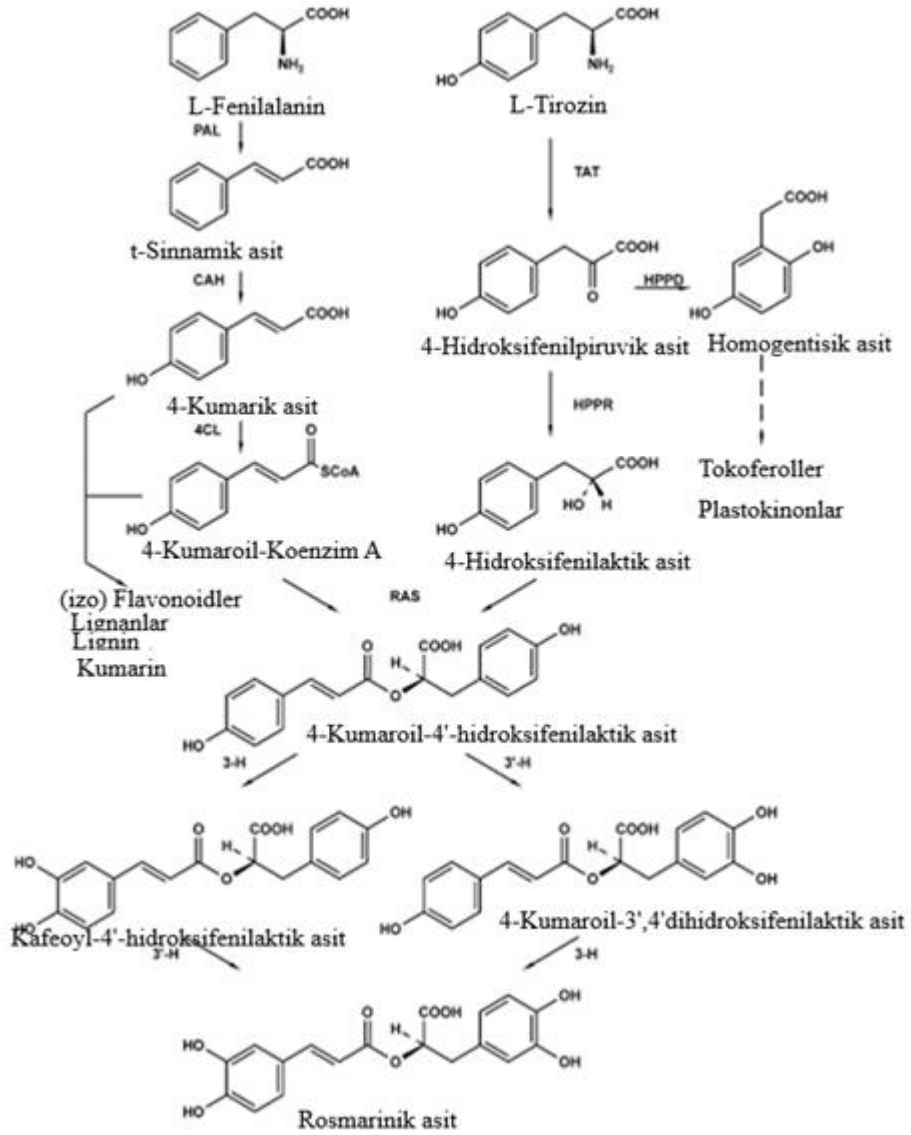
Radyoaktif fenilalanin ve tirozin kullanılarak bu iki amino asidin sırasıyla kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenillaktik asit kısımlarına dahil olduğu tespit edilmiştir (Ellis ve Towers, 1970). Fenilalanin ve tirozinden kaynaklanan RA biyosentezindeki adımlar karakterize edilmiştir (Şekil 1.8.) (Mizukami ve Ellis, 1991; Sumaryono vd., 1991 Petersen vd., 1993). Çeşitli hücre kültürlerinde fenilalanin amonyak liyaz aktivitesi RA ile korele bulunmuştur (Mizukami ve Ellis, 1991; Sumaryono vd., 1991). *A. officinalis* hücre süspansiyon kültürleri kullanılarak tirozin aminotransferazın, tirozinin 3,4-dihidroksifenil-laktik asite dönüşümünün ilk basamağını katalize ettiği bildirilmiştir. *A.*

officinalis'in hücre süspansiyon kültürlerinde tirozin aminotransferazın çeşitli izoformlarının aktif olduğu da saptanmıştır (Mizukami ve Ellis, 1991).

RA üretimi için farklı biyoteknolojik yaklaşımlar Park vd., 2008 tarafından tanımlanmıştır. RA ve türevlerinin biyoteknolojik özelliği, kültürlenmiş bitki hücrelerinde nispeten kolay üretilebilmeleridir. Önemli farmakolojik aktiviteleri ve düşük toksisiteleri göz önüne alındığında, bunların endüstriyel uygulamalarına ilgi duyulması beklenebilir. Ayrıca, kültürlenmiş bitki hücreleri ve dokularında bu polifenollerin yüksek verimlerinin elde edilmesinde önemli ilerleme olmasına rağmen, bunların biyosentezinin kesin düzenleme mekanizması karakterize edilmemiştir.

Endüstriyel ölçekte bitki hücre kültürlerinin ticarileştirilmesini engelleyebilecek önemli bir sorun ise in vitro yetiştirilen bitki hücrelerinin genetik istikrarsızlığı ve heterojenliğidir. Klonal çoğalmaya dayalı doku kültürü, içerik kalitesini ve miktarını korumak için gerekli olan, genetik olarak daha stabil kültürler yetiştirmek için etkili bir alternatif olarak düşünülebilir (Santos-Gomes vd., 2002; Chun vd., 2005). Fitokimyasalların in vitro kültür sistemlerinde birikmesi, metil jasmonat (MeJA) veya salisilik asit (SA) gibi stresle ilişkili bileşiklerin ortaya çıkarılmasıyla kolayca tetiklenebilir (Matkowski, 2008). İkincisi, bitkilerde stres toleransında önemli bir rol oynayan fenolik hormonlardır (Horváth vd., 2007; Vlot vd., 2009).

Rosmarinik asidin kimyasal sentezi 1991 yılında Albrecht tarafından elde edilmiştir (Zinsmeister vd., 1991). O zamandan beri rosmarinik asit ve türevlerinin kimyasal sentezlerinin farklı stereoisomerleri ve benzerleri tarif edilmiştir (Matsuno vd., 2002). Rosmarinik asidin aminoasit öncüllerinin biyosentezinde yer alan enzimler, *Anchusa officinalis* ve *Coleus blumei*'nin süspansiyon kültürlerinde belirlenmiştir (Petersen vd., 1993; Petersen, 1997).



Şekil 1.9. *Coleus blumei* süspansiyon kültürlerindeki rosmarinik asit biyosentetik yolağı (Petersen vd., 1993; Petersen, (1997)'den değiştirilmiş)

Daha önceki çalışmalarda RA'nın antiviral, antibakteriyel, anti-inflamatuar ve antioksidan aktivitelere sahip olduğunu gösterilmiştir (Petersen ve Simmonds, 2003). Ayrıca RA'nın antioksidan aktivitesi doğrulanmış ve membran stabilizasyonu ve membranların oksidatif hasara karşı korunmasına yol açan radikal yayılımının engellenmesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Pérez-Fons vd., 2010). Rosmarinik asit için çok sayıda biyolojik aktivite tanımlanmıştır. Ana etkileri sıralanacak olursa antioksidan, anti-inflamatuvar, anti-mutajen, antibakteriyel ve antiviraldır (Parnham vd., 1985). İkinci önemli noktası *Melissa officinalis*'in rosmarinik asit içeren özleri Herpes simpleks enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır. Anti-inflamatuvar özelliklerin,

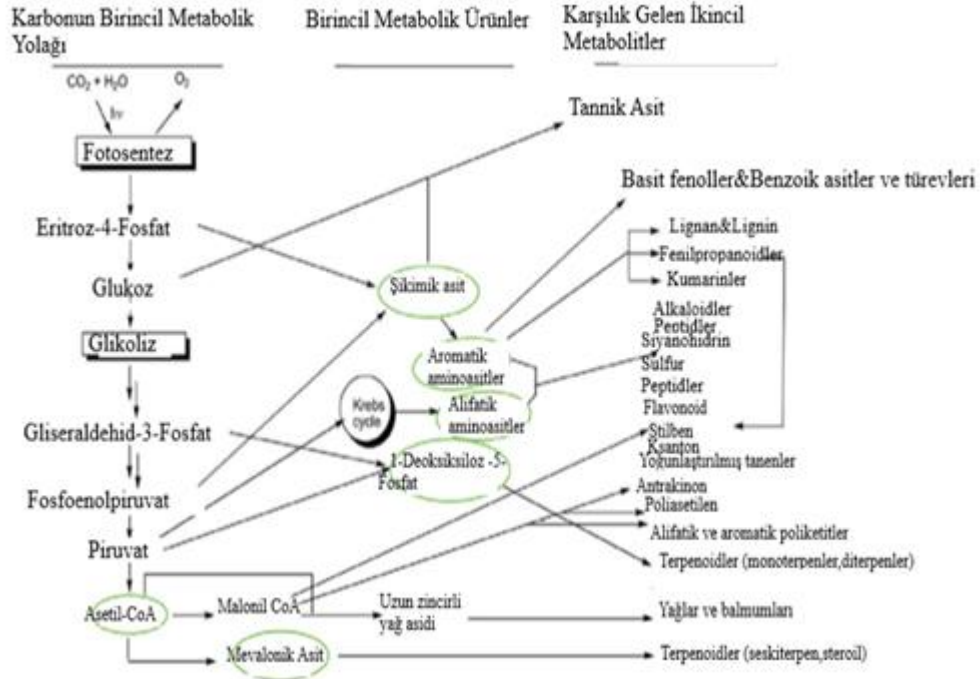
lipoksijenaz ve sitooksijenazın inhibisyonuna ve rosmarinik asidin kompleman kaskadı ile etkileşimine dayandığı düşünülmektedir (Parnham vd., 1985).

Rosmarinus officinalis L. ve *Sanicula europaea* L. gibi kozmetik endrüstrisinde önemli bir yere sahip olan bitkilerin yapısında bulunan rosmarinik asit gibi fenolik bileşikler, antioksidan aktiviteye katkıda bulunurken kansere karşı da koruyucu görev üstlenebilirler (D'Amelio, 1999).

1.2 Sekonder Metabolitler

Metabolizma, bir organizmada meydana gelen tüm yapım ve yıkım olaylarını içeren biyokimyasal reaksiyonların tamamı olarak açıklanabilir. Metabolitler ise metabolizmadaki ara ürün ve ürünler olarak tanımlanabilirler. Genel olarak küçük moleküllerle sınırlıdır. İkincil terimi ilk kez Kossel tarafından 1891 yılında ortaya atılmıştır. Primer metabolitlerin bölünme yeteneğine sahip her canlı hücrede var olmasına karşın, sekonder metabolitlerin tesadüfi olarak bulunduğu ve organizmanın yaşam için çok önem arz etmediğini savunur. Sekonder metabolitler, birincil metabolizmadan türetilmelerine karşın organizmanın temel moleküler iskeletini oluşturmazlar (Tiwari ve Rana, 2015). Primer ve sekonder metabolitler arasındaki farklar çok belirgin değildir. Bunun sebebi ise birincil metabolizmadaki ara ürünlerin birçoğunun sekonder metabolitlerin ara ürünleri ile örtüşüyor olmasıdır (Verpoorte vd., 2000).

Bir ara ürünün genel yapısı, birincil ve ikincil metabolizma tarafından paylaşılan ortak biyokimyasal yolağa işaret eder (Yeoman ve Yeoman, 1996). Sekonder metabolitler, fazla Karbon (C) ve Azot (N)'un birincil metabolizmanın aktif olmayan kısmını oluşturmak üzere tampon bölge olarak görev alır. Depolanan Karbon (C) ve Azot (N), gerektiğinde sekonder metabolitin, metabolik yollarla parçalanması sonucu primer metabolite geri dönebilir.



Şekil 1.10. Primer ve sekonder metabolizmanın entegrasyonu (Collin, (2001)'den değiştirilmiş)

Çok sayıda sekonder metabolit, insanoğlu tarafından tıbbi amaçlı (enzim inhibitörleri, antitümör ajanlar, antibiyotikler, immünomodülatörler, bitki-hayvan büyüme destekleyicileri gibi), beslenme piramidini desteklemek (pigmentler ve nutrasötikler) ve tarımsal verimliliğin iyileştirilmesi (insektisit ve herbisitler, simbiyozlar v.b) gibi alanlarla ekonomiyi ve toplumu olumlu yönde etkilemişlerdir (Demain ve Fang, 2000).

1.2.1 Sekonder metabolitlerin sınıflandırılması

İki milyondan fazla sekonder metabolitin varlığı bilinmektedir. Yapı, işlev ve biyosentezindeki çeşitliliğe göre sınıflandırılırlar. Ribozomal olmayan polipeptidler, yağ asitlerinden türevli maddeler ve poliketidler, enzim kofaktörleri, steroidler& terpenoidler ve alkaloidler gibi beş ana sekonder metabolit sınıfı vardır (McMurry, 2015).

- **Terpenoidler ve steroidler**

İzopentenil difosfattan biyosentetik olarak türetilen ana gruptur. Şu anda bilinen 35.000'den fazla terpenoid ve steroid bileşiği tanımlanmıştır. Terpenoidler farklı ilgisiz

yapılara sahipken, steroidler ortak bir tetrasiklik karbon iskeletine sahiptir ve triterpen lanosterolden biyosentezlenen modifiye terpenoidlerdir.

- **Alkaloidler**

Alkaloidlerin bilinen 12.000'den fazla bileşimi vardır ve temel yapıları bazik amin grubundan meydana gelir. Aminoasitlerden biyosentetik olarak türetilir.

- **Yağ asidi türevli maddeler ve poliketidler**

Propiyonil CoA, Asetil CoA ve metilmalonil CoA gibi basit asit öncüllerinden yaklaşık olarak 10.000 bileşik tanımlanıp biyosentezlenir.

- **Nonribozomal polipeptidler**

Bu aminoasitlerden türetilen bileşikler, doğrudan RNA transkripsiyonu olmadan çok işlevli bir enzim kompleksi tarafından biyolojik olarak sentezlenir.

- **Enzim kofaktörleri**

Enzim kofaktörleri protein olmayan düşük moleküllü enzim bileşenleridir (McMurry, 2015).

1.2.2 Sekonder metabolitlerin fonksiyonları

Sekonder metabolitlerin başlıca işlevleri şunlardır:

- a. Metal taşıma ajanları
- b. Hayvanlar, bitkiler, böcekler ve mikroorganizmalar gibi diğer canlılara karşı rekabetçi sayılabilecek bir madde
- c. Organizmalar arasındaki iletişim ajanları
- d. Simbiyotik ilişki ajanları
- e. Farklılaşma efektörleri

- f. Üreme ajanı
- g. Farklılaşma efektörleri

Diğer işlevleri ise spor oluşumuna etki (zorunlu değil) ve çimlenmeyi içerir (Demain ve Fang, 2000).

Ağırlıklı olarak sekonder metabolitler; Antimikrobiyal ve anti-parazitik maddeler, enzim inhibitörleri ve antitümör ajanlar, immunosupresif ajanlar gibi çeşitli biyolojik aktiviteler için kullanılırlar (Demain, 1999).

1.2.3 Sekonder metabolit kaynakları

Sekonder metabolitlerin başlıca kaynakları bitkilerdir (sekonder metabolitin % 80'i).

Çizelge 1.2. Doğal sekonder metabolitler (Bérdy, (2005)'den değiştirilmiş)

Kaynak	Bilinen Bileşikler	Biyoaktifler	Antibiyotikler
Doğal Ürünler	>1.000.000	200.000-250.000	25.000-30.000
Bitki Alemi	600.000-700.000	150.000-200.000	-25.000
Mikroplar	50.000'den fazla	22.000-23.000	-17.000
Algler ve Likenler	3.000-5.000	1500-2000	-1000
Yüksek Bitkiler	500.000-600.000	-100.000	10000-12000
Hayvan Alemi	300.000-400.000	50.000-100.000	-5000
Protozoa	Birkaç yüz tane	100-200	-50
Omurgasızlar	-100.000	NA	-500
Deniz Hayvanları	20.000-25.000	7.000-8.000	3000-5000
Böcekler/Solucanlar vs.	8.000-10.000	800-1000	150-200
Omurgalılar	200.000-250.000	50.000-70.000	-1000

Bakteri, mantar ve birçok deniz anası da (süngerler, mercanlar, salyangozlar vs.) başlıca kaynaklardır.

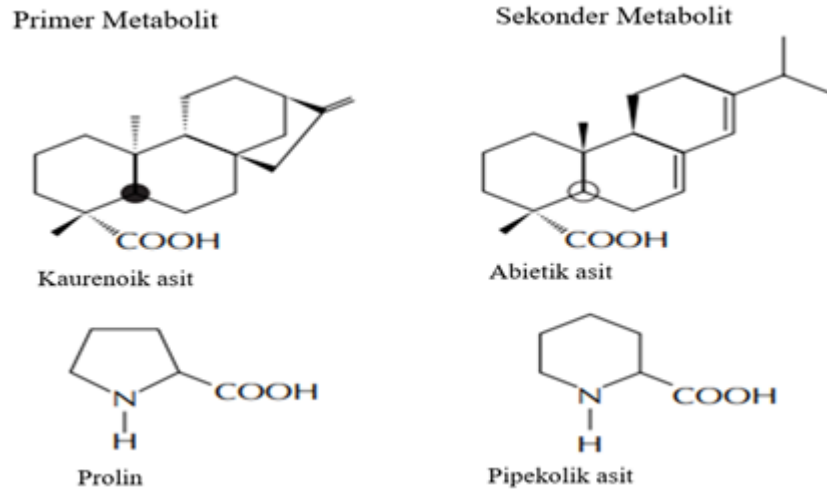
1.2.4 Bitkilerde sekonder metabolitler

Bitki hücrelerinden elde edilen ürünler primer metabolitler (birincil) ve sekonder metabolitler (ikincil) olarak iki sınıfta incelenirler. Primer (birincil) metabolitler,

hücrelerin canlılığı için oldukça elzemdir. Buna karşın sekonder metabolitler, yaralanma veya biyotik/abiyotik stres koşullarına karşı savunmada görev alırlar (Yang vd., 2018). Bu nedenle alkaloidler, tanenler, glikozitler, terpenoidler ve flavonoidleri içeren sekonder metabolitler, insanlarda çeşitli hastalıkların tedavisinde terapötik kullanım alanlarına sahiptirler (Wisdom vd., 2016). Bitki sekonder metabolitleri, ekonomik açıdan oldukça değerli maddeleri temsil ederler. Bunlar; ilaçlar, tatlar, kokular, böcek öldürücüler, boyalar olarak sıralanabilir. Bitkiler, fenoller ve bunların oksijenli türevleri olan aromatik maddeleri sentezlemek için büyük yeteneğe sahiptir (Elvin-Lewis ve Lewis, 1995).

Primer ve sekonder metabolitler öncül molekülleri, kimyasal yapıları veya biyosentetik kökenleri temel alınarak kolayca ayırt edilemezler. Örneğin diterpenler (C_{20}) ve triterpenler (C_{30}) arasında hem primer metabolitler hem de sekonder metabolitler bulunur. Örneğin diterpen grubunda hem kaurenoik asit ve abietik asit bulunur. İlki giberellin sentezinde temel bir ara maddedir. İkincisi ise bir reçinedir.

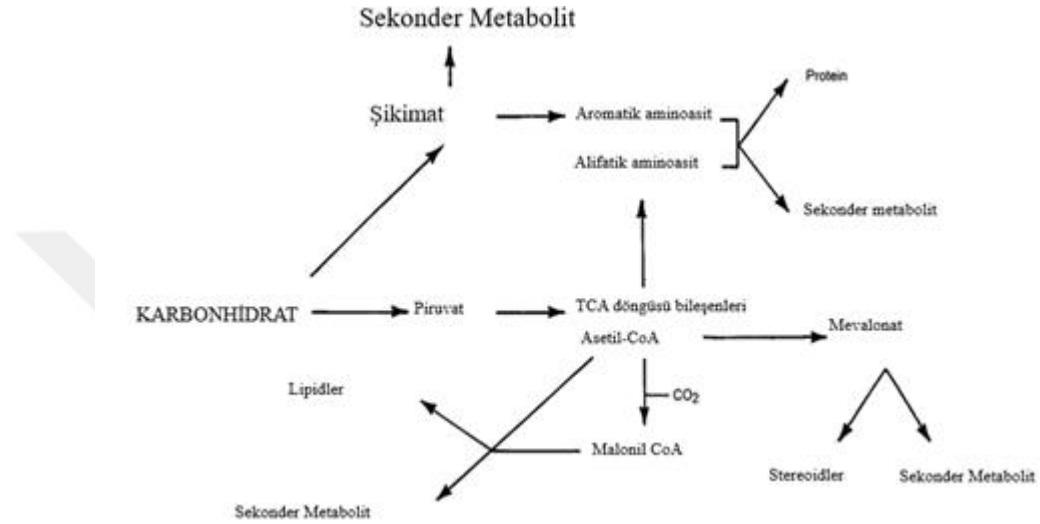
Enzimatik reaksiyonları oldukça benzer dizilere sahiptirler. Ayırt edilmeleri bir dizi temellere dayalıdır. Aynı şekilde, esansiyel bir aminoasit olan prolin bir primer metabolittir. Buna karşın C_6 analogu olan pipekolik asit bir alkaloiddir (Croteau vd., 2000).



Şekil 1.11. Kaurenik asit ve prolin primer metabolit iken yakın ilişkili olan abietik asit ve pipekolik asit sekonder metabolit olarak kabul edilir (Croteau vd., (2000)'den değiştirilmiş)

Yaklaşık 25.000 terpenoid, sekonder bileşikler olarak bilinirler ve beş karbonlu öncü izopentenil difosfattan (IPP) türetilir. Yaklaşık olarak tanımlanan alkaloid sayısı ise 12.000 civarındadır.

Bilinen 8.000 fenolik bileşik ya şikimik asit yoluyla ya da malonat/asetat yoluyla sentezlenirler (Croteau vd., 2000).



Şekil 1.12. Sekonder metabolit biyosentezi için dört ana yol. Diyagram kısaltılmış haldedir (Smith vd., (1998)’den değiştirilmiş)

Yapılan çeşitli in vitro çalışmalar, doğal fenollerin antimikrobiyal (Rauha, vd., 2000), antiviral (Perez, 2003), antiinflamatuvar (Santos vd., 2000) ve damar genişletici özelliklere (Padilla vd., 2007) sahip olduğunu göstermiştir.

Çizelge 1.3. Bitkilerdeki bazı sekonder metabolitlerin biyolojik aktiviteleri (Merillon ve Ramawat, (2007)’den değiştirilmiş)

Sekonder Metabolit	Biyolojik Aktivite
Kapsaisin	Vanilya
Vanilin	Kauçuk
Gutta Perka	Esansiyel yağ
Terpendidler	Spazm çözücü
Papaverin	Hipertansif
Ajmalisin	Uyarıcı
Kafein	Antispazmodik
Berberin	NA

Organize olmayan kallus veya süspansiyon kültürleri yoluyla sentezlenerek bitkiyi olumsuz etmenlere karşı korur. Ancak bitkide özelleşmiş kısımlarla sınırlı olduğunda organ kültürleri tercih edilebilir. Örneğin; antidepresif hiperisin ve hiperforin farklılaşmamış hücrelerden sentezlenemeyen *Hypericum perforatum*'un yaprak kısımlarında lokalize haldedir (Smith vd., 2002). Bazı mikrobiyal bitki patojenleri toksik yapıda sekonder metabolitler üretirler. Patojenler, mantarlar arasında konakçı üzerinde zararlı etkilere sebep olurlar. Örneğin, *Gibberella fujikuroi* bitki hormonu olan giberellik asidi büyük miktarda üretir (Cross vd., 1963).

1.3 Bitki Doku Kültürü

Bitki doku kültürü, aseptik şartlar altında ve uygun çevresel koşullar altında yapay besi ortamında bir bitkinin belirli kısımlarından (kök, gövde, yaprak vs.) yeni doku, bitki veya bitkisel ürünleri elde etme teknikleridir. Tüm canlı organizmaların yapısını, temel hücre birimini ve totipotensi kavramını deneysel bir yaklaşım ile göstermiştir (Haberlandt, 1902). Bitki doku kültüründe temel ilkeler söz konusudur.

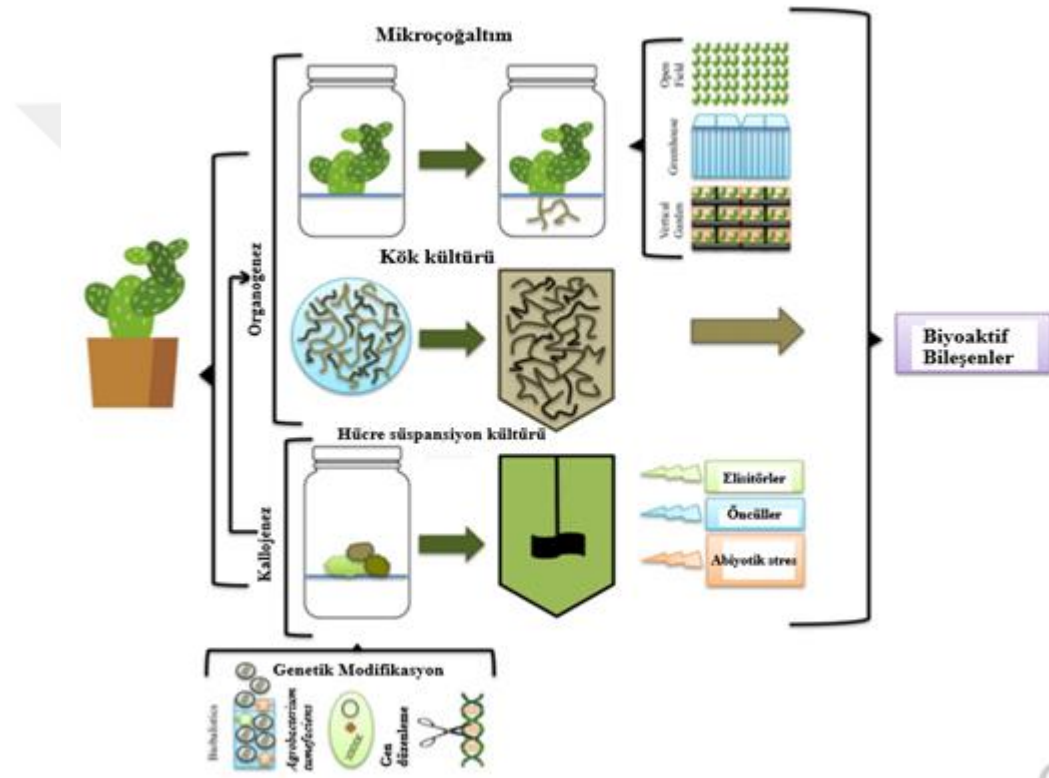
Öncelikle sağlıklı bir bitkiden eksplant elde edilmesi gereklidir. Doku kültürü tekniklerinin geliştirilmesi, hücrelerin iki temel özelliğine dayanır: Bunlardan ilki hücre totipotensisi (Vasil vd., 1965), ikincisi ise hücre plastisitesi (Thrope, 2007). Hücre totipotensisi, tüm canlı hücrelerin yeni bir hücre meydana getirebilmek için sahip olduğu genetik olarak korunan kapasitedir. Totipotensideki mantık, hücre bölünmesi ve sonrasındaki farklılaşma süreçlerinde doku, organ ve sistemleri koruyarak eksiksiz şekilde yeni bireyler oluşturmaktır (Haberlandt 1902; Takebe vd., 1971).

Hücre plastisitesi ise bitki ve hayvan hücrelerindeki çoğalma, bölünme, farklılaşma ve yeni birey oluşturma kapasitesidir. Hayvanlardan farklı olarak bitkiler, uzun yaşam periyotlarına sahip organizmalar olarak nitelendirilebilirler. Çeşitli biyotik ve abiyotik faktörlere maruz kaldıklarından hayatta kalmak için savunma mekanizmaları geliştirmek zorundadırlar. Bunun için dış uyaranlara yanıt vermesi doğal bir süreçtir (Garcia- Gonzáles vd., 2010).

Bitki doku kültüründe dünya çapında esas alınan birkaç temel başlangıç noktaları vardır. Bitki doku kültüründe öncelikle çeşitli mikrobiyal kaynaklar ortadan

kaldırılmalı, eksplantta meydana gelebilecek olan kontaminasyona dikkat edilmeli ve kültürde kontrollü çevre koşulları sağlanmalıdır.

Tüm bu aşamalardan sonra ise aklimatizasyon işlemi ile ex-vitro ortama aktarım sağlanmalıdır. Bitkinin kültüre alınan kısmına bağlı olarak hücre kültürü (hücre süspansiyon kültürü, protoplast kültürü, gametik hücreler), kallus kültürü (farklılaşmış dokular) ve organ kültürü (kökler, sürgünler, anterler) tercih edilebilir. Her kültür tipi farklı temel ve biyoteknolojik uygulamalar için kullanılır (Loyola-Vargas vd., 2018).



Şekil 1.13. In vitro koşullarda biyoaktif bileşiklerin üretimi için kullanılan mevcut yöntemler (Debnath vd., 2006; Altpeter vd., (2010)’dan değiştirilmiş)

1.3.1 Hücre kültürü

Alman botanik bilimci Gottlieb Haberlandt, 1898 yılında izole edilmiş ve farklılaşmış hücreleri kültüre alan ilk kişi unvanına sahiptir (Bhojwani vd., 1986). Bitki hücre kültüründe bitki doku ve organlarını kullanarak deneme yapmak, yüksek oranda besin ortamının kalitesi ile ilişkilidir. Kimyasal olarak tanımlanmış bileşiklere” sentetik ortam” adı verilir. En eski bitki doku kültürlerinden biri olarak kabul edilen White

(1939), bir kök kültürü ortamıdır. Murashige & Skoog (1962) tarafından hazırlanan formül (MS Medium) standart ortam olarak kabul edilir. MS ortamı doku kültürlerinde organik katkıların etkilerini araştırabilmek için tasarlanmıştır. Linsmaier & Skoog (LS) (1965), Gamborg vd., (1968) ve Schenk & Hildbrandt (SH) (1972) diğer besin ortamları olarak sıralanabilirler. Besiyerleri inorganik maddeler açısından standart olacak şekilde formüle edilmiştir.

1.3.2 Organ kültürü

Hücre süspansiyon kültürleri kullanılarak sekonder metabolit üretimi her zaman mümkün olmayabilir. Bu yüzden bitkilerde sekonder metabolitlerin üretiminde kullanılmak üzere organ kültürü yöntemleri kullanılarak (kök, embriyo, sürgün) farklı alternatifler geliştirilmiştir (Giri vd., 2000; Verpoorte vd., 2002; Murthy vd., 2008; Baque vd., 2012). Birçok tıbbi bitki için uygulanmış ve sekonder metabolit birikiminin, bitkinin kendisine oranla daha fazla olduğu gösterilmiştir (Praveen vd., 2009). 20. yüzyıla gelindiğinde eksize edilen bitki eksplantlarının kültür ortamlarında büyütülmesi çabaları steril yöntemlerin ivme kazanmasıyla da devam etmiştir. Eksplantların büyümesi için B vitamininin ve oksinlerin gerekliliği keşfedilmiştir. Dokuların büyümesini sürdürmeyi başaran ilk başarılı çalışma 1934 yılında White tarafından yapılmıştır. Aseptik koşullar altında izole edilmiş domates kök kültürleri geliştirilmiştir (Gautheret, 1983).

1.3.3 Kallus kültürü

Kallus kültürleri, bitkisel kaynaklı ürünlerin insan yararına kullanılması açısından biyoteknoloji alanında çok önemlidir. İlaç, gıda ve kozmetik endüstrileri açısından faydalı içeriklerin üretimleri sağlanabilir (Eibl vd., 2018). Doku kültürleri genellikle kallus kültürü ile başlar. Kallus, organize olmamış bitki hücre yığıdır. Direkt ya da indirekt organogenez, bitki rejenerasyonu, somatik embriyogenez ve hücre süspansiyon kültürlerinin ilk adımı noktası kallus kültürüdür (Topçu ve Çölgeçen, 2015). Kallus kültürleri, terapötik metabolitlerin yabani bitkilerden elde edilmesine kıyasla daha hızlı ve güvenilir bir yöntemdir (Efferth, 2019). Biyoloji mühendisliği ve proses mühendisliğinde farmasötik bileşikler son yıllarda oldukça önem kazanmıştır.

Bu bileşiklerin üretimini en üst düzeye çıkarmak için çeşitli teknikler geliştirilmektedir (Ogita, 2015).



Fotoğraf 1.1. Kallus kültürü (Dagla, 2012)

Terapötik maddelerin üretimi için kallus kültürlerinde iki aşama vardır. Bunlardan ilki kallus gelişiminin iyi olması, ikincisi ise maksimum düzeyde sekonder metabolit elde edilmesidir (Efferth, 2019). Kallus oluşumu için ışık, sıcaklık, nem ve besin maddelerinin optimum düzeyleri gereklidir. Ayrıca kalluslar farklı biyotik ve abiyotik uyaranlar sonucu oluşurlar. Bitki fizyoloğu FW Skoog, in vitro kallus oluşumundan oksin ve sitokinin oranlarının sorumlu olduğunu bildirmiştir (Skoog, 1957).

Biyotik (pektin, pektik asit, kitin, kitosan, glukanlar) ve abiyotik (yüksek sıcaklık, UV, osmotik basınç, antibiyotikler) sekonder metabolitleri üretmek için bitki genomunun ilgili bölümlerinin transkripsiyonunu indükleyerek hareket ederler (Kaur vd., 2018).

1.4 Bitki Büyüme Düzenleyicileri

In vitro yöntemler, geleneksel ıslah yöntemlerine ek olarak, 1960'lardan beri bitkilerde modifikasyon ve iyileştirme amacıyla kullanımı giderek artmıştır. Bu teknikler in vitro tozlaşma ve döllenme, embriyo kültürü, anter ve mikrospor yoluyla haploid üretim sayılabilir (Gaspar vd., 1996).

Oksinler, absisik asit (ABA), sitokininler, etilen ve giberellinler yaygın olarak kullanılan ve doğal olarak meydana gelen, temel beş ana bitki hormonlarındandır.

Oksinler, sitokininler ve oksin-sitokinin etkileşimlerinin düzenlenmesi, bitki doku ve organ kültürlerinde büyüme ve gelişme açısından oldukça önem arz etmektedir (Evans vd., 1981; Thrope, 1994). Bunun yanı sıra ABA, etilen, giberellinler ve diğer hormon benzeri bileşikler, çeşitli kültür sistemlerinde göz ardı edilmemesi gereken düzenleyici rollere sahiptirler. Bu hormonlar bilinenin aksine organizma içerisinde sentezlenirler. Çeşitli dokularda büyüme ve gelişmede aktif ama gizli bir rol oynamaktadırlar. Aynı zamanda çeşitli hormon sınıfları, dirençli dokularda ve eksojen uygulamalarda iyi yanıt oluşturabilirler. Doğal bitkisel hormonlar gibi davranış sergileyen sentetik bileşikler, “bitki büyüme düzenleyicileri” olarak adlandırılırlar (Davies, 1995). Birçok bitki türünde endojen hormona eşit veya daha yüksek biyolojik aktiviteye sahip büyüme düzenleyicileri keşfedilmiştir. Klasik bitki hormonlarına ek olarak doku kültürlerinde düzenleyici rollere sahip doğal bileşikler keşfedilmiştir (Gross vd., 1994). Poliaminler, jasmonatlar, brassinosteroidler, oligosakkarinler, steroller, fosfoinositotler, sisteminler ve salisilik asit örnek olarak verilebilir. Genellikle farklı sınıflardan bir veya daha fazla büyüme düzenleyicinin kombinasyonları aynı anda ya da sırayla uygulanır (Evans vd., 1981). Doğrudan yapılan uygulamaların yanı sıra, dışsal olarak uygulanan sentetik ve doğal düzenleyicilerin hücresel mekanizmalar üzerindeki etkisi, yıkım, aktivasyon, taşıma ve duyarlılık üzerinde değişimlere sebep olabilir (Beale vd.,1993; Davies, 1995).

1.4.1 Oksinler

Oksinler, hücresel gelişim süreçlerinde güçlü etkilere sahiptirler. Hücre duvarı, hücre bölünmesi, meristem dokuların organizasyonlarında, bitkilerde kök oluşumu ve doku kültürlerinde kallus oluşumlarını ve farklılaşmaları destekler. Oksinler dokularda adeta anahtar rollere sahiptirler. Apikal dominans sağlamak, kök ve tropistik hareketlerin teşviki, yaprak yaşlanmasını geciktirmek ve meyve olgunlaşması gibi etkilere sahiptirler (Addicott, 1982; Sabater, 1985; Chandler vd., 1986; Liu vd., 1992; Tamas, 1995; Aloni, 2010).

- **Doğal olarak oluşan oksinler**

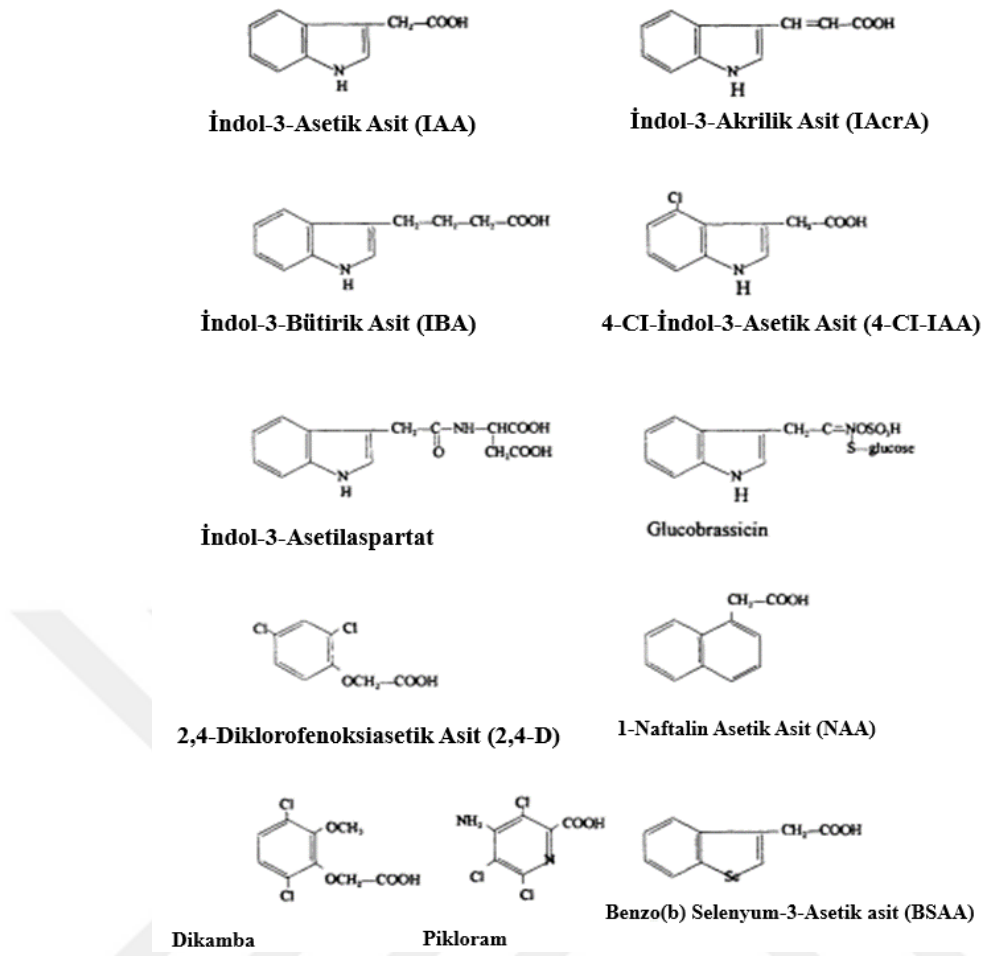
En yaygın olarak bulunan doğal oksin, indol-3-asetik asittir (IAA). Fakat bitkinin yaşına, mevsimsel koşullara bağlı olarak diğer oksinler de meydana gelmiştir.

Örnek verecek olursak, 4-kloroindol-3asetik asit, indol-3-akrilik ve indol-3-bütirik asit (IBA) tanımlanmıştır. IAA 'nın indol-3-piruvik asit ya da triptamin yoluyla L-triptofandan oluştuğu bilinmesine rağmen başka yollar da mevcuttur (Bandurski vd., 1995). Kendi başlarına oksin benzeri özelliklere sahip olan bazı oksin öncülleri, bazen IAA 'nın yerine geçebilir, büyüme teşviki veya indüklemeye orijinal oksinden daha etkili olabilir.

Bitki doku kültürlerinde, IAA ve diğer doğal oksinler küçük moleküllerle (alkoller, aminoasitler, şekerler) bir araya gelerek ester, amid, ya da glikozit konjugatları üretir (Bandurski vd., 1995).

Böylece oksinleri hücrelerde depo edip fazlalığı metabolize ederek serbest oksin düzeyini stabilize eden bir sistem ortaya çıkarılmış olur. Oksin, konjuge moleküllerle oksidatif parçalanmadan korunur ve gerektiğinde enzimatik olarak salınır.

Bitkilerde büyüme düzenleyicisi olarak IAA konjugatlarının kültürler üzerine başarılı kullanımları üzerine birkaç rapor da bildirilmiştir (Bandurski vd., 1995).



Şekil 1.14. Bazı doğal ve sentetik oksinler (Bandurski vd., (1995)'den değiştirilmiş)

- **Oksin benzeri büyüme düzenleyicileri**

Sentetik IAA (indol-3-asetik asit) ve IBA (indol-3-bütirik asit) oksinler, bitki kültür ortamlarında geniş çapta kullanılmaktadır. Bitki dokularında hızla metabolize edilir ve ortamda denatüre olma eğilimindedirler. Bu nitelikler daha az oksin kullanımında devam eden gelişim aşamalarında (örneğin köklendirme) ya da oksin-sitokinin oranını değiştirme gibi durumlarda (organogenez ve kallus farklılaşmasında) yararlı olabilmektedir (Gaspar vd., 1994). Hem doğal olan hem de çeşitli sentetik indol türevleri kültür ortamlarında aktiftirler.

Örneğin; indol-3asetaldehit, indol-3-asetamid, indol-3-asetonitril, indol-3-laktik asit, triptofan, indol-3-propionik asit, indol-3-piruvik asit, indol-3akrilik asidin yanı sıra fenilasetik asidin bütün kallus kültürlerinde kallus ve sürgün oluşumunu desteklediği bildirilmiştir (Maeda vd., 1979).

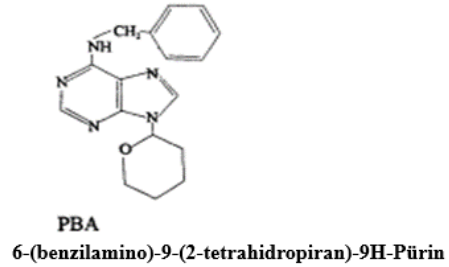
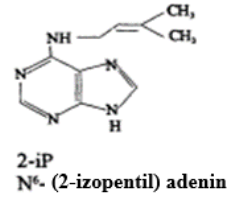
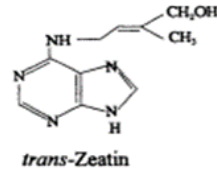
Doku kültürlerinde sıklıkla kullanılan sentetik oksinler 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D; kallus indüksiyonunda) ve 1-naftalin asetik asit (NAA; organogenezde)' tir. Bunların yanı sıra 3,6-dikloro-o-anisik asit (dicamba), 4-amino-3,5,6-trikloropiridin-2-karboksilik asit (pikloram; ticari olarak seçici herbisit olarak kullanılır) genelde embriyojenik doku ya da süspansiyon kültürlerinin sürdürülmesinde tercih edilir (Gray, D.J. vd., 1985; Li, Y. vd., 1991). Benzo (b)selenienyl-3 acetic acid (BSAA), oksin benzeri olan güçlü bir sentetiktir (Lamproye vd., 1990; Gaspar, 1995). Bazı sentetikler oksin taşınmasının inhibitörleri olarak hareket eden anti oksinler olarak hareket ederler. Fakat bu eylemler oldukça karmaşıktır ve henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Kültürlerde sıklıkla kullanılan bileşikler TIBA (2,3,5-tri-iyodobenzoik asit), PTAA [(3, fenil-1,2,4 tiadiazol-5-il) tioasetik asit], NPA (N-l-naftilftalamik asit), 2,4,6-triklorofenoksiasetik asit (2,4,6-T) ve PCIB (p-klorofenoksiizobütirik asit) 'tir (George vd., 2008).

1.4.2 Sitokininler

Sitokininlerin bitki kültürlerinde iki temel özelliği vardır. Bunlardan birincisi hücre bölünmesinin uyarılması (genellikle oksinlerle birlikte), ikincisi yanal tomurcuk gelişimi (Fabijan vd., 1981; Krikorian, 1995). Hücre bölünmesi oksinlerin ve sitokininlerin ortak etkisiyle düzenlenir. Her biri hücre döngüsünün farklı aşamalarını etkilerler. Oksinler, DNA replikasyonunu etkiler. Bunun yanı sıra mitoz ve sitokinez üzerinde kontrole sahiptirler (Veseley vd., 1994). Kültürlerde kullanılan oksin ve sitokinin seviyeleri dikkatle kontrol edilmeli ve dengelenmelidir. Bitkilerde sitokininler, tomurcuk gelişimini ve yaprak ayası genişlemesini teşvik eder. Ayrıca yaprak yaşlanmasını geciktirir, klorofil sentezini ve kloroplast gelişimine etki eder (Kuhnle vd., 1977).

- **Doğal olarak oluşan sitokininler**

Sitokininler, serbest bileşikler, glikozitler ya da ribositler olarak tanımlanmıştır. Bitki doku kültürlerinde en sık kullanılan sitokininler zeatin, 2 iP, dihidro-zeatin ve zeatin ribosittir. Bu doğal sitokininler N⁶ konumuna bağlı bir izoprenoid yan zincir içermektedir.



Şekil 1.14. Bazı doğal ve sentetik sitokininler (Gaspar vd., (1996)'den değiştirilmiş)

N⁶ konumunda bulunan aromatik halkaya sahip sitokininler (6-benziladenin ve glikozitleri) de son yıllarda tanımlanmıştır.

Çizelge 1.4. Doğal olarak oluşan sitokininler (Strnad vd., (1992)'den değiştirilmiş)

	İKAME EDİCİ			KISALTMA
	R ₁	R ₂	R ₃	
		H	H	BA
		H	Rib	[9R]BA
		H	Rib-5'-P	[9R-5'P]BA
		H	Glc	[9G]BA
		H	H	(oOH)BA
		H	Rib	(oOH)[9R]BA
		CH ₂ S	Glc	(oOH)[2MeS 9G]BA
		H	H	(mOH)BA
		H	Rib	(mOH)[9R]BA

Birçok dokuda sitokininler genellikle etileni destekler niteliktedir. Bitki metabolizması ve fizyolojisi üzerindeki etkileri, absisik asit (ABA) ile antagonize edilebilir (Gamborg vd., 1971; Wright vd., 1979; Abeles, 1992).

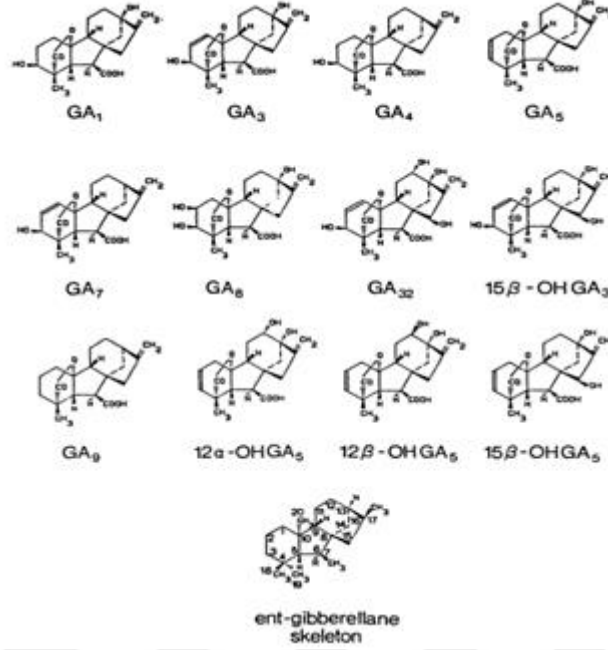
1.4.3 Giberellinler

Giberellinler, özellikle bazı bitki türlerinde (uzun gün veya soğuk gerektiren) çiçeklenmeye teşvik edebilir, bazı kozalaklı ağaçlarda koni başlangıcına zemin hazırlayabilir, tohum çimlenmesi ve gövde uzaması gibi etkilere sebep olabilir. Giberellik asidin etkisi, spesifik enzimlerin biyosentezindeki artışlardan veya aktivitesindeki azalmalardan kaynaklanır. Bitki doku kültürlerinde ortama giberellinler eklendiğinde, her ne kadar tersi bir durum görülse de kök, sürgün veya somatik embriyo oluşumunu azaltır ya da önler. Bazen de kallus gelişimi için giberellinler gereklidir (Lance vd., 1976b). Ayrıca sıvı kültür ortamlarında giberellik asit inhibisyonu, hücre gelişimini etkileyebilir (Ziv vd., 1991). Gelişigüzel kök ve sürgün oluşumunun engellenmesi veya teşvik edilmesi, giberellik asitlerin meristemoid başlangıca olumsuz etki etmesinden kaynaklanıyor olabilir (Thrope vd., 1970), fakat önceden meydana getirilmiş bir sistemin büyüme ve gelişmesine katkı sağlaması açısından gereklidir. Giberellik asitler sürgün kültürlerine eklenerek meristem sürgünlerin geliştirilmesine katkı sağlarlar (Fry vd., 1980).

Doğal olarak bulunan yaklaşık 90 adet giberellik asit bilinmektedir. Doğal GA-O-Glukozitler, potansiyel serbest bir giberellik asit kaynağı olarak kabul edilir. Kültüre edilmiş kallus hücreleri kendi giberellik asitlerini kendileri sentezlerler ve dışardan eklenen giberellik asitleri metabolize edebilirler (Lance vd., 1976a). 19 karbon atomuna sahip olan giberellik asit son derece florijeniktir. C-7 bir karboksil grubudur. A halkası $\Delta^{1,2}$ ya da $\Delta^{2,3}$ tür ve C halkası hidroksillenmiştir (C-13) ya da C/D halkaları polihidroksillenir (C-12,13 ve 15) (Pharis vd., 1992).

Giberellik asitlerin diğer hormonlarla birçok etkileşimi vardır. Giberellik asit kaynaklı α -amilaz aktivitesi, ABA tarafından antagonize edilir. Etilen blokları giberellik asitlerin yanıt verme yeteneklerini destekler. Ayrıca giberellik asit, yanal ve taç yapraklarda etilenin sebep olduğu yaşlanma etkilerini antagonize eder. Işığın dalga boyu ve

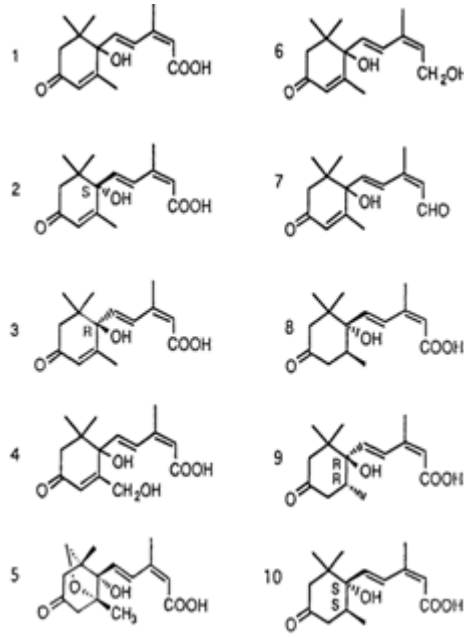
fotoperiyod koşulları, giberellik asit metabolizmasını oldukça etkiler. Buna rağmen kesin mekanizmayı saptamak için çeşitli çalışmalara ihtiyaç vardır (Reid, 1991).



Şekil 1.16. Giberellin yapıları (Pharis vd., (1992)'den değiştirilmiş)

1.4.4 Absisik asit

ABA, genellikle inhibitör olarak kabul görür. Bunun sebebi, tomurcuk ve tohum dormansisini koruma özelliğine sahip olmasındandır. Oksin teşvikli hücreyi inhibe eder. Stoma açıklıklarının kapanmasında (terlemenin azaltılması) anahtar rol oynar. Kökler aracılığıyla alınan su ve iyonların kontrolünü (kısmen hidrolik iletkenliği artırır) sağlar ve diğer fitohormonlarla birlikte yaprakları absisyon ve yaşlanmaya teşvik eder.



Şekil 1.17. ABA ve analoglarının yapısal formülleri (Robertson vd., (1994))

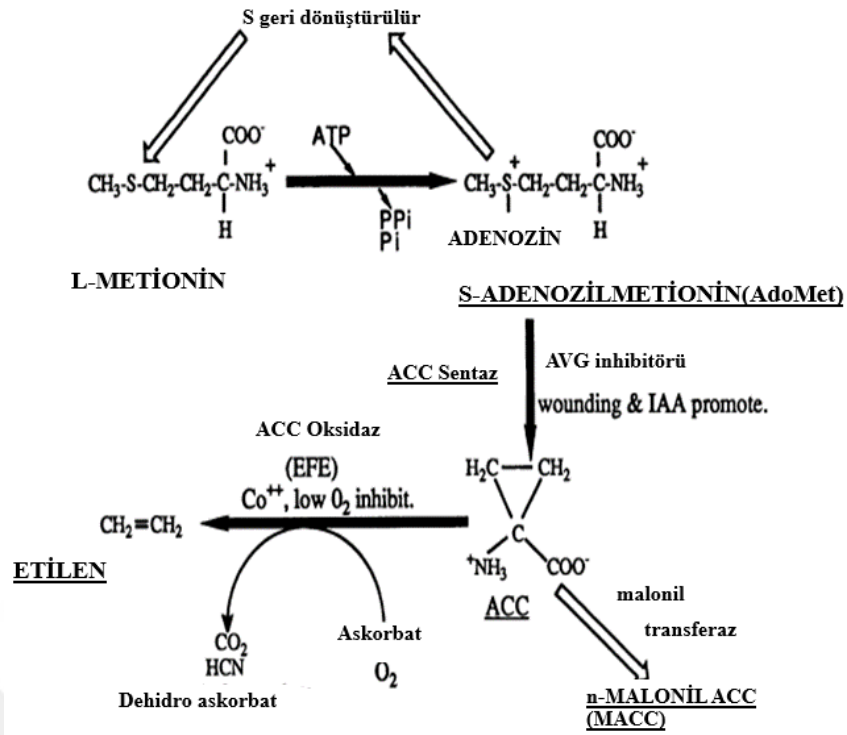
Ayrıca ABA, tohum olgunlaşmasında oldukça önemlidir. Gelişmekte olan tohumlarda depo proteinlerinin sentezlenmesini indükler. ABA, etilen ve jasmonik asit ile birlikte böceklerle karşı savunmaya yardımcı olur. Etilen ve ABA, çok çeşitli çevresel streslerde bitkilerin tepkileri ile yakından ilişkilidirler (Pospisilova, 1993; Walton vd., 1995). Bitki doku kültürlerinde ekzojen olarak uygulanan ABA, kallus gelişimini ve organ oluşumunu (kök, tomurcuk, embriyo) etkiler. Düşük konsantrasyonlarda pozitif, yüksek konsantrasyonlarda inhibe edici etkileri vardır. Bazı ABA, somatik embriyo olgunlaşmasında ve normal gelişimi için gereklidir.

Morfolojik ve biyokimyasal gelişimleri açısından zigotik embriyolarla oldukça benzerdirler (Roberts vd., 1990; Rock vd., 1995). Endojen manipülasyon veya eksojen ABA seviyeleri olgun embriyoların sıklığını artırır (Label vd., 1994). ABA, eksenel olarak yetiştirilen bitki ve hücre kültürlerinin donma toleransını artırır. ABA'nın bitki kültür dokuları üzerindeki bazı etkileri, sitokinin sentezini veya aktivitesini değiştirebileceğini düşündürmektedir. Diğer durumlarda ise IAA oksidasyonunu artırabilir. Fluridon ve norfurazon, ABA sentezini inhibe eder. Fakat buna karşın karotenoid biyosentezinin inhibitörleri olarak hareket ettikleri için etkileri ABA'ya özgü değildir (Henson, 1984; Gamble vd., 1986).

1.4.5 Etilen

Diğer fitohormonlarla birlikte kullanıldığında bu gaz; meyvelerin olgunlaşmasını, yaşlanmayı ve yaprak dökülmesini destekler. Genellikle doğal oksin ve etilen seviyeleri arasında bir denge söz konusudur. Bitkilerin oksinlere verdiği tepkilerden bazıları, oksinle muamelesine tepki olarak artan etilenden ötürü kaynaklanabilir. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise bu gaz, mikrotübül ve mikrofibril oryantasyonunu değiştirebilmektedir (Apelbaum vd., 1971; Steen vd., 1981). Alt kültürden sonraki zamanlamaya bağlı olarak etilen, in vitro kültürlerde büyümeyi ve organogenezi uyandırabilir veya inhibe edebilir (Huxter vd., 1981).

Etilen, kallus kültürleri ve süspansiyon kültürlerinde büyümeyi, kök ve gövde kısımlarında uzamaya, tomurcuk gelişimine ve embriyogenezin spesifik olarak etkilenmesine neden olabilir. Ethephon (Ethrel; 2-chloroethylphosphonic acid; 2-CEPA) doku kültürü ortamlarında pH 5.0'in altında etilen salınımı yapan bir kimyasal olarak kullanılabilir (Abeles, 1992). Sitoplazmik pH'a maruz kaldığında etilen gelişir. Kültür ortamına 5.0 'in üzerindeki pH değerlerinde ekleme yapılırsa etilen hızla dağılır. Etilen, sırasıyla S-adenosilmetionine (AdoMet) ve ardından ACC'ye dönüştürülen metioninden sentezlenir. ACC' nin bitki kültürlerine eklenmesi genellikle etilen üretimini artırır. Çünkü ACC genellikle sınırlayıcı faktördür. Metionin eklenmesi aynı etkiye sahip olabilir ve metionin bitkilerde aspartik asit, asparjin ve sisteinden üretilebildiği için bunların varlığı da benzer etkilere sahiptir. ACC sentaz ve ACC oksidaz genleri klonlandığından, mRNA antisens ve benzer teknikler kullanılarak etilen sentezini modüle etmek mümkündür (McKeon vd., 1995).



Şekil 1.18. Etilen biyosentezi. ACC (1-aminosiklopropan-1-karboxilik asit); AVG (aminoetoksivinilglisin); EFE (etilen oluşturan enzim) (McKeon vd., (1995)'den değiştirilmiş)

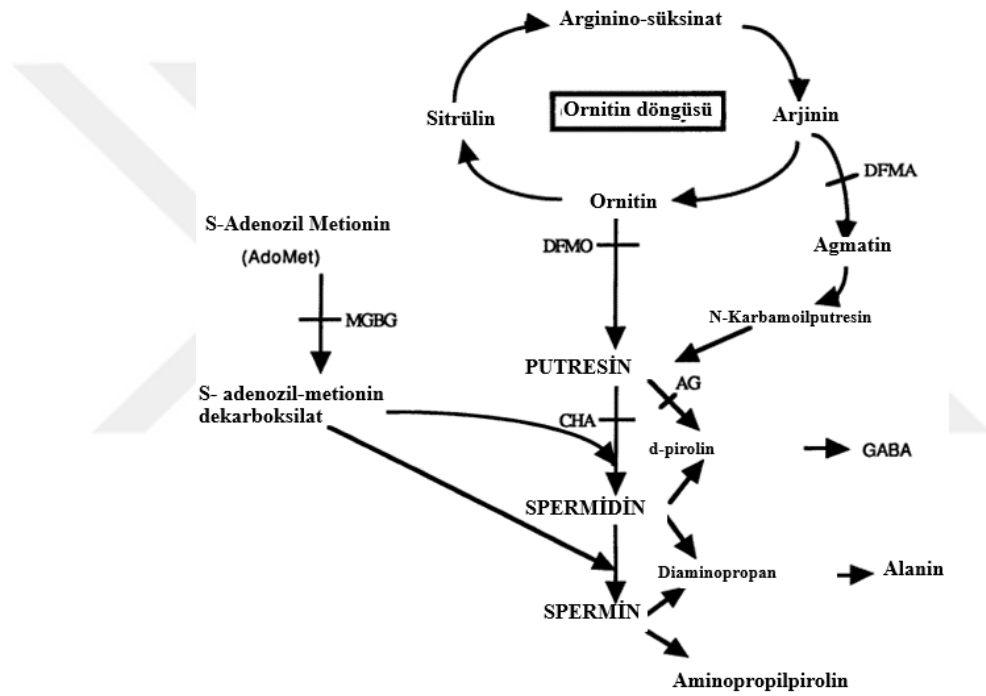
1.4.6 Poliaminler

Poliaminler (PA) hakkında diğer fitohormonlara kıyasla daha az bilgi mevcuttur. Birçok araştırmacı, bu yönüyle poliaminleri hormon olarak kabul etmemektedir. Poliaminler, bir bitkide etkiye sahip olabilmek için geleneksel bitki hormonlarından çok daha yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyarlar. Buna karşın alifatik poliaminler sınıfında yer alan putresin, spermidin ve spermin birçok kültürde morfogenezini artırdığı gösterilmiştir (Bagni vd., 1993; Gaspar vd., 1996).

Fizyolojik pH değerinde, poliaminler polikasyon ve kompleks yapıcı olarak hareket ederler. Fosfolipid grupları ve membran üzerindeki anyonik bölgelerde akışkanlığı etkiler, hücre duvarı polisakkaritlerine, DNA ve RNA'ya güçlü bir biçimde bağlanırlar.

Serbest haldeki poliaminler, iyon eksikliklerini ve bazı streslerin hücre membranlarında meydana getirdiği zararları telafi edebilirler. Poliaminlerin işlevlerinden bazıları, hücresel pH'taki dalgalanmaları en aza indirmek, enzim aktivitelerini modüle etmek,

DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu geliştirmek için tampon görevi görmektedir. Poliaminler, bazı durumlarda oksin yerine kullanılabilir. Bu, bazı kesimler tarafından ikincil haberciler olarak görülmelerine neden olmuştur. In vitro kültürlerde biyosentez inhibitörlerinin kullanılması yolu ile poliaminlerin polen olgunlaşması, kök ve sürgün oluşumu ve somatik embriyogenezle ilişkili olduğu bulunmuştur (Bagni vd., 1993; Galston vd., 1995; Gaspar vd., 1996). Poliaminlerin kendi başlarına değil, katabolik yollar ve H_2O_2 oluşumu yoluyla aktif olabileceği ileri sürülmüştür (Hausman vd., 1995). Poliaminler sinamik, kumarik, kafeik ve ferulik türevler gibi fenolik asitlerle konjuge olur (Smith,1985).



Şekil 1.19. Poliamin sentezi ve katabolik yollarının şematik gösterimi (Hausman vd., (1994)'den değiştirilmiş)

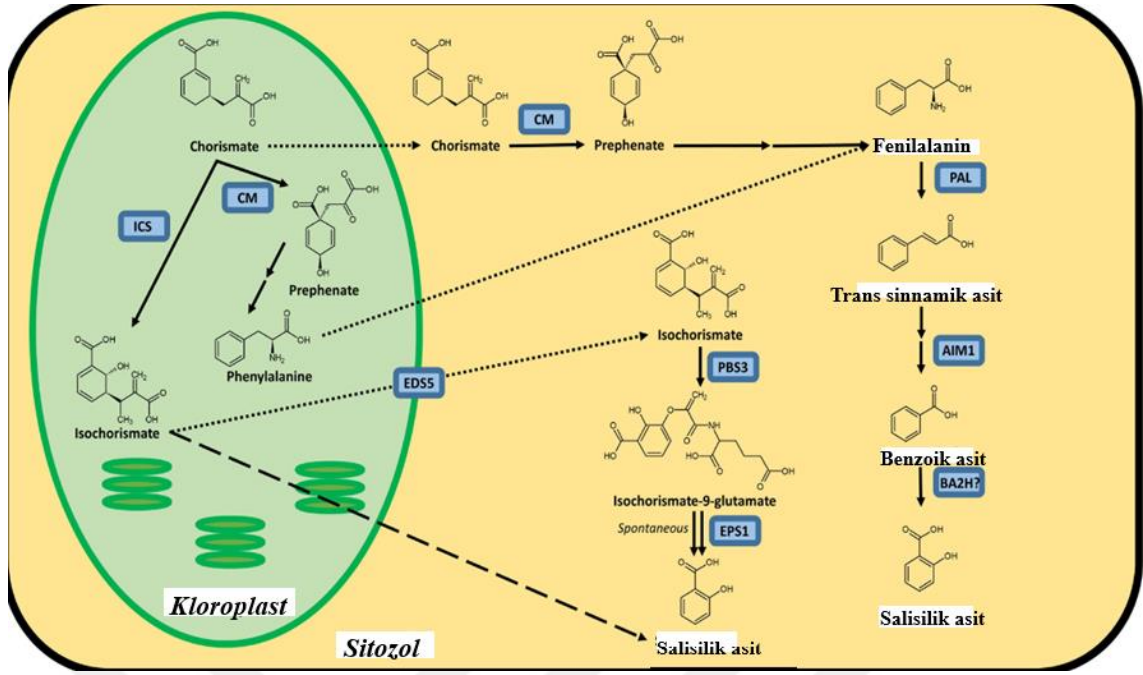
1.4.7 Salisilatlar

Salisilik asit (o-hydroxybenzoic acid) ve türevleri (Salisilik asit glikozitleri, Salisilik asit esterleri, Salisilik asit ester glikozitleri), bitki fenoliklerinin büyük bir grubuna tekabül eder ve yüksek yapılı bitkilerde bulunurlar. Salisilik asit, sinamik asitten türevlenir. Antik çağlardan beri kullanılan salisilatlar, antik çağlardan beri çeşitli ilaçlarda kullanılmaktadır. 1828 yılına gelindiğinde Münih'te ilk kez söğüt ağacının çubuğundan az miktarda salisin, salisil alkolün glikozidi izole edilmiştir. On yıl sonrasında ise

Raffaele Piria, söğüt ağacı için latince Salix kelimesinden türevli “salisilik asit” adını verdi. Sentetik salisilik asidin ilk ticari üretimi ise 1874 yılında Almanya’da başlamıştır (Raskin, 1992a; Raskin, 1992b). Aspirin, salisilik asidin bir analogu niteliğindedir. Bayer Company şirketi tarafından 1898 yılında piyasaya sürülmüş ve bununla birlikte dünya genelinde popüler olan farmasötik maddeler arasında yerini almıştır. 19. Yüzyıla gelindiğinde salisilat grubuna ait birçok bileşik izole edildi (Weissmann, 1991).

Asetilsalisilik asidin (ASA) ticari adı olan aspirin, salisilik aside kendiliğinden hidrolize uğrar. Eksojen olarak uygulandığında hızla salisilik aside dönüştürülür. Aspirinin doğal bir ürün olarak tanımlanmamasına rağmen, birçok bilim insanı tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Fenolikler, içeriğinde bir hidroksil grubu veya onun bir fonksiyonel türevini taşıyan aromatik halka yapısına sahip maddeler olarak tanımlanır. Serbest salisilik asit, kristal bir tozdur. 157-159 °C ’de erir. Sulu ortamda kısmen çözünür buna karşın polar organik çözücülerde çok çözünür. Salisilik asit aktif taşınabilir, metabolize veya konjuge edilebilir. Bitkilerde ilk uygulanan noktadan farklı dokulara yer değiştirebilir. Modern analitik tekniklerle salisilatların birçok önemli tarımsal bitki türünde bulunmaktadır. Pirinç, yengeç otu, arpa, soya fasulyesi gibi birçok bitkide salisilik asit seviyeleri yaklaşık olarak 1µg g⁻¹ olarak bulunmuştur (Raskin vd, 1990).

Salisilik asit biyosentezi ve metabolizmasında iki anahtar enzim yer alır: Benzoik asidi salisilik aside dönüştüren benzoik asit2-hidroksilaz ve UDP glukoz. Salisilik asidin dönüşümünü katalize eden glukoziltransferaz ve SA glikozit. Son verilere göre ise sinnamik asit → benzoik asit → Salisilik asit yolunun, pirinç bitkisinin fidelerinde (Silverman vd., 1995) ve tütün bitkilerinde (Yalpani vd., 1993) işlevsel olduğu gösterilmiştir.



Şekil 1.20. Bitkilerde SA için olası biyosentez yolları (Silverman vd., 1995; Duan vd., (2014)'den değiştirilmiş)

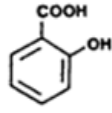
Tam çizgiler dönüşüm adımlarını, noktalı çizgiler kloroplasttan sitozole taşımayı, kesikli çizgi alternatif, bilinmeyen bir biyosentez yoludur. Kloroplastik ve sitozolik CM'ler olduğundan, fenilalanine giden adımların kloroplastta mı yoksa sitozolde mi yoksa her ikisinde de aynı anda mı gerçekleştirildiği açık değildir. Enzimler mavi renkle gösterilmiştir (Silverman vd., 1995; Duan vd., 2014).

Salisilik asit, bitkide çeşitli değişikliklere uğrayabilir. Çoğu SA'nın devre dışı kalmasına sebep olabilir. SA glukolize edildiğinde ise SA glukozit (SAG) üretilebilir. Bu bileşik vakuollerde büyük miktarlarda depolanabilirler (Dean vd., 2003).

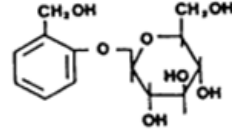
Pek çok fenolik bileşiğin bitkilerde büyüme-gelişme, fotosentez ve iyon alımı gibi birçok fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol aldığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Bitki kökleri tarafından üretilen fenolik moleküller, bitkilerde gelişim ve çimlenme için gereklidir (Lynn ve Chang, 1990). Salisilik asidin fizyolojik etkisinin ilk göstergesi ise hücre doku kültüründe çiçek ve tomurcuk oluşumunun keşfedilmesidir (Eberhard vd., 1989). Ayrıca etilen biyosentezinin etkili bir inhibitörüdür. Etkisi ise pH değerine bağlıdır. Bu etki elmada gösterilmiştir (Romani vd., 1989). Yağlı tohum bitkisi olan kolza bitkilerine salisilik asit uygulanması, yapraklarındaki glukosinolat miktarında

artışlara neden olduğu bildirilmiştir. Glukosinolatlar, turpgiller familyasındaki bitkilerde bulunan bir grup tiyoglukozittir. Doku hasarı meydana geldiğinde, glukosinolatlar hidrolize olur ve bitkinin çeşitli mikroorganizma ve zararlılara karşı katkıda bulunduğu düşünülen çeşitli ürünlerin salınımını yapar. Sekonder metabolit içeriğinde artışlar gösterilmiştir (Kiddle vd., 1994). Salisilik asit, patojenlere karşı bitki savunmasının önemli bir aracısıdır. Bu etkisine dair ilk kanıt, aspirin solüsyonunun tütün bitkisinin yapraklarına uygulanmasıyla elde edilmiştir (White, 1979). Salisilik asit uygulamalarının bitkiler üzerinde çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal etkileri gösterilmesine rağmen endojen salisilik asit uygulamalarının düzenleyici mekanizmaları henüz tam manasıyla aydınlatılamamıştır. Buna karşın şaşırtıcı bir şekilde bitkilerde salisilik asidin etkileri ile hayvanlardaki etkilerle büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Bu, bitkilerde ve hayvanlarda salisilatların terapötik etkileri arasında herhangi bir bağlantı olup olmadığı konusunu gündeme getirir (Raskin, 1992a; Raskin, 1992b).

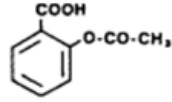
Salisilik asidin bitkilerde meydana getirdiği etkiler aynı zamanda hastalık semptomlarının azalmasıyla da doğru orantılıdır. Tüm bu sonuçlar, salisilatların gelecekte yapılacak çeşitli araştırmalar için umut verici bir alan olduğu gerçeğini karşımıza çıkarır.



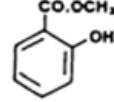
Salisilik asit (SA)



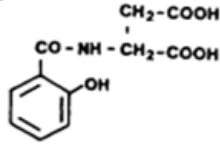
Salisil alkol- β -D-glukozit salisi



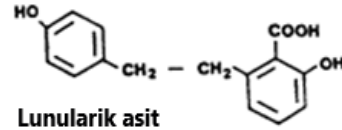
Asetil salisilik asit Aspirin (ASA)



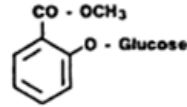
Metil salisilat
Kış yeşili yağı



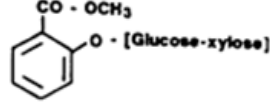
N-salisiloil aspartik asit



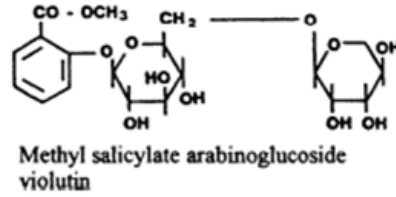
Lunularik asit



Metil salisilat-O- β -glukozit gaulterin



Monotropitosid gaulterin



Methyl salicylate arabinoglucoside
violutin

Şekil 1.21. Doğal olarak oluşan bazı salisilik asit türevleri (Raskin, 1992a; Pierpoint (1994)'den değiştirilmiş)

Salisilik asidin en tipik tepkileri şunlardır;

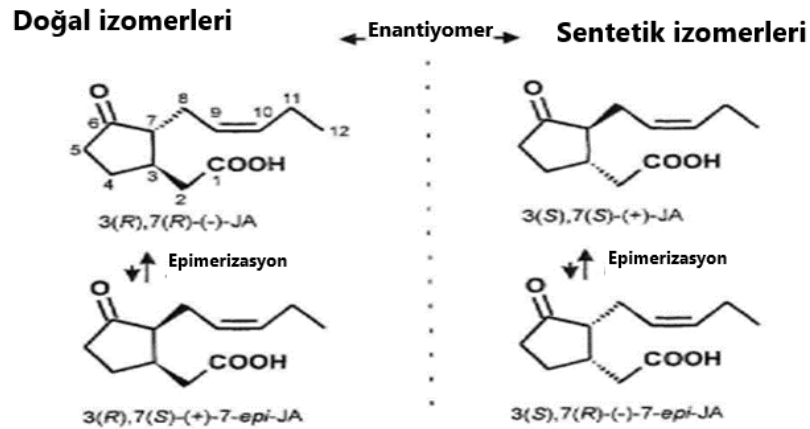
- Çiçeklenme indüksiyonu (Ancak salisilik asidin çiçeklenme düzenleyicisi olup olmadığı kesin değildir)
- In vitro tüberizasyon indüksiyonu (jasmonatlar az aktif durumda)
- Termojenezin uyarılması veya düzenlenmesi (çiçeklenme sırasındaki ısı üretimi)
- Nekrotrofik patojenlere karşı direnç ve pantogenez ile ilgili proteinlerin indükleyicisi (Chen vd., 1993).
- Çimlenme inhibisyonu

Salisilik asit, bazı ağaçların yaprak ve kabuk kısımlarından sızar, bu ağaçların gölgeliklerinin altında rejenerasyon kısıtlanır. Bu özelliği sebebiyle allelopatik etkiye sebep olabileceği düşünülmektedir. Yaralanma ve patojen saldırılarında salisilik asit, oligosakkarinler, etilen ve jasmonatların rol ve etkileşimleri hâlâ araştırmaya muhtaç bir konudur. Salisilik asidin sistemik kazanılmış direnci indüklemekten sorumlu yer değiştirmiş sinyal olmadığı, buna karşın sinyal iletim mekanizmasında salisilik asidin gerekli olduğu bilinmektedir. Ayrıca bitki savunma genleri, etilen ve metil jasmonatlar tarafından sinerjistik olarak indüklenir (Raskin, 1992a; Pierpoint, 1994).

1.4.8 Jasmonatlar

1962 yılında metil jasmonat (MeJA) ilk kez Demole ve arkadaşları tarafından *Jasminum grandiflorum* 'un uçucu yağının hoş kokulu bileşeni olarak tanımlanmıştır (Demole vd., 1962). Sentetik ve ticari olarak temin edilebilen metil jasmonat, dört stereoizomerden oluşur ve yan zincirde trans-çift bağı olan dört ek stereoizomer tarafından kontamine olabilir (Hamberg ve Gardner, 1992; Sembdner ve Parthier, 1993).

Biyosentetik yolak linoleik asit ile başlar ve lipoksinağ ile başlayan birkaç enzimin sıralı etkisiyle sentezlenir. Doğal olarak oluşan birçok jasmonat tanımlanmıştır (Sembdner ve Parthier, 1993).

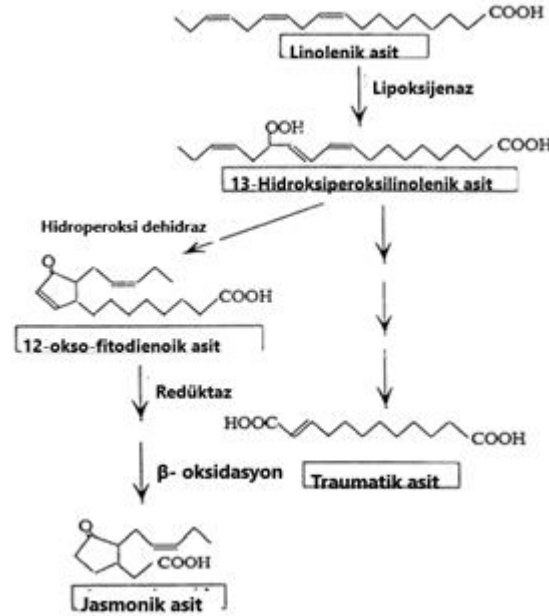


Şekil 1.22. Jasmonik asidin (JA) izomerleri (Hamberg ve Gardner, 1992; Sembdner ve Parthier, (1993)'den değiştirilmiş)

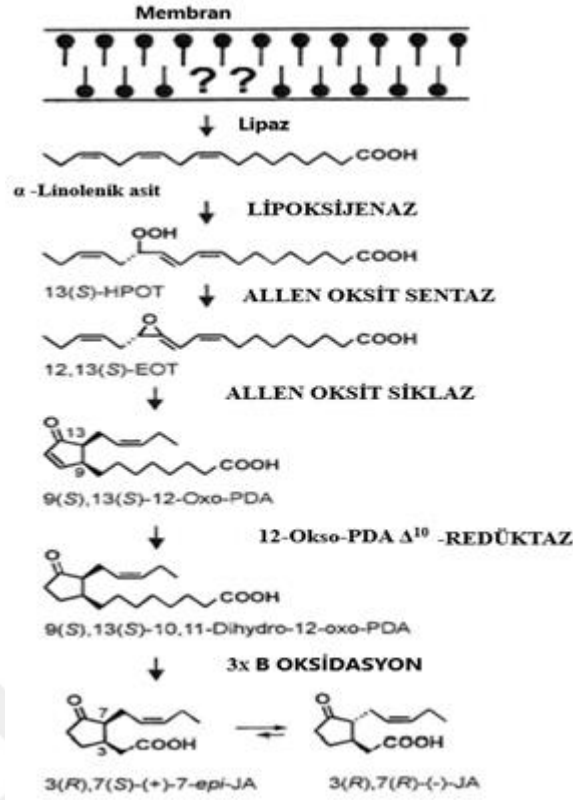
Metil jasmonat (MeJA) ve jasmonik asit oluşumları bitkiler aleminde yaygındır (Hamberg ve Gardner, 1992).

Jasmonatlar, kontrollü büyüme değişiklikleri başlatır. Yeni yaprakların oluşumu, özellikle yaralanmış bitkilerde daha fazla tüy ve daha küçük yaprak saplarına sebebiyet verir (Yan vd., 2007; Zhang ve Turner, 2008; Yoshida vd., 2009).

1978 yılında bitkilerde doymamış yağ asitlerinin oksidatif metabolizması üzerine yapılan araştırmalar, Jasmonik asidin biyosentetik yolağındaki ilk siklopentanon, cis--12-oxo-fitodienoik asit (12-oxo-PDA), a-linolenik asidin bir keten tohumu aseton tozu ekstresi ile inkübasyonları ile elde edilmiş ve Jasmonik asidin potansiyel öncüsü olarak kabul edilmiştir (Zimmerman vd., Feng, 1978). 1984 yılına gelindiğinde ise jasmonik asidin biyosentezindeki tüm ana ve ara maddeler tanımlanmıştır (Vick ve Zimmerman, 1984).



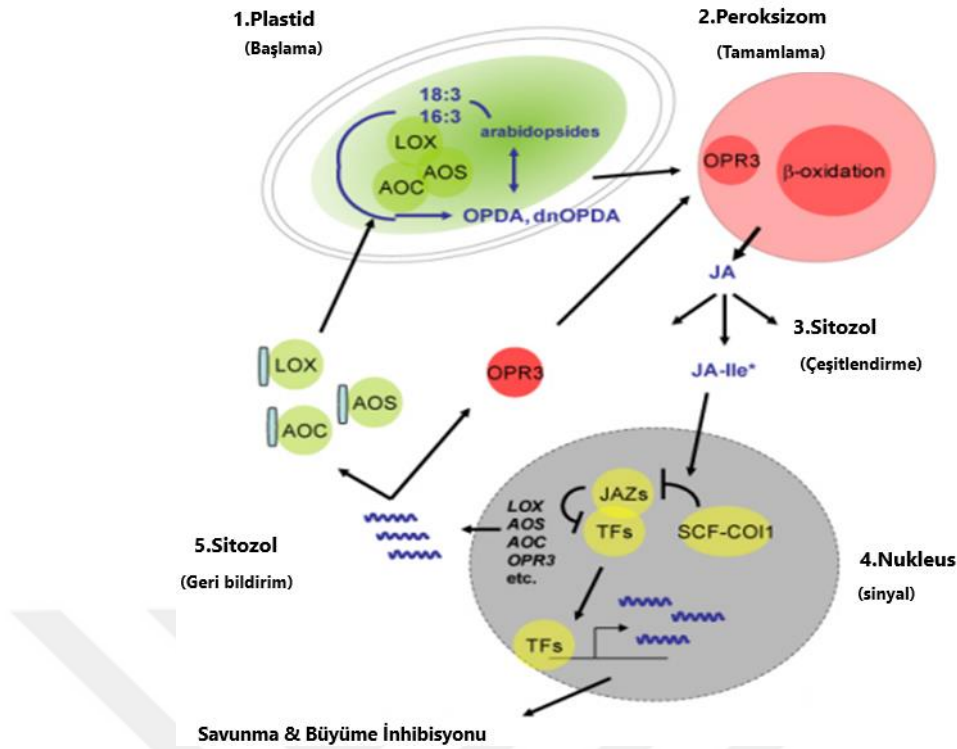
Şekil 1.23. Lineloik asitten jasmonik asit sentezi (Sembdner ve Parthier, (1993)'den değiştirilmiş)



Şekil 1.24. Jasmonik asidin biyosentezi (Vick ve Zimmerman, (1984)'den değiştirilmiş)

12-oxo-PDA ve metabolitlerinin yapısal analizi, yan zincirlerin, jasmonik asit biyosentezi boyunca sürdürülen termodinamik olarak tercih edilmeyen cis-konfigürasyonuna sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Yasemin çiçeğinin yağından izole edilen (-)- MeJA'nın mutlak stereokimyasının, yan zincirler trans konfigüre edilmiş olarak 3 (R), 7 (R) olarak bulunmuştur (Hill ve Edwards, 1965). Trans(-) MeJA'nın, C7'de metil ester oluşumu ve epimerizasyon yoluyla biyosentezlenmiş cis-(+)-7-epi-jasmonik asitten türetilmesi beklendiğinden, biyosentezlenmiş (+)-7-epi-jasmonik asit için 3(R),7(S) konfigürasyonu çıkarılmıştır (Acree vd., 1985).

Jasmonik asit sentezi ve sinyali, jasmonatların kendi sentezlerini uyardığı pozitif geri besleme döngüsü ile birbirine bağlıdır.



Şekil 1.25. Jasmonik asitte sinyal gelişimi genel bakış (Sasaki vd., (2001)’den değiştirilmiş)

Hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretiminin miktarı, bitki hücrelerinin biyotik veya abiyotik elisitörlere maruz bırakılmasıyla artırılabilir. Metil jasmonat (MeJa), mantar karbonhidratları, maya ekstraktları yaygın olarak kullanılan elisitörlerden bazılarıdır. Metil jasmonat, *Taxus chinensis* ‘den (Wu ve Lin, 2003) taxol ve panax ginseng’den (Palazon vd., 1997; Yu, 2000; Yu vd., 2002; Kim vd., 2004; Thanh vd., 2005) ginsenoside üretiminde kullanılan etkili bir elisitördür. Üretkenliği artırmak için metabolik mühendislik uygulamaları kullanılabilir.

BÖLÜM II

MATERYAL VE METOT

2.1 Bitkisel Materyaller

2.1.1 Materyallerin temini

Bitki materyali olarak Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) bitkisi kullanılmıştır. Bitki fideleri ticari firmadan satın alınmış olup kontrollü şartlar altında, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı'nda eksplantların kullanılabileceği olgunluğa gelene kadar yetiştirilmiştir. Büyüme odasındaki ışık, 16/8 saat gündüz gece fotoperiyoduna sahip, 24 ± 2 °C sıcaklık altında soğuk beyaz floresan lambalarla sağlanmıştır.



Fotoğraf 2.1. Çalışmada kullanılan eksplant kaynağı olan biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) bitkisinin genel görünümü

2.2 Metot

Araştırmada ticari olarak elde edilen nod eksplantları sterilizasyon prosedürüne uygun olarak steril edildikten sonra standart MS (Murashige & Skoog, 1962) ortamına aktarılmıştır. Elde edilen kalluslar alt kültürlemeler ile geliştirilmeye çalışılmıştır. Alt kültür aşamasına ortama çeşitli dozlarda jasmonik asit ve salisilik asit dozları ilave edilmiştir.

2.2.1 Kültüre alınan eksplantların sterilizasyonu

Besin ortamı içeren petri kaplarının sterilizasyonu birkaç basamakta gerçekleştirilmiştir. Öncelikle petri kapları 1 saatlik kirli otoklavına tabi tutulmuş, ardından ticari çamaşır suyu (NaOCI) ve deterjan içeren suda 1 gün boyunca bekletilmiştir. Sonrasında yıkanıp iyice durulanıp distile sudan (dH₂O) geçirilmiştir. Sonrasında 200 °C'de alüminyum folyoya sarılıp yaklaşık 72 saat boyunca bekletilmiş, ardından 121 °C'de ve 1.1 kg cm⁻² basınçta 20 dakika otoklavlanmıştır.

Bitki materyali olarak *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinin yaprak ve nod kısımları kullanılmıştır. Sağlıklı sürgünlerden alınan tüm eksplantlar öncelikle standart uygulamaya esas olarak antibakteriyel sabun içeren suda iyice yıkanıp sonrasında musluk suyu altında durulanmıştır. Daha sonra diğer sterilizasyon yöntemleri farklı aşamalarda gerçekleştirilmiştir. Kararma meydana gelmemesi için eksplantlar, sterilizasyon işlemi sonrasında ekim yapılınca dek distile suda bırakılmıştır.

Çizelge 2.1. *Rosmarinus officinalis* L. bitki eksplantlarına uygulanan sterilizasyon yöntemleri

STERİLİZASYON YÖNTEMLERİ				
Ön Uygulama	I	II	III	IV
Antibakteriyel sabun	-	-	10 dk	15 dk
Musluk suyu	5 dk	10 dk	15 dk	15 dk
Beyaz Sirke	-	-	%5'lik 4 dk	-
Sterilizasyon Bileşikleri				
Etil Alkol	%20'lik 5 dk	%8'lik 3 dk	%5'lik 3 dk	-
NaOCI	%10'luk 5 dk	%15'lik 5 dk	%10'luk 5 dk	%12'lik 4 dk
dH ₂ O	Standart	Standart	Standart	Standart

- Eksplantlara çeşitli sterilizasyon işlemleri uygulanmış olup, en iyi sonuca sahip olan sterilizasyon yöntemi son aşamada uygulanmıştır.
- Ön uygulama işlemindeki amaç, çeşitli doku kayıplarının engellenmesi ve bitkisel kaynaklı olarak gelişebilecek olan kontaminasyonların önüne geçmektir.
- Ön uygulama işlemi sonrası uygulanan yöntemler yukarıdaki çizelgede belirtilmiş olup, en başarılı sterilizasyon yönteminin IV numaralı sterilizasyon yöntemi olduğu kanaatine varılmıştır (Çizelge 2.1).

2.2.2 Besin ortamlarının hazırlanması

Ortamin yüzey sterilizasyonu öncelikle %10'luk ticari çamaşır suyu (NaOCl) ve ardından %70'lik etanol ile sağlanmıştır. Sonrasında kabin 2 saat boyunca UV lamba ile standardize hale getirilmiştir.

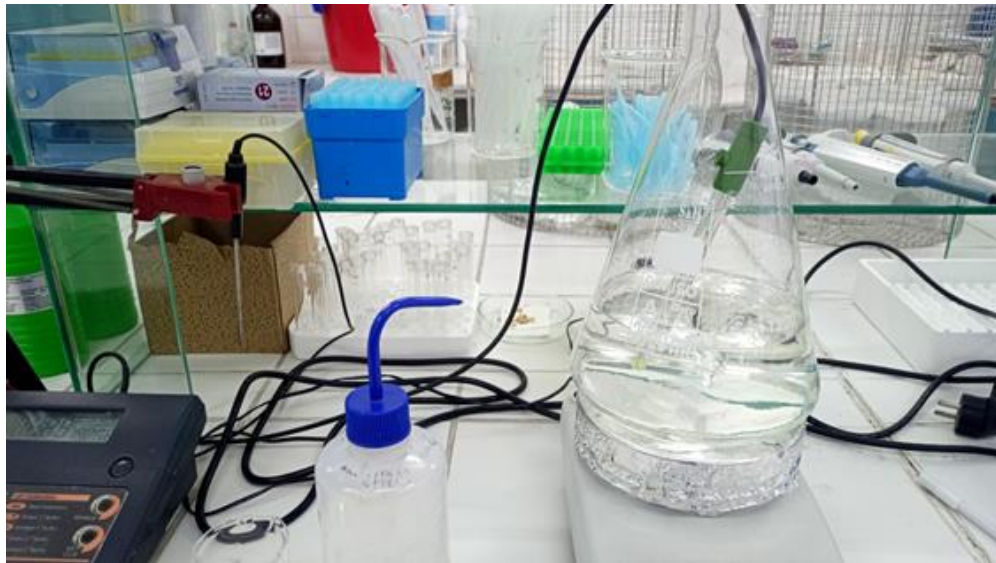
2.3 Besiyeri Hazırlığı

Çalışmada, kallus kültürü için vitaminler, bitki büyüme düzenleyicileri ve agar içeriğine sahip standart MS (Murashige and Skoog) ortamı kullanılmıştır. Besin ortamının hazırlanmasında, 1 L besin ortamı için gerekli olan miktarlar ve çeşitli büyüme düzenleyicileri 1000 ml kapasiteli erlene aktarılmıştır.



Fotoğraf 2.2. Besiyeri hazırlığı

Yapışmaması için bir miktar dH_2O eklenen erlene öncelikle 4.405 g/L vitamin içerikli MS ve 24 g/L sükroz eklendikten sonra 2,4-D ve Kinetin ilave edilmiştir. (Çizelge 2.2). Daha sonra dH_2O ile 1 litreye tamamlanmıştır.



Fotoğraf 2.3. Besin ortamı bileşenlerinin homojenizasyonu ve pH ayarlanması

Çizelge 2.2. MS (Murashige & Skoog) besin ortamı büyüme düzenleyicileri

MS BESİN ORTAMI BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİ	
OKSİNLER	
2,4-Diklorofenoksiasetik Asit	10 mg/L
SİTOKİNİNLER	
Kinetin	1.5 mg/L

İçerik çözünüp homojen hale geldikten sonra 1M NaOH ve HCl kullanılarak pH 5.8'e ayarlanmıştır. 8 g/L agar ilave edildikten sonra ağzı alüminyum folyo ile kapatılıp sterilizasyon için 121 °C'de ve 1.1 kg cm⁻² basınçta 20 dakika otoklavlanmıştır.

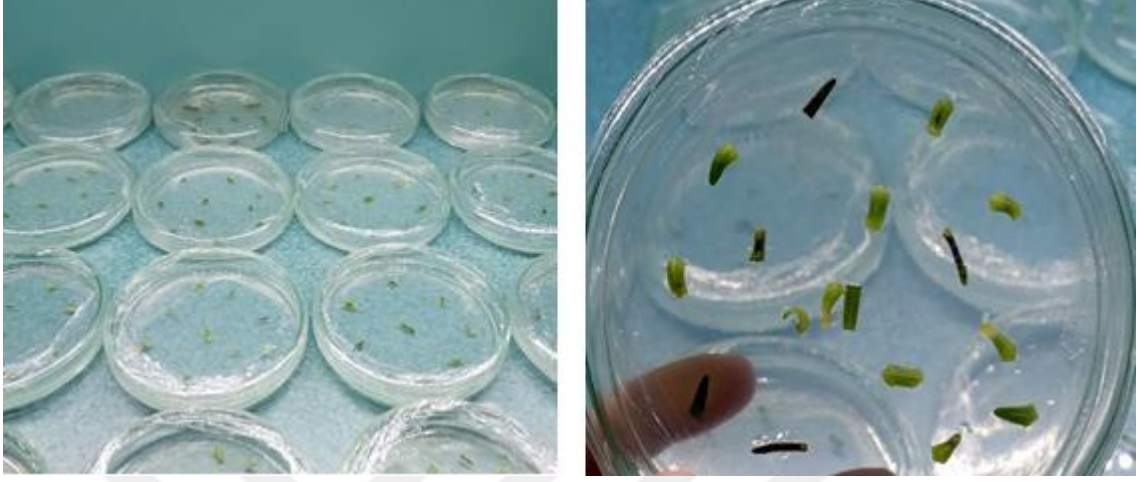
2.3.1 Eksplantların kültür ortamına alınması

Yüzeysel sterilizasyona tabii tutulan bitkisel materyaller kallus teşviki için, hazırlanan besin ortamının bulunduğu petri kaplarının her birine en az 8 adet eksplant olacak şekilde aktarımı sağlanmıştır.



Fotoğraf 2.4. Eksplantların besin ortamına aktarılması işlemi

Petri kapları, gelişimleri izlenmek üzere 4000 lux aydınlatmada 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyodunda, 24 ± 2 °C sıcaklık altında soğuk beyaz floresan lambalarla kültür koşullarında geliştirilmiştir.

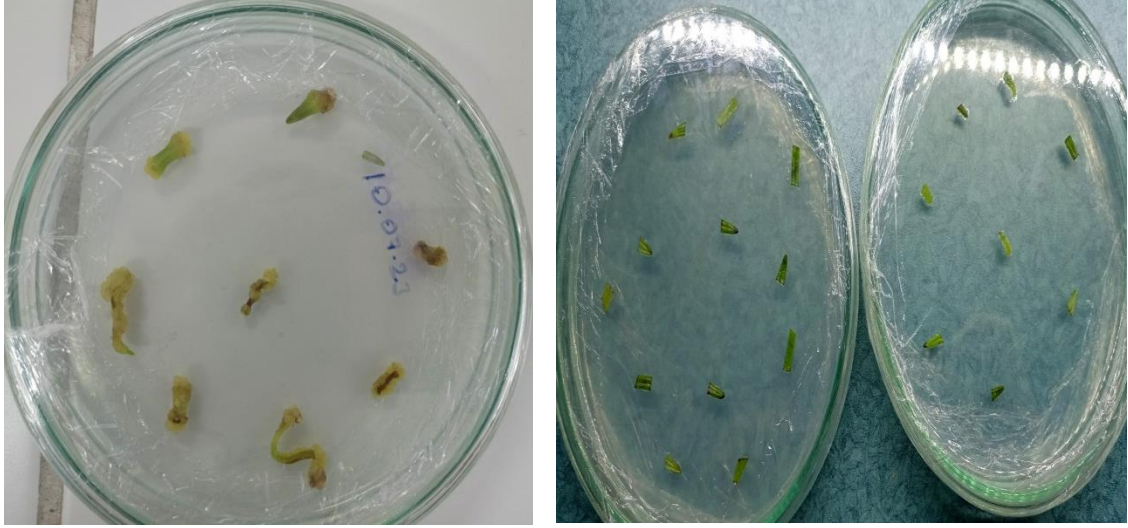


Fotoğraf 2.5. Kültür ortamına alınan eksplantlardan bir görünüm



Fotoğraf 2.6. Kültüre aktarımdan sonraki 14. güne ait görünüm

Kallusların alt kültüre aktarılabileceği düzeye gelmesi 6 haftalık bir süreye denk gelmektedir.



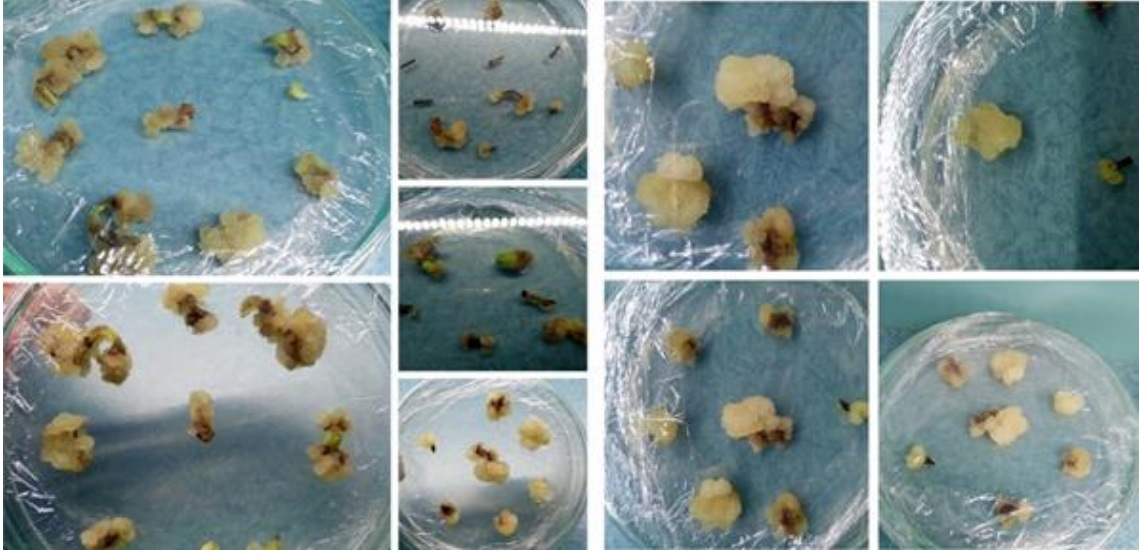
Fotoğraf 2.7. Kallus gelişimlerine ait görünüm

2.3.2 Kallusların alt kültüre alınması

Eksplantlar, 2,4-D ve kinetin içeren besi yeri ortamlarındaki 6 haftalık bir gelişme periyodunun ardından çeşitli dozlarda salisilik asit ve jasmonik asit içeren besi yeri ortamlarına aktarımı sağlanmıştır.

Çizelge 2.3. Uygulanan uyarıcılar ve dozları

ALT KÜLTÜRDE UYGULANAN UYARICILAR VE DOZLARI					
Salisilik Asit (SA)			Jasmonik Asit (JA)		
1.	Kontrol		1.	Kontrol	
2.	50 mM		2.	50 μ M	
3.	100 mM		3.	100 μ M	
4.	200 mM		4.	200 μ M	



Fotoğraf 2.8. 45 günlük (6 haftalık) süreçte gelişen kalluslar

Alt kültüre alınan kallus örnekleri 8 ile 10 günlük süreç boyunca gözlem altına alınmıştır. Bu süre dolduğunda örnekler analizler öncesinde hassas terazide ağırlık ölçümlerine tabii tutulmuştur.

2.4 Kallus İndüksiyonu

Kültürler 2 haftalık aralıklarla alt kültür edilmiştir. Kallus indüksiyon frekansı (Kif) kültür başlangıcından 6 hafta sonra aşağıdaki denklem kullanılarak Holme ve Petersen'e (1996) göre hesaplanmıştır:

$$\text{Kif} = \frac{\text{Kallus oluşturan eksplant sayısı}}{\text{Kullanılan toplam eksplant sayısı}} \times 100 \quad (2.1)$$

2.5 Rosmarinik Asit Ekstraksiyonu ve Belirlenmesi

Toz haline getirilmiş kallus örnekleri 1 g %50 etanol ile 70°C'de 1 saat süreyle ekstrakte edilmiştir. Etanolik ekstraktlar vakum buharlaştırıcı ile buharlaştırılmıştır. Örnekler %70 etanolde çözülmüş ve -20°C'de 24 saat saklanmıştır. Elde edilen çökelti ayırıştırılmış ve süpernatant rosmarinik asit analizi için kullanılmıştır. Rosmarinik asit tayini Lopez- Arnolodos vd., (1995) ve Komali ve Shetty (1998) yöntemlerine göre gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometre kullanılarak 333 nm'de absorbans ölçülmüş ve konsantrasyonlar aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$A = \epsilon bc \quad (2.2)$$

(A): 333 nm deki absorbans

(c): Rosmarinik asit konsantrasyonu

(ϵ): ekstinksiyon katsayısı $\epsilon = 19000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

(b): küvet genişliği $b = 1 \text{ cm}$

2.6 Verilerin Değerlendirilmesi

Tez çalışmasındaki tüm deneyler toplam 3 tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Tüm ölçüm ve analizlerden elde edilen veriler SPSS (Versiyon 24.0) yazılımında varyans analizi (Tukey testi) kullanılarak $P < 0.05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir. Program ortalamaların standart hata ve standart sapma değerlerini belirlemiştir.

BÖLÜM III

BULGULAR

3.1 Kallus İndüksiyonu

Salisilik asit ve jasmonik asit uygulamalarının kallus indüksiyon frekansı (Kif) üzerine etkileri çizelge 3.1’ de verilmiştir. Tüm uygulamalar karşılaştırıldığında en yüksek Kif oranı 50 mM SA uygulamasında belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Salisilik asit ve jasmonik asit uygulamalarının Kallus indüksiyon frekansı üzerine etkileri

Uygulama	Kallus indüksiyon frekansı (%)
Kontrol	74,19
50 mM SA	84,00
100 mM SA	67,86
200 mM SA	57,14
50 µM JA	77,78
100 µM JA	82,76
200 µ M JA	80,49

Uygulanan tüm JA konsantrasyonları kontrole göre Kif oranını artırmıştır. Buna karşın kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında 50 mM SA uygulaması Kif oranını artırırken diğer SA uygulamaları ise azaltmıştır.

3.2 Biberiye Kalluslarında Salisilik Asit Uygulamalarının RA Birikimi Üzerine Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit içeren besiyerinde yetiştirilen kalluslarda RA birikim miktarları çizelge 3.2 ve şekil 3. 1’ de gösterilmektedir.

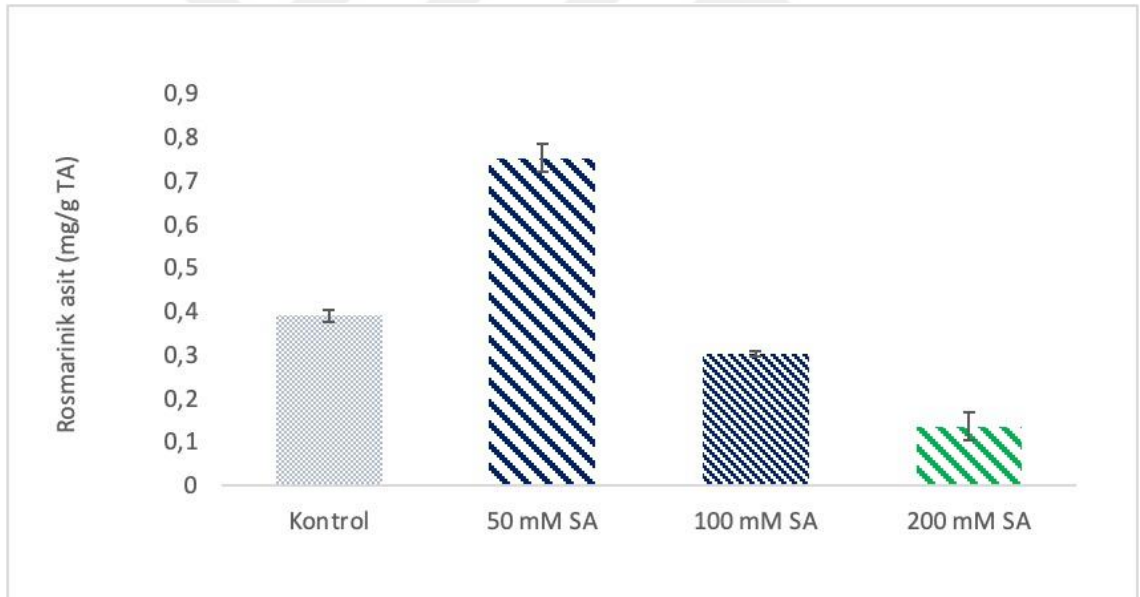
Kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında en fazla artış 50 mM SA uygulamasında belirlenmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 3.2. Biberiye kalluslarında Rosmarinik asit birikimi üzerine farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulamaları

Uygulama	Rosmarinik asit (mg/g TA)
Kontrol	0,390±0,01 xa
50 mM SA	0,753±0,31 yb
100 mM SA	0,302±0,07 xa
200 mM SA	0,135±0,32yc

(x,y kontrole göre, ab birbirlerine göre farklılığı göstermektedir. $p < 0,05$ n:3)

100 mM SA ve 200 mM SA içeren besiyerlerinde yetiştirilen biberiye kalluslarında kontrole göre rosmarinik asit birikimi azalmıştır. 100 mM SA uygulamasında belirlenen 0,302 mg/g miktarı istatistiksel olarak önemli değildir ($p < 0,05$). 200 mM SA uygulamasında belirlenen düşüş istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$).



Şekil 3.1. Biberiye kalluslarında Rosmarinik asit birikimi üzerine farklı konsantrasyonlarda salisilik asit uygulamalarının etkisi

3.3 Biberiye Kalluslarında Jasmonik Asit Uygulamalarının Rosmarinik Asit Birikimi Üzerine Etkisi

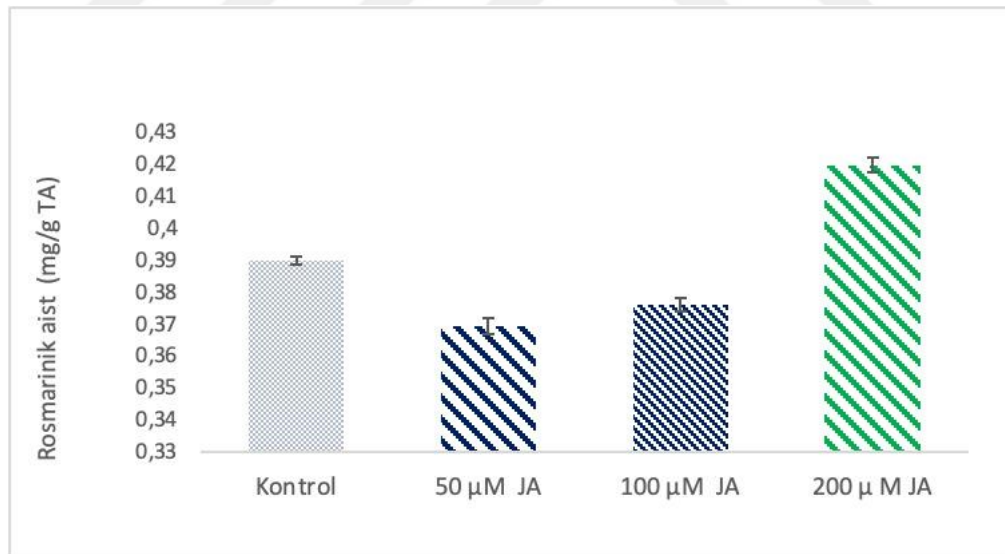
Farklı konsantrasyonlarda jasmonik asit içeren besiyerlerinde oluşturulan kalluslarda rosmarinik asit birikim miktarları çizelge 3.3 ve şekil 3.2 'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Biberiye kalluslarında RA birikimi üzerine farklı konsantrasyonlarda jasmonik asit uygulamaları

Uygulama	Rosmarinik asit (mg/g TA)
Kontrol	0,390±0,01 xa
50 µM JA	0,370±0,02 xa
100 µM JA	0,376±0,01 xa
200 µ MJA	0,420±0,02 yb

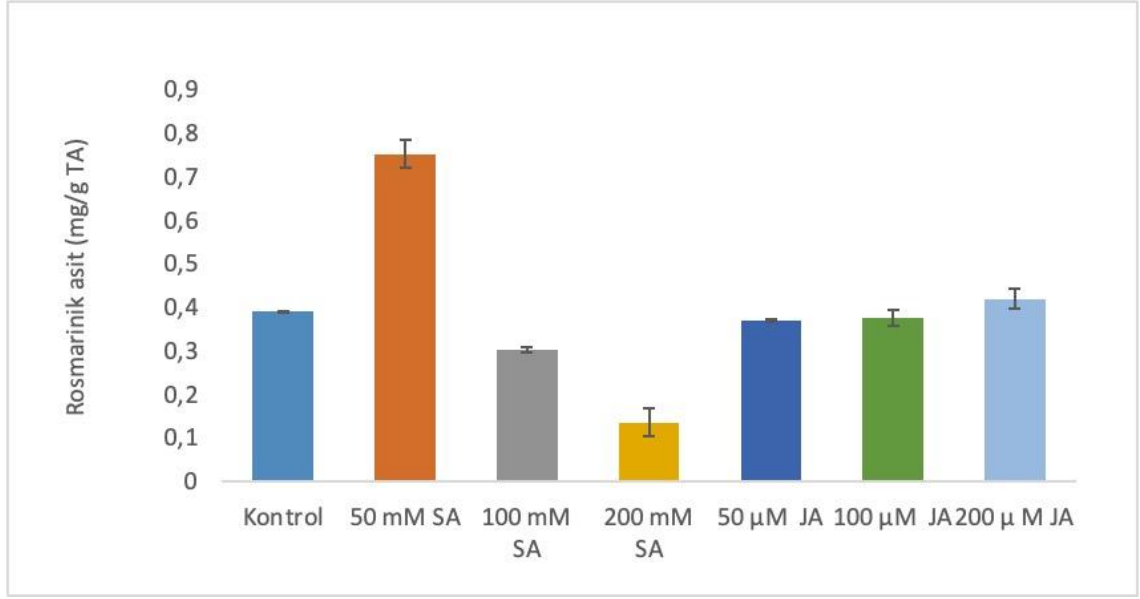
(x,y kontrole göre, ab birbirlerine göre farklılığı göstermektedir. $p<0,05$ n:3)

Genel olarak kallus örnekleri istatistiksel açıdan incelendiğinde ise kontrol grubuna göre önemli bir düşüş saptanmamıştır. En fazla artış görülen örnekler 0,420 mg/g ile 200 µM JA uygulamasında meydana gelmiştir ve RA birikimi açısından en başarılı sonuç bu konsantrasyonda elde edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 50 µM JA konsantrasyonunda ve ardından 100 µM konsantrasyonuna sahip besiyerlerinde RA miktarında azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu düşüş gösteren değerler istatistiksel açıdan önemli değildir ($p<0,05$).



Şekil 3.2. Biberiye kalluslarında Rosmarinik asit birikimi üzerine farklı konsantrasyonlarda jasmonik asit uygulamalarının etkisi

Sonuçlar topluca değerlendirildiğinde, uygulanan salisilik asit ve jasmonik asit konsantrasyonlarının biberiye kalluslarında RA birikimi üzerine olan etkisi şekil 3.3’ de verilmiştir.



Şekil 3.3. Biberiye kalluslarında rosmarinik asit birikimi üzerine farklı konsantrasyonlarda salisilik asit ve jasmonik asit uygulamalarının etkisi

Biberiye bitkisinde in vitro olarak uygulanan tüm JA ve SA konsantrasyonları karşılaştırıldığında en fazla RA miktarı 50 mM salisilik asit uygulamasında 0,753 mg/g olarak saptanmıştır.

BÖLÜM IV

TARTIŞMA VE SONUÇ

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) bitkisinde doku kültürü çalışmaları, mikroçoğaltım ve buna paralel olarak da sekonder metabolit üretimi üzerine yapılmaktadır. Çeşitli elisitörlerin varlığında yapılan çalışmalar son yıllarda ivme kazanmıştır. Mikroçoğaltım çalışmalarının sayısı ise oldukça düşüktür.

Tez çalışmasında in vitro koşullarda jasmonik asit ve salisilik asit uygulamalarının biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) bitkisinde rosmarinik asit üretimi üzerine etkileri irdelenmiştir. Bu elisitörler doğal olarak varolmakta ve bitkilerde sinyal molekülü olarak görev almaktadırlar. Salisilik asit ve jasmonik asidin *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinde rosmarinik asit üretimi üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yaptığımız çalışmada literatürde var olan sterilizasyon yöntemleri denenmiş ve birçoğunda başarı sağlanamamıştır. Dong vd., (2012), çalışmalarında biberiyenin yaprak eksplantlarını kullanmış, sterilizasyon işleminde eksplantların %85'lik kısmının ölümü ile gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda birçok kombinasyon denenmiş ve etanolün eksplant ölümleri ile ilişkili olduğu kanısına varılmıştır. Literatürlere zıt bir şekilde etanole yer verilmeyen yöntemde ölüm yüzdesi düşürülmüş ve başarı sağlanmıştır. Sonrasında besi ortamlarına 2,4-D ve kinetin ilavesi ile eksplantların gelişimi sağlanmıştır.

Dong vd., (2012), yaptıkları çalışmada, biberiyenin yaprak eksplantlarını kullanmış, sterilizasyon işlemini ise %75'lik (v/v) etanol ve %2'lik (v/v) NaOCI içerisinde bekleterek gerçekleştirmiş ve eksplantların %85'lik kısmının ölümü ile gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir. Yalnızca %2'lik (v/v) NaOCI ile gerçekleştirdikleri uygulamada ise %35' lik ölüm oranı elde etmişlerdir. Bu sonuçlara göre etanolün sterilizasyonda uygulanması sırasında *Rosmarinus officinalis* L.' in etanolde çözünen fenolik içeriklerinden ötürü eksplantların ölümüne sebebiyet verdiği ve sterilizasyon işleminde kullanımının uygun olmadığını bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada sterilizasyon prosedürümüzde de etanol kullanılan sterilizasyon yöntemlerinde eksplant

ölümleri ile karşılaşmış, daha önce de bahsedildiği gibi IV numaralı sterilizasyon yönteminde etanole yer verilmemiş, ölüm yüzdesi düşürülmüş ve başarı elde edilmiştir.

14. günden itibaren kallus farklılaşmaları görülmüş, fakat alt kültüre almak için yeterli kütleye sahip olmadığı saptanmıştır. Alt kültür için gerekli süre yaklaşık olarak 45 gün olduğu belirlenmiştir. Bu süreçte çeşitli renk değişimleri belirlenmiş bunun sebebinin bitki içerisindeki fenolik içerikler olduğu kanısına varılmıştır.

Alt kültürde salisilik asit kültür ortamına 50, 100 ve 200 mM; jasmonik asit ise 50, 100 ve 200 μ M olarak uygulanmıştır. Bu konsantrasyonlarda bekleme süresi ise 8-10 gün olarak belirlenmiştir. Salisilik asit ve jasmonik asit uygulamalarının kallus indüksiyon frekansı (Kif) üzerine etkileri çizelge 3.1' de verilmiştir. Tüm uygulamalar karşılaştırıldığında en yüksek Kif oranı 50 mM SA uygulamasında belirlenmiştir.

Salisilik asit içeren besiyerinde yetiştirilen kalluslarda RA birikim miktarları çizelge 3.2 ve şekil 3. 1' de gösterilmektedir. Kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında en fazla artış 50 mM SA uygulamasında 0,753 mg/g olarak belirlenmiştir. 100 mM SA ve 200 mM SA içeren besiyerlerinde yetiştirilen biberiye kalluslarında kontrole göre RA birikimi azalmıştır. 100 mM SA uygulamasında birikim 0,302 mg/g, 200 mM uygulamasında 0,135 mg/g olarak belirlenmiştir.

Jasmonik asit içeren besiyerlerinde oluşturulan kalluslarda ise RA birikim miktarları çizelge 3.3 ve şekil 3.2 'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda RA miktarı 0,390 mg/g olarak belirlenmiştir. Buna göre en fazla artış görülen örnekler 0,420 mg/g ile 200 μ M uygulamasında meydana gelmiştir ve RA birikimi açısından en başarılı sonuç bu konsantrasyonda elde edilmiştir. 50 μ M'de bu değer 0,370 mg/g ve 100 μ M'de ise 0,376 mg/g'dır. Salisilik asit ve jasmonik asit konsantrasyonlarının biberiye kalluslarında rosmarinik asit birikimi üzerine olan etkisi şekil 3.3' de verilmiştir.

Krzyzanowska vd., (2012) yılında yaptıkları çalışmada, *Mentha piperita*'nın hücre süspansiyon kültürlerinde jasmonik asit ve metil jasmonat olmak üzere iki elisitörün hücre büyümesi ve rosmarinik asit birikimi üzerindeki etkilerini araştırmıştır. En yüksek rosmarinik asit birikimi 100 μ M metil jasmonat ilavesinden 24 saat sonra, 117.95 mg g⁻¹ k.a. ölçülmüştür. Benzer bir konsantrasyon 200 μ M jasmonik asit uygulamasından 48 saat sonra 110.12 mg g⁻¹ k.a olarak tespit edilmiştir. Bu değerler,

elisitasyon uygulanmayan kontrol örneğine kıyasla yaklaşık 1,5 kat daha yüksektir. Yaptığımız çalışmada salisilik asit uygulamaları daha başarılı bulunmuştur. 50 mM salisilik asit uygulamasında kontrole göre yaklaşık % 93 artış sağlanmıştır (Çizelge 3.1). Coskun vd., (2019) yaptıkları çalışmada farklı melatonin (MEL) konsantrasyonları (0, 100 ve 200 μ M) kullanılarak MS besi ortamı içerisinde biberiye bitkisinde fenolik bileşiklerin birikimi ve aromatik içeriğindeki değişimleri karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Rosmarinik asit, kafeik asit, hesperidin gibi fenolik bileşikler ve 45 aromatik bileşik biberiye yaprağı kallusundan tanımlanmış ve sırasıyla HPLC ve GC/MS ile ölçümleri yapılmıştır. 200 μ M MEL, biberiye kallusunun aromatik içeriğini değiştirmede 100 μ M MEL'den daha etkili olduğu, ayrıca linalool, stiren ve methional gibi bazı önemli aromatik bileşikler sadece MEL uygulanmış kalluslarda tespit edilmiş ve kontrol grubunda görülmemiştir. Bizim yaptığımız çalışmada da çeşitli konsantrasyonlarda JA (50, 100 ve 200 μ M) ve SA (50, 100 ve 200 mM) elisitörleri uygulanmış ve biberiye bitkisinde in vitro olarak uygulanan tüm JA ve SA konsantrasyonları karşılaştırıldığında en fazla RA miktarı 50 mM salisilik asit uygulamasında 0,753 mg/g olarak saptanmıştır.

Caruso vd., (2000) yaptıkları çalışmada *Rosmarinus officinalis* L.'nin yaprak ve nodal segmentlerinden elde edilen köklü rejenere sürgünler, 9 hafta boyunca bazal bir besi ortamında yetiştirilmiştir. Rejenerantların antioksidan ve tıbbi özelliklere sahip olan karsonik asit içeriğine sahip olduğu HPLC ve kütle spektrometrisi ile gösterilmiştir. Çalışmada beş haftalık nodüler kallusun içeriğinde karsonik aside rastlanırken karanlık ortamda tutulan ve yeşil olmayan kallusta içeriğe rastlanmamıştır. Tez çalışmasında başlangıç aşamasında 6 haftalık bir süreç içerisinde besi ortamında geliştirilmiş ardından alt kültürde çeşitli SA ve JA konsantrasyonları içeren besiyerlerinde 8-10 günlük süreçte geliştirilmiştir. Bu süreçte uygulanan tüm JA konsantrasyonları kontrole göre Kif oranını artırmıştır. Buna karşın kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında 50 mM SA uygulaması Kif oranını artırırken diğer SA uygulamaları ise azaltmıştır.

Al-Saeedi vd., (2022) 'nın yaptıkları çalışmada *Rosmarinus officinalis* L.'nin kallus kültürlerinde çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin ve ışık koşullarının in vitro çevresel etkileri incelenmiştir. Çalışmada oksin ve sitokinin konsantrasyonlarının aydınlık ve karanlık koşullarda etkileri karşılaştırılmıştır. Eksplantlar etanol solüsyonu ve sodyum hipoklorat ile sterilize edilmiştir. MS ortamına farklı konsantrasyonlarda

bitki büyüme düzenleyicisi eklenmiş, 25 °C sıcaklıkta ışık altında geliştirilmiştir. 1,0 mg/L 2,4-D ile 0,5 mg/L BA ve ışık, en iyi kombinasyon olduğu sonucuna varılmış ve en büyük kallus ağırlığı 3,75 gm olarak belirlenmiştir. Karanlık ortam verileri ise 1,0 mg/L NAA ve 0,5 mg/L BA olduğu, en büyük kallus ağırlığı 3.60 gm olduğu sonucuna varılmıştır. İki hafta sonrasında en yüksek kallus verimi aynı kombinasyonlarda karanlıkta %100 ve ışıktaki %95 olarak belirlenmiştir. Kallusların doku, renk ve şekil olarak kombinasyonu ise değişmiştir. Bizim çalışmamızda ise 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık ışık periyotları kullanılmıştır. Sterilizasyon sırasında etanolün uygulanması sırasında *Rosmarinus officinalis* L.' in etanolde çözünen fenolik içeriklerinden ötürü eksplantların ölümüne sebebiyet verdiği saptanmıştır ve bu bağlamda sterilizasyon işleminde kullanımının uygun olmadığı kanaatine varılmıştır.

Mascarello vd., (2015)'nin *Rosmarinus officinalis* L.'nin hücre biyokütlesi gelişimi için mikro çoğaltımı ve kallus indüksiyonu üzerine çalışılmıştır. Çalışmada kallus indüksiyonunu teşvik eden faktörler araştırılmıştır. IAA varlığında yüksek köklenme oranı elde edilmesine karşın (0,5 mg/L' de %75 ve 1 mg/L'de %78,6), büyüme düzenleyici olmayan ortamda köklenme yüzdesi %50 olarak saptanmıştır. En yüksek aklimatizasyon oranı 1 mg/L IAA' da % 65 olarak elde sera koşullarında elde edilmiştir. Açık alan ve serada yetiştirilen bitki tepe ve boğum kısımları dezenfeksiyon sonrası yüksek ölüm yüzdesi göstermiştir. Kallus stok bitkilerden yaprak eksplantlarından oluşturulmuştur. İki aylık kültür süreci sonunda kallus gözlenmiş, biyokütle ise aynı ortam üzerinde 4 haftalık alt kültürler yoluyla artmıştır. Bizim çalışmamızda ise çeşitli JA ve SA konsantrasyonları ve kontrol grubuna ait kallus indüksiyon frekansları incelenmiştir. Kontrol grubunun kif oranı %74,19 iken en yüksek kif oranı %84 ile 50 mM SA grubunda saptanmış bu değerleri sırasıyla %82,76 ile 100 µM JA, %80,49 ile 200 µM JA ve %77,78 ile 50 µM JA takip etmiştir. Buna karşın kontrol grubuna göre kif oranı %57,14 ile 200 mM SA ve %67,86 ile 100 mM SA konsantrasyonlarında düşüşe sebep olmuştur.

Misra, (2002), yaptığı çalışmada sürgün ucu proliferasyonu ile bağlantılı olacak şekilde *Rosmarinus officinalis* L. 'de oluşan kallus izole edilmiş ve en iyi gelişim için farklı işlemlere tabi tutulmuştur. MS ve SH ortamlarında 0,25 mg BAP ve IAA ile desteklenmiş modifikasyonlar ve 2,4-D kullanılmıştır. MS ortamındaki örnek kompakt halde ve 30 gün boyunca taze ve yeşil halde kalmıştır. SH ortamında ise kallus gelişimi

daha hızlı olmuş ancak 15 gün içinde kahverengiye dönmüştür. NH ve NO ile kallusun 21 gün boyunca taze ağırlığının 15 katı kadar büyüdüğü ve 45 günlük inkübasyona kadar taze kalmıştır. Bu somatik kallusta sürgün tomurcukları, her birine 0,5 mg BAP, 2- izopentenil adenin, IAA ve 10 mg giberellik asit (GA₃) ilavesiyle farklılaşmıştır. Histolojik olarak incelendiğinde sürgün tomurcuklarının periferik ve bazal farklılaşmaları ortaya çıkarılmıştır. Farklılaşan sürgünler çoğalmış, köklenmiş ve toprağa nakledilmiştir. Bizim çalışmamızda birincil besiyerinde 10 mg/L 2,4-D ve 1,5 mg/L kinetin ilave edilmiştir. Bu süre zarfında bitkinin fenolik içeriğinden ötürü kahverengimsi renk dönüşümleri gözlemlenmiştir. 14. günde kallus oluşumları gözle görülebilir derecede farklılaşmaya başlamıştır. Kallusların alt kültüre aktarılabilmesi ise 6 haftalık bir süreye denk gelmektedir. Bu süre zarfında kütle artışları devam etmiştir. Alt kültürde ise 8-10 gün bekletildikten sonra çalışmamızın planlaması gereği tekrar alt kültüre alınmaksızın analiz aşamasına geçilmiştir.

Yang vd., (1997), *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinde yüksek miktarda RA içeren klonal hatların seleksiyonu için bitki doku kültürü teknikleri ve mikrobiyal elisitör olarak da *Pseudomonas* sp. F. suşunu kullanarak bir çalışmaya imza atmışlardır. Heterozigot *Rosmarinus officinalis* L. tohumlarından in vitro koşullarda çimlenen örneklerden alınan eksplantlar 1 mg/L benziladenin ve 2 mM prolin katkılı MS ortamına aktarılmıştır. Elde edilen sürgünlerdeki sekonder metabolit üretimini artırmak için *Pseudomonas* sp. F. suşu ile inoküle etmişlerdir. Mikrobiyal elisitörün teşvik ettiği yüksek RA içeren hatlar seçilmiştir. Bu sayede genetik olarak uniform fenotiplerin seleksiyonu *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinde sabit kalitede fenolik antioksidan üretimini sağlayabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca çeşitli biyosentetik yolların regülasyonunu anlamak açısından kullanılabileceği belirtilmiştir. Yaptığımız bu çalışma ile, yaygın olarak çalışılan sinyal molekülleri olan jasmonik asit ve salisilik asit uygulamalarının bitkilerde önemli metabolitlerin birikimlerine etkilerinin incelenmesi açısından yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuçlar topluca değerlendirildiğinde biberiye bitkisinde in vitro olarak uygulanan tüm JA ve SA konsantrasyonları karşılaştırıldığında en fazla RA miktarı 50 mM salisilik asit uygulamasında 0,753 mg/g olarak saptanmıştır. Tez çalışmasında belirlenen RA miktarı bitkinin doğal ortamında elde edilen verilere göre oldukça düşüktür. Ancak

konsantrasyon, uygulama yöntemi, uygulama süresi ve hücre süspansiyon kültürü gibi uygulanan tekniklerin değiştirilmesi ile daha başarılı sonuçlar elde edilebilir.

Ülkemizde doku kültürü çalışmaları son zamanlarda ivme kazanmış olsa da henüz yeterli seviyeye ulaşmış değildir. Bu açıdan yapılacak olan her çalışma önem arz etmektedir. Özellikle tıbbi ve aromatik bitkilerin bitki doku kültürü çalışmalarında yapılacak olan her türlü çalışma, ülkemizin zengin bitki örtüsü de göz önüne alındığında ulusal açıdan da önem arz etmektedir. Bu açıdan bakıldığında yaptığımız çalışmanın gelecekte yapılacak olan çalışmalara kaynak oluşturabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, doku kültürü teknikleri ile salisilik asit ve jasmonik asit kullanılarak bitki hücrelerinde sinyal yollarının araştırılması ve bu elisitörlerin sekonder metabolit içeriklerine etkilerinin araştırılması açısından faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

Abeles, F. B., Morgan, P.W. ve Saltveit, M.E., "Fruit ripening, abscission, and postharvest disorders." *Ethylene in plant biology*, 182-221, 1992.

Acree, T.E., Nishida, R. ve Fukami, H., "Odor thresholds of the stereoisomers of methyl jasmonate." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33.3 ,425-427, 1985.

Addicott, F. T., *Abscission*. 369 pp ,1982.

Adel, A. M., Abd El-Wahab, Z. H., Ibrahim, A. A. ve Al-Shemy, M. T., "Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part II: Physicochemical properties." *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 676-687, 2011.

Aguilar, F., Autrup, H., Barlow, S., Castle, L., Crebelli, R. ve Gott, R., "Use of rosemary extracts as a food additive-Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food." *EFSA J* 721,1-29 2008.

Al-Saeedi, A.A.R. ve Al-Rekaby, L.S., "Environmental Influence of growth regulators and light condition on some callus traits of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in vitro." *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Vol. 1029. No. 1. IOP Publishing, 2022.

Aloni, Roni., "The induction of vascular tissues by auxin." Plant hormones. *Springer*, Dordrecht, 485-518, 2010.

Altpeter, F., Springer, N.M., Bartley, L.A. ve Brutnell, T.P., "Advancing crop transformation in the era of genome editing." *The Plant Cell* 28.7,1510-1520, 2010.

Al-Sereiti, M. R., K. M. Abu-Amer. ve P, Sena., "Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials." ,1999.

Amaral Franco, J. ve M. L. Rocha Alonso., "Rosmarinus L." ***Flora Europaea Cambridge University Press, Cambridge*** 187, 1973.

Amelio, F. S., "Botanicals: A phytocosmetic desk reference." ***CRC Press, Boca Raton, Florida*** 1,1-35, 1999.

Apelbaum, A. ve Burg., S.P., "Altered cell microfibrillar orientation in ethylene-treated *Pisum sativum* stems." ***Plant Physiology*** 48.5, 648, 1971.

Bagni, N., Altamura, M.M., Biondi, S., Mengoli, M. ve Torrigiani, P., "Polyamines and morphogenesis in normal and transgenic plant cultures." ***Morphogenesis in plants.*** Springer, Boston, MA, 89-111, 1993.

Bai, N., He, K., Roller, M., Shu Lai, C., Shao, Xi., Pan., M.H. ve Tang Ho, C., "Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*." ***Journal of agricultural and food chemistry*** 58.9, 5363-5367, 2010.

Baker, J.T., Borris, R.P., Carté, B., Cragg, G.M., Gupta, M.P., Iwu, M.M. ve Tyler, V.E., "Natural product drug discovery and development: new perspectives on international collaboration." ***Journal of natural products*** 58.9, 1325-1357, 1995.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. ve Idaomar, M., "Biological effects of essential oils—a review." ***Food and chemical toxicology*** 46.2, 446-475, 2008.

Balandrin, M. F. ve J. A. Klocke. "Medicinal, aromatic, and industrial materials from plants." ***Medicinal and aromatic plants I.*** Springer, Berlin, Heidelberg, 3-36, 1988.

Bampidis, V. A., Christodoulou, V., Christaki, E. ve Florou-Paneri, P., "Effect of dietary garlic bulb and garlic husk supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs." ***Animal feed science and technology*** 121.3-4, 273-283, 2005.

Bandurski, R.S., Cohen, J.D., Slovin, J.P. ve Reinecke, D.M., "Auxin biosynthesis and metabolism." ***Plant hormones.*** Springer, Dordrecht, 39-65, 1995.

Baque, Md., Moh, S.H., Lee, E.J., Zhong, J.J. ve Paek, K.Y., "Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor." **Biotechnology Advances** 30.6,1255-1267, 2012.

Baratta, M.T., Damien Dorman, H.J., Deans, S.G., Biondi, D.M. ve Ruberto, G., "Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils." **Journal of Essential Oil Research** 10.6,618-627, 1998.

Basmacıoğlu Malayoğlu, H., "Biberiyenin (Rosmarinus officinalis L.) antioksidan etkisi." **Hayvansal Üretim** 51.2, 2010.

Baytop, T., "Türkiye’de bitkiler ile tedavi:(geçmişte ve bugün)." **Vol. 40**. İstanbul Üniversitesi, 1984.

Bayrak, A. ve A. Akgül., "Biberiye bitkisinin uçucu yağ kompozisyonu üzerinde araştırma." **Gıda Sanayi Dergisi** 5 ,20-22, 1989.

Beale, M.H. ve Sponsel, V.M., "Future directions in plant hormone research." **Journal of Plant Growth Regulation** 12.4,227-235, 1993.

Begum, A., Sandhya, S., Ath Ali., S.S., Vinod., K.R., Reddy, S. ve Banji, D., "An in-depth review on the medicinal flora Rosmarinus officinalis (Lamiaceae)." **Acta scientiarum polonorum Technologia alimentaria** 12.1,61-74, 2013.

Benincá, J.P., Dalmarco, J.B., Pizzolatti, M.G. ve Fröde, T.S., "Analysis of the anti-inflammatory properties of Rosmarinus officinalis L. in mice." **Food chemistry** 124.2,468-475, 2011.

Berdy, J., "Bioactive microbial metabolites." **The Journal of antibiotics** 58.1 ,1-26, 2005.

Bernáth, J. ve Fuleky, G., "Aromatic plants." **Cultivated plants, primarily as food sources** 2 ,329-352, 2009.

Bhojwani, S.S. ve Razdan, M.K., "Plant tissue culture: theory and practice." *Elsevier*, 1986.

Botsoglou, N.A., Taitzoglou, I.A., Botsoglou, E., Zervos, I., Kokoli, A., Christaki, E. ve Nikolaidis, E., "Effect of long- term dietary administration of oregano and rosemary on the antioxidant status of rat serum, liver, kidney and heart after carbon tetrachloride-induced oxidative stress." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89.8,1397-1406, 2009.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I. ve Jovin, E., "Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils." *Journal of agricultural and food chemistry* 55.19,7879-7885, 2007.

Bracco, U., Löliger, J. ve Viret, J-L., "Production and use of natural antioxidants." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 58.6, 686-690, 1981.

Brenes, A. ve Roura, E., "Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action." *Animal feed science and technology* 158.1-2, 1-14, 2010.

Cardoso, B.S. ve Santana Amaral, V.C., "O uso da fitoterapia durante a gestação: um panorama global." *Ciência & Saúde Coletiva* 24,1439-1450, 2019.

Caruso, J. L., Callahan, J., DeChant, C., Jayasimhulu, K. ve Winget, G.D., "Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of *Rosmarinus officinalis*." *Plant cell reports* 19.5, 500-503, 2000.

Ceylan, A., "Tıbbi bitkiler II." *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları* 481, 1-22, 1987.

Chandler, S.F. ve Thorpe, T.A., "Variation from plant tissue cultures: biotechnological application to improving salinity tolerance." *Biotechnology advances* 4.1,117-135, 1986.

Chaprin, N. ve B. E. Ellis., "Microspectrophotometric evaluation of rosmarinic acid accumulation in single cultured plant cells." *Canadian journal of botany* 62.11,2278-2282, 1984.

Chen, Z., Silva, H. ve Klessig, D.F., "Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid." *Science* 262.5141,1883-1886, 1993.

Chun, S. S., Vattem, D. A., Lin, Y. T. ve Shetty, K., "Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*." *Process Biochemistry*, 40(2), 809-816, 2005.

Collin, H.A., "Secondary product formation in plant tissue cultures." *Plant growth regulation* 34.1,119-134, 2001.

Cordell, G.A., "The alkaloids: chemistry and biology." *Academic Press*, 2008.

Coskun, Y., Duran, R.E. ve Kilic, S., "Striking effects of melatonin on secondary metabolites produced by callus culture of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 138.1, 89-95, 2019.

Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou, E. ve Harvala, C., "Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity." *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 17.2,194-195, 2003.

Cowan, M.M., "Plant products as antimicrobial agents." *Clinical microbiology reviews* 12.4 ,564-582, 1999.

Cross, B. E., Galt, R. H. B., Hanson, J. R., Curtis, P. J., Grove, J. F. ve Morrison, A., "545. New metabolites of *Gibberella fujikuroi*. Part II. The isolation of fourteen new metabolites." *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 2937-2943, 1963.

Croteau, R., Kutchan, T.M. ve Lewis, N.G., "Natural products (secondary metabolites)." *Biochemistry and molecular biology of plants* 24,1250-1319, 2000.

Dagla, H. R., "Plant tissue culture." **Resonance** 17.8,759-767, 2012.

Davies, P. J., "Plant Hormones Dordrecht." **The Netherlands: Kluwer**,1995.

Dean, John V., Shah, R.P. ve Mohammed, L.A., "Formation and vacuolar localization of salicylic acid glucose conjugates in soybean cell suspension cultures." **Physiologia Plantarum** 118.3,328-336, 2003.

Debnath, M., Malik, C.P. ve Bisen, P.S., "Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines." **Current pharmaceutical biotechnology** 7.1,33-49, 2006.

Del Baño, M.J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Marin, M.P., Del Rio, J.A., Ortuño A. ve Ibarra, I., "Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a biosynthetic pathway." **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 52.16,4987-4992, 2004.

Demain, A.L., "Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms." **Applied microbiology and biotechnology** 52.4,455-463, 1999.

Demain, A.L. ve Fang, A., "The natural functions of secondary metabolites." **History of modern biotechnology I** ,1-39, 2000.

Demole, E., Lederer, E. ve Mercier, D., "Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin." **Helvetica Chimica Acta**, 45.2,675-685, 1962.

Dong, Y., Li, Z., Qi, C., Liu, B., Duan, R. ve Liu, Y., "Callus induction and plant regenerated from rosemary leaves." **Bioscience Methods**, Vol.3, No.3, 21-26, <http://bm.sophiapublisher.com>.

Doughari, J.H., "Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents." **Rijeka, Croatia: INTECH Open Access Publisher**, 2012.

Dörrie, J., Sapala, K. ve Zunino, S.J., "Carnosol-induced apoptosis and downregulation of Bcl-2 in B-lineage leukemia cells." **Cancer letters** 170.1,33-39, 2001.

Duan, L., Liu, H., Li, X., Xiao, J. ve Wang, S., "Multiple phytohormones and phytoalexins are involved in disease resistance to *Magnaporthe oryzae* invaded from roots in rice." **Physiologia plantarum** 152.3,486-500, 2014.

Duthie, G.G. ve M. Brown, K., "Reducing the risk of cardiovascular disease." **Functional foods**. Springer, Boston, MA,19-38, 1994.

Eberhard, S., Doubrava, N., Marfa, V., Mohnen, D., Southwick, A. ve Darvill, A., "Pectic cell wall fragments regulate tobacco thin-cell-layer explant morphogenesis." **The Plant Cell**,1.8,747-755, 1989.

Efferth, T., "Biotechnology applications of plant callus cultures." **Engineering** 5.1,50-59, 2019.

Eibl, R., Meier, P., Stutz,I., Schildberger, D., Hühn, T. ve Eibl, D., "Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends." **Applied microbiology and biotechnology** 102.20,8661-8675, 2018.

Elgayyar, M., Draughon, F.A., Golden, D.A ve Mount, J.R., "Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms." **Journal of food protection** 64.7,1019-1024, 2001.

Ellis, B.E. ve Towers, G.H.N., "Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*." **Biochemical journal** 118.2, 291-297, 1970.

Elvin-Lewis, M. Lewis, W.H., "New concepts and medical and dental ethnobotany." **Dioscorides Press**: Portland, OR, USA, 1995.

Evans, D.A., Sharp, W.R. ve Flick, C.E., "Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis." 1981.

Evans, D. A., Sharp, W. R. ve Flick, C. E. "Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis." In: Thorpe, T. A., "Plant cell culture: methods and applications in agriculture." **New York: Academic Press**; 45-113 ,1981

Evans, W.C., "Trease and Evans' pharmacognosy." **Elsevier Health Sciences**, 2009.

Fabijan, D., Taylor, J.S. ve Reid, D.M., "Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings: II. Action of gibberellins, cytokinins, auxins and ethylene." **Physiologia Plantarum** 53.4 ,589-597, 1981.

Francolino, R., Martino, M., Caputo, L., Amato, G., Chianese, G., Gargiulo, E., Feo, V.D., "Phytochemical Constituents and Biological Activity of Wild and Cultivated *Rosmarinus officinalis* Hydroalcoholic Extracts." **Antioxidants** 12(8), 1633, 2023.

Fry, S.C. ve Street, H.E., "Gibberellin-sensitive suspension cultures." **Plant Physiology** 65.3 ,472-477, 1980.

Fu, Y., Zu, Y.G., Chen, L., Shi, X.G., Wang, Z., Sun, S. ve Efferth, T., "Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination." **Phytotherapy research** 21.10,989-994, 2007.

Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A. ve Rasooli, I., "Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils." **Food chemistry** 102.3 ,898-904, 2007.

Galston, A.W. ve Kaur-Sawhney, R., "Polyamines as endogenous growth regulators." **Plant hormones**. Springer, Dordrecht,158-178, 1995.

Gamble, P.E. ve Mullet, J.E., "Inhibition of carotenoid accumulation and abscisic acid biosynthesis in fluridone- treated dark- grown barley." **European Journal of Biochemistry** 160.1,117-121, 1986.

Gamborg, O. L. ve Larue, T.A.G., "Ethylene production by plant cell cultures: The effect of auxins, abscisic acid, and kinetin on ethylene production in suspension cultures of rose and Ruta cells." ***Plant physiology*** 48.4,399-401, 1971.

García-González, R., Quiroz, K., Carrasco, B. ve Caligari, P., "Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges." ***International Journal of Agriculture and Natural Resources*** 37.3,5-30, 2010.

Gaspar, Th., Kevers, Cl., Hausman, J.F. ve Ripetti, V., "Peroxidase activity and endogenous free auxin during adventitious root formation." ***Physiology, Growth and Development of plants in Culture. Springer***, Dordrecht,289-298, 1994.

Gaspar, T., "Seleniated forms of indolycetic acid: new powerful synthetic auxins." 1995.

Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M. ve Thorpe, T.A., "Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture." ***In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*** 32.4,272-289, 1996.

Gautheret, R.J., "Plant tissue culture: A history." ***The botanical magazine Shokubutsu-gaku-zasshi*** 96.4,393-410, 1983.

George, E.F., Hall, M.A ve De Klerk. G.J., "The anatomy and morphology of tissue cultured plants." ***Plant propagation by tissue culture. Springer***, Dordrecht,465-477, 2008.

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 04.01.2023

Giannenas, I., "How to use plant extracts and phytochemicals in animal diets." ***World nutrition forum, the future of animal nutrition. Nottingham University Press***: Nottingham, UK, 2008.

Giri, A., ve Narasu, M.L., "Transgenic hairy roots: recent trends and applications." *Biotechnology advances* 18.1,1-22, 2000.

Gonzalez-Vallinas, M., Molina, S., Vicente, G., De la Cueva, A., Vargas, T., Santoyo, S., Garcia-Risco, M.R., Fornari, T., Reglero, G. ve De Molina, A.R., "Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells." *Pharmacological research* 72,61-68, 2013.

Gray, D. J. ve Conger, B.V., "Influence of dicamba and casein hydrolysate on somatic embryo number and culture quality in cell suspensions of *Dactylis glomerata* (Gramineae)." *Plant cell, tissue and organ culture* 4.2,123-133, 1985.

Greathead, H., "Plants and plant extracts for improving animal productivity." *Proceedings of the nutrition Society* 62.2,279-290, 2003.

Gross, D. ve Parthier, B., "Novel natural substances acting in plant growth regulation." *Journal of plant growth regulation* 13.2,93-114, 1994.

Gurib-Fakim, A., "Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow." *Molecular aspects of Medicine* 27.1,1-93, 2006.

Haberlandt, G., "Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen." *Sber Akad Wiss Wein* 111:69–92, 1902.

Habtemariam, S., "The therapeutic potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes for Alzheimer's disease." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2016,2016.

Hamberg, M. ve Gardner, H.W., "Oxylipin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance." *Biochimica et biophysica acta, L. Lipids and lipid metabolism* 1165.1 ,1-18, 1992.

Häusler, E., Petersen, M. ve Alfermann, A.W., "Isolation of protoplasts and vacuoles from cell suspension cultures of *Coleus blumei* Benth." ***Plant cell reports*** 12.9 ,510-512, 1993.

Hausman, J.F., Gevers, C. ve Gaspar, T., "Involvement of putrescine in the inductive rooting phase of poplar shoots raised in vitro." ***Physiologia Plantarum*** 92.2 ,201-206, 1994.

Hausman, J.F., Gevers, C. ve Gaspar, T., "Auxin-polyamine interaction in the control of the rooting inductive phase of poplar shoots in vitro." ***Plant Science*** 110.1, 63-71, 1995.

Heinrich, M., Barnes, J., Prieto-Garcia, J., Gibbons, S. ve Williams, E.M., *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy E-BOOK. Elsevier Health Sciences*, 2017.

Henson, I. E., "Inhibition of abscisic acid accumulation in seedling shoots of pearl millet (*Pennisetum americanum* [L.] Leake) following induction of chlorosis by norflurazon." ***Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*** 114.1,35-43, 1984.

Hill, R.K. ve Edwards, A.G., "The absolute configuration of methyl jasmonate." ***Tetrahedron*** 21.6,1501-1507, 1965.

Holme, I.B. ve Petersen K.K., "Callus induction and plant regeneration from different explant types of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus'." ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture*** 45:43-52, 1996.

Horváth, E., Szalai, G. ve Janda, T., "Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling." ***Journal of Plant Growth Regulation***, 26, 290-300, 2007.

Houlihan, C.M., Chi- Tang Ho. ve Chang, S.S., "Elucidation of the chemical structure of a novel antioxidant, rosmaridiphenol, isolated from rosemary." ***Journal of the American Oil Chemists' Society*** 61.6,1036-1039, 1984.

Houlihan, C.M., Chi- Tang Ho. ve Chang, S.S., "The structure of rosmariquinone—A new antioxidant isolated from *Rosmarinus officinalis* L." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 62.1,96-98, 1985.

Huxter, T.J., Thorpe, T.A. ve Reid, D.M., "Shoot initiation in light- and dark- grown tobacco callus: the role of ethylene." *Physiologia plantarum* 53.3,319-326, 1981.

Jardak, M., Elloumi-Mseddi, J., Aifa, S. ve Mnif, S., "Chemical composition, anti-biofilm activity and potential cytotoxic effect on cancer cells of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from Tunisia." *Lipids in health and disease* 16.1,1-10, 2017.

Jesus, E.G.D., Souza, F.F.D., Andrade, J.V., Andrade Silva, M.L., Cunha, W.R., Ramos, R.C., Santos, M.F., "In silico and in vitro elastase inhibition assessment assays of rosmarinic acid natural product from *Rosmarinus officinalis* Linn." *Natural Product Research* 38(5), 879-884, 2024.

Kadri, A., Zarai, Z., Ben Chobba, I., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M. ve Gdoura., "Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from South-Western Tunisia." *J Med Plants Res* 5 ,5999-6004, 2010.

Kadri, A., Zarai, Z., Ben Chobba, I., Bekir, A., Gharsallah, N., Damak, M. ve Gdoura, R., "Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated South-Western Tunisia." *Journal of Medicinal Plants Research* 5.25, 5999-6004, 2011.

Kaur, K. ve Pati, P.K., "Stress-induced metabolite production utilizing plant hairy roots." *Hairy Roots: An Effective Tool of Plant Biotechnology*, Singapore,123-145, 2018.

Kelley, C.J., Mahajan, J.R., Brooke, L.C., Neubert, L.A., Breneman, W.R. ve Charmack, M., "Polyphenolic acids of *Lithospermum ruderales* (Boraginaceae). I. Isolation and structure determination of lithospermic acid." *The Journal of Organic Chemistry* 40.12,1804-1815, 1975.

Kiddle, G.A., Doughty, K.J. ve Wallsgrove, R.M., "Salicylic acid-induced accumulation of glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves." ***Journal of Experimental Botany*** 45.9 ,1343-1346, 1994.

Kim, O. T., Kim, M.Y., Hong, M.H., Ahn, J.C. ve Hwang, B., "Stimulation of asiaticoside accumulation in the whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban by elicitors." ***Plant cell reports*** 23.5,339-344, 2004.

Komali, A. S. ve K. Shetty., "Comparison of the growth pattern and Rosmarinic acid production in rosemary (*Rosmarinus officinalis*) shoots and genetically transformed callus cultures" ***Food biotechnology***, 12, 27-41. 1998

Kontogianni, V.G., Tomiçi G., Nikoliç, I., Narantzakiet, A.A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Stojanović, I., Gerothanassis, I.P. ve Tzakos, A.G., "Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity." ***Food chemistry*** 136.1,120-129, 2013.

Krikorian, A.D., "Hormones in tissue culture and micropropagation." ***Plant hormones***. Springer, Dordrecht,774-796, 1995.

Krzyzanowska, J., Czubacka, A., Pecio, L., Przybys, M., Doroszevska, T., Stochmal, A., ve Oleszek, W., "The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha× piperita* cell suspension cultures." ***Plant cell, tissue and organ culture (pctoc)***, 108, 73-8, 2012.

Kuhlmann, A. ve Röhl, C., "Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro. Cultures of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide-activated microglia." ***Pharmaceutical biology***, 44(6), 401-410, 2006.

Kuhnle, J.A., Fuller, G., Corse, J. ve Mackey, B.E., "Antisenescence activity of natural cytokinins." ***Physiologia Plantarum*** 41.1,14-21, 1977.

Label, P. ve Lelu, A.M., "Influence of exogenous abscisic acid on germination and plantlet conversion frequencies of hybrid larch somatic embryos (*Larix×leptoeuropaea*)."
Plant growth regulation 15.2 ,175-182, 1994.

Lamproye, A., Hofinger, M., Berthon, J.Y. ve Gaspar, T., "[Benzo (b) selenienyl-3] acetic acid: a potent synthetic auxin in somatic embryogenesis."
Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Series 3, Sciences de la Vie 311.3,127-132, 1990.

Lance, B., Durley, R.C., Reid, D.M., Thorpe, T.A. ve Pharis, R.P., "Metabolism of [3H] gibberellin A20 in light-and dark-grown tobacco callus cultures."
Plant physiology 58.3 ,387-392, 1976.

Lance, B., Reid, D.M. ve Thorpe, T.A., "Endogenous gibberellins and growth of tobacco callus cultures."
Physiologia Plantarum 36.3,287-292, 1976.

Landmann, C., Hücherig, S., Fink, B., Hoffmann, T., Dittlein, D., Coiner, H. A. ve Schwab, W. "Substrate promiscuity of a rosmarinic acid synthase from lavender (*Lavandula angustifolia* L.)."
Planta, 234, 305-320, 2011.

López-Arnaldos, T., M. López-Serrano, A. RosBaceló, A. A. Calderón, and J. M. Zapata, "Spectrophotometric determination of rosmarinic acid in plant cell cultures by complexation with Fe ²⁺ ions".
Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 351(2),311-314. 1995.

Li, T. S. C., "The range of medicinal herbs and spices."
Handbook of herbs and spices. Woodhead Publishing,113-125, 2006.

Li, Y, Hagen, G. ve Guilfoyle, T.J., "An auxin-responsive promoter is differentially induced by auxin gradients during tropisms."
The Plant Cell 3.11, 1167-1175, 1991.

Liu, J-H. ve Reid, D.M., "Auxin and ethylene-stimulated adventitious rooting in relation to tissue 9."
Journal of Experimental Botany 43.9,1191-1198, 1992.

Loyola-Vargas, V.M. ve Ochoa-Alejo, N., "An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives." ***Plant cell culture protocols*** ,3-13, 2018.

Lubbe, A. ve Verpoorte, R., "Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials." ***Industrial crops and products*** 34.1, 785-801, 2011.

Luqman, S., Dwivedi, R., Darokar, M.P., Kaira, A. ve Khanuja, S.P.S., "Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections." ***Alternative Therapies in Health & Medicine*** 13.5, 2007.

Lynn, D.G. ve Chang, M., "Phenolic signals in cohabitation: implications for plant development." ***Annual review of plant biology*** 41.1,497-526, 1990.

Madsen, H.L. ve Bertelsen, G., "Spices as antioxidants." ***Trends in food science & technology*** 6.8, 271-277, 1995.

Maeda, E. ve Thorpe, T.A., "Shoot histogenesis in tobacco callus cultures." ***In vitro*** 15.6,415-424, 1979.

Mascarello, C., Sacco, E., Pamato, M., Di Silvestro, D., Bassolino, L., Cervelli, B. ve Ruffoni, B., "Rosmarinus officinalis L.: Micropropagation and callus induction for cell biomass development." ***VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants***, 1155, 2015.

Matkowski, A., "Plant in vitro culture for the production of antioxidants—a review." ***Biotechnology advances***, 26(6), 548-560, 2008.

Matsuno, M., Nagatsu, A., Ogihara, Y., Ellis, B.E. ve Mizukami, H., "CYP98A6 from *Lithospermum erythrorhizon* encodes 4-coumaroyl-4'-hydroxyphenyllactic acid 3-hydroxylase involved in rosmarinic acid biosynthesis." ***FEBS letters*** 514.2-3, 219-224, 2002.

McKeon, T.A., Fernández-Macule, J.C. ve Yang, S.F., Biosynthesis and metabolism of ethylene. ***Plant hormones***. Springer, Dordrecht,118-139, 1995.

McMurry, J., *Organická chemie*. 1. vyd. Brno: vutium, všcht Praha, 1200 pp., 2015.

Merillon, J. M. ve Ramawat, K.G., Biotechnology for medicinal plants: research need, *Secondary Metabolites: Plants and Microbes*, 2nd edn. Science Publishers, Enfield, CT 1.2, 2007.

Misra, Pr., "Induced Caulogenesis in Long-term Callus Cultures of Rosmarinus officinalis L." *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 11.2 ,113-116, 2002.

Mizukami, H. ve Ellis, B. E., "Rosmarinic acid formation and differential expression of tyrosine aminotransferase isoforms in Anchusa officinalis cell suspension cultures." *Plant cell reports*, 10, 321-324, 1991.

Munné-Bosch, S. ve Alegre, L., "Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary." *Plant physiology* 125.2 ,1094-1102, 2001.

Murthy, H.N., Hahn, E.J. ve Paek, K.Y., "Adventitious roots and secondary metabolism." *Chinese Journal of Biotechnology* 24.5 ,711-716, 2008.

Naghibi, F., Mosaddegh, M., Motamed, S.M. ve Ghorbani, A., "Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology." *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 4.2,63-79, 2022.

Nakatani, N. ve Inatani, R., "Structure of rosmanol, a new antioxidant from rosemary (Rosmarinus officinalis L.)." *Agricultural and Biological Chemistry* 45.10,2385-2386, 1981.

Nakatani, N. ve Inatani, R., "Two antioxidative diterpenes from rosemary (Rosmarinus officinalis L.) and a revised structure for rosmanol." *Agricultural and Biological Chemistry* 48.8,2081-2085, 1984.

Negi, P.S., "Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application." *International journal of food microbiology* 156.1, 7-17, 2012.

Ngo, S.N.T., Williams, D.B. ve Head, R.J., "Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives." *Critical reviews in food science and nutrition* 51.10,946-954, 2011.

Nieto, G., Huvaere, K. ve Skibsted, L.H., "Antioxidant activity of rosemary and thyme by-products and synergism with added antioxidant in a liposome system." *European Food Research and Technology* 233.1,11-18, 2011.

Nooden, L.D., "Senescence and Aging in Plants." *Photosyn-thesis (eds) LD Nooden and ACL Leopold* ,85-109, San Diego,1988

Ocak, N., Erener, G., Ak, F.B., Sungu, M., Altop, A. ve Ozmen, A., "Performance of broilers fed diets supplemented with dry peppermint (*Mentha piperita* L.) or thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves as growth promoter source." *Czech Journal of Animal Science* 53.4,169, 2008.

Ogita, S., "Plant cell, tissue and organ culture: the most flexible foundations for plant metabolic engineering applications." *Natural Product Communications* 10.5,2015.

Padilla, A., Hogan, R. ve Kaiser, R.B., "The toxic triangle: Destructive leaders, susceptible followers, and conducive environments." *The leadership quarterly* 18.3,176-194, 2007.

Palazon, J., Pinol, M.T., Cusido, R.M., Morales, C. ve Bonfill, M., "Application of transformed root technology to the production of bioactive metabolites." *Recent Res Dev Plant Phys* ,125-143, 1997.

Panya, A., Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., Weiss, J., McClements, D. J. ve Decker, E. A., "Effects of chitosan and rosmarinic acid esters on the physical and oxidative

stability of liposomes.” *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(9), 5679-5684, 2010.

Parnham, M.J., Kesselring, K., “Rosmarinic acid”. *Drugs of the Future* ,10, 756–757, 1985.

Park, S. U., Uddin, R., Xu, H., Kim, Y. K. ve Lee, S. Y. “Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant.” *African Journal of Biotechnology*, 7(25), 2008.

Perez, D.R., Lim, W., Seiler, J.P., Yi, G., Peiris, M., Shortridge, K.F. ve Webster, R.G., "Role of quail in the interspecies transmission of H9 influenza A viruses: molecular changes on HA that correspond to adaptation from ducks to chickens." *Journal of Virology* 77.5 ,3148-3156, 2003.

Pérez-Fons, L., Garzon, M. T. ve Micol, V., “Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order.” *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(1), 161-171, 2010.

Pérez-Tortosa, V., López-Orenes, A., Martínez-Pérez, A., Ferrer, M. A. ve Calderón, A. A., “Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated Thymus membranaceus shoots.” *Food chemistry*, 130(2), 362-369, 2012.

Perumalla, A. V. S. ve Hettiarachchy, N.S., "Green tea and grape seed extracts—Potential applications in food safety and quality." *Food Research International* 44.4, 827-839, 2011.

Peter, K.V., ed. Handbook of herbs and spices, volume 3. *Woodhead publishing*, 2006.

Petersen, M., "Rosmarinic acid: new aspects." *Phytochemistry Reviews* 12.1 ,207-227, 2013.

Petersen, M., Hausler, E., Karwatzki, B. ve Meinhard, J., "Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth." ***Planta*** 189.1, 10-14, 1993.

Petersen, M., "Cytochrome P450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*." ***Phytochemistry*** 45.6, 1165-1172, 1997.

Petersen, M. ve Simmonds, M. S., "Rosmarinic acid." ***Phytochemistry***, 62(2), 121-125, 2003.

Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S., ... ve Wolters, S., "Evolution of rosmarinic acid biosynthesis." ***Phytochemistry***, 70(15-16), 1663-1679, 2009.

Pharis, R.P., Ruichuan, Z., Jen-Jiang, I.B., Dancik, B.P. ve Yeh, F.C., "Differential efficacy of gibberellins in flowering and vegetative shoot growth, including heterosis and inherently rapid growth." ***Progress in plant growth regulation***. Springer, Dordrecht, 13-27, 1992.

Pierpoint, W.S., "Salicylic acid and its derivatives in plants: medicines, metabolites and messenger molecules." ***Advances in botanical research***. Vol. 20. Academic Press, 163-235, 1994.

Pospisilova, J., "Davies, WJ, Jones, HG (ed.): Absciscic Acid. Physiology and Biochemistry." ***Biologia plantarum*** 35 364-364, 1993.

Praveen, N., Naik, P.M., Manohar, S.H., Nayeem, A. ve Murthy, H.N., "In vitro regeneration of brahmi shoots using semisolid and liquid cultures and quantitative analysis of bacoside A." ***Acta Physiologiae Plantarum*** 31.4, 723-728, 2009.

Rahimifard, M., Navaei-Nigjeh, M., Mahroui, N., Mirzaei, S., Siahpoosh, Z., Nili-Ahmadabadi, A., Mohammadirad, A., Baeeri, M., Hajiaghaie, R. ve Abdollahi, M., "Improvement in the function of isolated rat pancreatic islets through reduction of

oxidative stress using traditional Iranian medicine." *Cell Journal (Yakhteh)* 16.2, 147, 2014.

Rainbow, C. ve Rose, A.H., "Biochemistry of Industrial Microorganisms," *cabdirect.org* str. 320.",1963.

Raskin, Ilya., Skubatz, H., Tang, W., Meeuse, B.J.D., "Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants." *Annals of Botany* 66.4 ,369-373, 1990.

Raskin, Ilya., "Role of salicylic acid in plants." *Annual review of plant biology* 43.1, 439-463, 1992.

Raskin, Ilya., "Salicylate, a new plant hormone." *Plant physiology* 99.3,799, 1992.

Raskin, Ilya., Ribnicky, D.M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Pouley, A., Borisjuk,N., Brinker,A.,Moreno, D.A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J.M., Cornwell, T., Pastor, I. ve Fridlender, B., "Plants and human health in the twenty-first century." *Trends in Biotechnology* 20.12, 522-531, 2002.

Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H. ve Vuorela, P., "Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds." *International journal of food microbiology* 56.1, 3-12, 2000.

Reid, D.M., "Responses to environment: environmental cues in plant growth and development." *Plant physiology: a treatise: growth and development* , 1991.

Roberts, D.R., Flinn, B.S., Webb, D.T., Webster, F.B. ve Sutton, B.C.S., "Absciscic acid and indole- 3- butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce." *Physiologia Plantarum* 78.3, 355-360, 1990.

Robertson, A.J., Reaney, M.J.T., Wilen, R.W., Lamb, N., Abrams, S.R. ve Gusta, L.V., "Effects of absciscic acid metabolites and analogs on freezing tolerance and gene

expression in brome grass (*Bromus inermis* Leyss) cell cultures." *Plant Physiology* 105.3, 823-830, 1994.

Rock, C.D. ve Quatrano, R.S., "The role of hormones during seed development." *Plant hormones*. Springer, Dordrecht, 671-697, 1995.

Romani, R.J., Hess, B.M. ve Leslie, C.A., "Salicylic acid inhibition of ethylene production by apple discs and other plant tissues." *Journal of plant growth regulation* 8.1, 63-69, 1989.

Romo Vaquero, M., Yanez-Gascon, M.J., Villalba, R.G., Larrosa, M., Fromentin, E., Ibarra, A., Roller, M., Tomas-Barberan, F., Espin de Gea, J.C. ve Garcia-Conesa, M.T., "Inhibition of gastric lipase as a mechanism for body weight and plasma lipids reduction in Zucker rats fed a rosemary extract rich in carnosic acid." *PloS one* 7.6, e39773, 2012.

Sabater, B. "Hormonal regulation of senescence." *Hormonal regulation of plant growth and development*. Springer, Dordrecht, 169-217, 1985.

Samuelsson, G. ve Bohlin, L., "Drugs of natural origin: A treatise of pharmacognosy". No. Ed. 7. *CRC Press Inc.*, 2017.

Santos, A.R.S., De Campos, R.O.P., Miguel, O.G., Filho, V.C., Siani, A.C., Yunes, R.A. ve Calixto, J.B., "Antinociceptive properties of extracts of new species of plants of the genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae)." *Journal of Ethnopharmacology* 72.1-2, 229-238, 2000.

Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B. ve Fernandes-Ferreira, M., "Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.)." *Plant Science*, 162(6), 981-987, 2002.

Sarı, Yusuf. "Farklı kökenli biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) klonlarının bazı morfolojik, agronomik ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi". Yüksek Lisans Tezi, *Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Bursa, 2019.

Sasaki, Y., Asamizu, E., Shibata, Daisuke., Nakamura, Y., Kaneko, T., Awai, K., Amagai, M., Kuwata, C., Tsugane, T., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K.I., Ohta, H. ve Tabata, S., "Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways." ***Dna Research*** 8.4,153-161, 2001.

Scarpati, M. L. ve Oriente, G., "Chicoric acid (dicaffeoyltartaric acid): its isolation from chicory (*Chicorium intybus*) and synthesis." ***Tetrahedron*** 4.1-2, 43-48, 1958.

Sembdner, G. A. P. B. ve Parthier, B., "The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates." ***Annual review of plant biology*** 44.1, 569-589, 1993.

Silverman, P., Seskar, M., Kanter, D., Schweizer, P., Metraux, J.P. ve Raskin, I., "Salicylic acid in rice (biosynthesis, conjugation, and possible role)." ***Plant physiology*** 108.2, 633-639, 1995.

Skoog, F., "Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro." ***Symp. Soc. Exp. Biol.*** Vol. 11. 1957.

Smith, A. D., Datta, S.P., Howard Smith, G., Campbell, P.N., Bentley, R. ve McKenzie, H.A., "Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology." ***Trends in Biochemical Sciences*** 23.6 ,228, 1998.

Smith, M.A.L., Kobayashi, H., Gawienowski, M. ve Briskin, D.P., "An in vitro approach to investigate medicinal chemical synthesis by three herbal plants." ***Plant cell, tissue and organ culture*** 70.1, 105-111, 2002.

Smith, T.A., "The inhibition and activation of polyamine oxidase from oat seedlings." ***Polyamines in Plants***. Springer, Dordrecht, 67-73, 1985.

Steen, D.A., ve Chadwick, A.V., "Ethylene effects in pea stem tissue: evidence of microtubule mediation". ***Plant Physiology***, 67(3), 460-466, 1981.

Strnad, M., Peters, W., Beck, E. ve Kaminek, M., "Immunodetection and Identification of N 6-(o-Hydroxybenzylamino) Purine as a Naturally Occurring Cytokinin in *Populus× canadensis* Moench cv Robusta Leaves." ***Plant Physiology*** 99.1,74-80, 1992.

Sumaryono, W., Proksch, P., Wray, V., Witte, L. ve Hartmann, T., "Qualitative and quantitative analysis of the phenolic constituents from *Orthosiphon aristatus*." ***Planta medica***, 57(02), 176-180, 1991.

Takebe, I., Labib, G. ve Melchers, G., "Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco." ***Naturwissenschaften*** 58.6, 318-320, 1971.

Tamas, I.A., "Hormonal regulation of apical dominance." ***Plant hormones***. Springer, Dordrecht, 572-597, 1995.

Tanaka, T., Morimoto, S., Nonaka, G., Nishioka, I., Yokozawa, R., Jeong, H. ve Oura, H., "Magnesium and ammonium-potassium lithospermates B, the active principles having a uremia-preventive effect from *Salvia miltiorrhiza*." ***Chemical and pharmaceutical bulletin*** 37.2, 340-344, 1989.

Thanh, N. T., Murthy, H.N., Yu, K.W., Hahn, E.J. ve Paek, K.Y., "Methyl jasmonate elicitation enhanced synthesis of ginsenoside by cell suspension cultures of *Panax ginseng* in 5-l balloon type bubble bioreactors." ***Applied Microbiology and Biotechnology*** 67.2,197-201, 2005.

Thorpe, T.A., ve Murashige, T., "Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures." ***Canadian Journal of Botany*** 48.2, 277-285, 1970.

Thorpe, T.A., "Morphogenesis and regeneration." ***Plant cell and tissue culture***. Springer, Dordrecht, 17-36, 1994.

Thorpe, T.A., "History of plant tissue culture." ***Molecular biotechnology*** 37.2, 169-180, 2007.

Tiwari, S., "Plants: A rich source of herbal medicine." *Journal of natural products* 1.0 27-35, 2008.

Tiwari, R. ve Rana, C.S., "Plant secondary metabolites: a review." *International Journal of Engineering Research and General Science* 3.5 ,661-670, 2015.

Topçu, Ş. ve Çölgeçen, H., "Bitki sekonder metabolitlerinin biyoreaktörlerde üretilmesi." *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2 ,9-29, 2015.

Tu, Z., Moss-Pierce, T., Ford, P. ve Jiang, T.A., "Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) extract regulates glucose and lipid metabolism by activating AMPK and PPAR pathways in HepG2 cells." *Journal of agricultural and food chemistry* 61.11,2803-2810, 2013.

Ulbricht, C., Abrams, T.R., Brigham, A., Ceurvels, J., Clubb, J., Curtiss, W., Kirkwood, C.D., Giese, N., Hoehn, K., Iovin, R., Isaac, R., Rusie, E., Serrano, J.M.G., Varghese, M., Weissner, W. ve Windsor, R.C., "An evidence-based systematic review of rosemary (Rosmarinus officinalis) by the Natural Standard Research Collaboration." *Journal of dietary supplements* 7.4, 351-413, 2010.

Van de Braak, S. A. A. J., ve Leijten, G., "Essential oils and oleoresins: a survey in the Netherlands and other major markets in the European Union." *CBI, centre for the promotion of imports from developing countries, Rotterdam* 116, 1999.

Vasil, V. ve Hildebrandt, A.C., "Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures." *Science* 150.3698, 889-892, 1965.

Verpoorte, R., Van der Heijden, R. ve Memelink, J., "Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production." *Transgenic research* 9.4, 323-343, 2000.

Verpoorte, R., Contin, A. ve Memelink, J., "Biotechnology for the production of plant secondary metabolites." *Phytochemistry reviews* 1.1, 13-25, 2002.

Veselý, J., Havlicek, L., Strnad, M., Blow, J.J., Donella-Deana, A., Pinna, L., Letham, D.S., Kato, J.Y., Detivaud, L., Leclerc, S. ve Meijer, L., "Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues." *European Journal of Biochemistry* 224.2, 771-786, 1994.

Vick, B.A. ve Zimmerman, D.C., "Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species." *Plant physiology* 75.2, 458-461, 1984.

Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A. ve Klessig, D. F., "Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease." *Annual review of phytopathology*, 47, 177-206, 2009.

Vostálová, J., Zdařilová, A. ve Svobodová, A. "Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes." *Archives of dermatological research*, 302, 171-181, 2010.

Wagstaff, S.J., Hickerson, L., Spangler, R., Reeves, P.A. ve Olmstead, R.G., "Phylogeny in Labiatae sl, inferred from cpDNA sequences." *Plant Systematics and Evolution* 209.3, 265-274, 1998.

Walton, D.C. ve Yi, L., "Absciscic acid biosynthesis and metabolism." *Plant hormones*. Springer, Dordrecht, 140-157, 1995.

Weissmann, G., "Aspirin." *Scientific American* 264.1, 84-91, 1991.

Werker, Ella, U. Ravid, and E. Putievsky. "Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae." *Israel Journal of Plant Sciences* 34.1, 31-45, 1985.

White, R.F., "Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco." *Virology* 99.2, 410-412, 1979.

Wisdom, N.N., Bassey, E.E., Jelani, F.B., Ishaku, G.A., Uwem, U.M. ve Joseph, S.C., "Biochemical Studies of Ocimum sanctum and Olax subscorpioidea leaf extracts." *Journal of Pharmaceutical Research International* 12 1-9, 2016.

Wright, S. T. C. "The effect of 6-benzyladenine and leaf ageing treatment on the levels of stress-induced ethylene emanating from wilted wheat leaves." **Planta** 144.2 ,179-188, 1979.

Wu, J. ve Lin, L., "Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction." **Applied microbiology and biotechnology** 62.2, 151-155, 2003.

Yalpani, N., Leon, J., Lawton, M. ve Raskin, I., "Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco." **Plant physiology** 103.2, 315-321, 1993.

Yan, Y., Stolz, S., Chetelat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L., Farmer, E.E., "A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway." **The Plant Cell** 19.8, 2470-2483, 2007.

Yang, Li., Wen, K.S., Raun, X., Zhao, Y.X., Wei, F. ve Wang, Q., "Response of plant secondary metabolites to environmental factors." **Molecules** 23.4,762, 2018.

Yang, R., Potter, T.P., Curtis, O.F. ve Sherry, K., "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, 1997.

Yeoman, M.M. ve Yeoman, C.L., "Tansley Review No. 90. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells." **New Phytologist** ,553-569, 1996.

Yoshida, Y., Sano, R., Vada, T., Takabayashi, J. ve Okada, K., "Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in *Arabidopsis*." **The Company Of Biologists** ,1039-1048, 2009.

Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L. ve Bertagnolli, B.L., "Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*." **Soil Biology and Biochemistry** 34.7, 955-963, 2002.

Yu, K.W., Gao, W.Y., Son, S.H. ve Paek, K.Y., "Improvement of ginsenoside production by jasmonic acid and some other elicitors in hairy root culture of ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer)." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 36.5, 424-428, 2000.

Zhang, Yi. ve Turner, J.G., "Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis." *PloS one* 3.11, e3699, 2008.

Zhao, Z., Yun, C., Gu, L., Liu, J., Yao, L., Wang, W., Wang, H., "Melatonin enhances biomass, phenolic accumulation, and bioactivities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in vitro shoots under UV- B stress." *Physiologia Plantarum* 175(4), e13956, 2023.

Zimmerman, D.C. ve Feng, P., "Characterization of a prostaglandin- like metabolite of linolenic acid produced by a flaxseed extract." *Lipids* 13.5, 313, 1978.

Zinsmeister, H.D., Becker, H. ve Eicher, T., "Moose, eine Quelle biologisch aktiver Naturstoffe." *Angewandte Chemie* 103.2, 134-151, 1991.

Ziv, M. ve Ariel, T., "Bud proliferation and plant regeneration in liquid-cultured philodendron treated with ancymidol and paclobutrazol." *Journal of Plant Growth Regulation* 10.1 ,53-57, 1991.

ÖZ GEÇMİŞ

tarihinde 'ın ilçesinde dünyaya gelen Hatice ÇEVİK, İlk ve orta öğrenimini ilçesinde tamamladıktan sonra yılında Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Biyoteknoloji bölümünü kazandı. yılında lisans öğrenimini tamamlayarak mezun oldu. Eylül yılında Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Biyoteknoloji bölümünde yüksek lisansa başladı.



