

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



GEÇİCİ DALDIRMA BİYOREAKTÖRÜNDE MİKROÇOĞALTIM
İLE ÜRETİLEN *MELISSA OFFICINALIS L.* (OĞUL OTU)
BİTKİSİNİN ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİNİN
İNCELENMESİ

Rabia ÖZTÜRK

Yüksek Lisans Tezi

BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2024

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

GEÇİCİ DALDIRMA BİYOREAKTÖRÜNDE MİKROÇOĞALTIM İLE
ÜRETİLEN *MELISSA OFFICINALIS L.* (OĞUL OTU) BİTKİSİNİN
ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ

Tez Yazarı
Rabia ÖZTÜRK

Danışman
Doç. Dr. Aykut TOPDEMİR

TEMMUZ 2024
ELAZIĞ

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Başlığı: Geçici Daldırma Biyoreaktöründe Mikroçoğaltım ile Üretilen *Melissa officinalis L.* (Oğul Otu) Bitkisinin Antioksidan Kapasitelerinin İncelenmesi

Yazarı: Rabia ÖZTÜRK

İlk Teslim Tarihi: 13.06.2024

Savunma Tarihi: 08.07.2024

TEZ ONAYI

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına göre hazırlanan bu tez aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından değerlendirilmiş ve akademik dinleyicilere açık yapılan savunma sonucunda OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Danışman:	Doç. Dr. Aykut TOPDEMİR Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi	<i>İmza</i> Onayladım
Başkan:	Doç. Dr. Sevinç AYDIN Munzur Üniversitesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Fakültesi	Onayladım
Üye:	Prof. Dr. Mehmet KALENDER Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi	Onayladım

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun/...../20..... tarihli toplantısında tescillenmiştir.

İmza
Prof. Dr. Burhan ERGEN
Enstitü Müdürü

BEYAN

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım “Geçici Daldırma Biyoreaktöründe Mikroçoğaltım ile Üretilen *Melissa officinalis L.* (Oğul Otu) Bitkisinin Antioksidan Kapasitelerinin İncelenmesi ” Başlıklı Yüksek Lisans Tezimin içindeki bütün bilgilerin doğru olduğunu, bilgilerin üretilmesi ve sunulmasında bilimsel etik kurallarına uygun davrandığımı, kullandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi, maddi ve manevi desteği olan tüm kurum/kuruluş ve kişileri belirttiğimi, burada sunduğum veri ve bilgileri unvan almak amacıyla daha önce hiçbir şekilde kullanmadığımı beyan ederim.

08.07.2024

Rabia ÖZTÜRK



ÖNSÖZ

Yapmış olduğum bu tez çalışmasında, her türlü yardımını ve desteğini eksik etmeyen Saygıdeğer Hocam Doç. Dr. Aykut TOPDEMİR' e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresince bilgi birikimiyle yardımını esirgemeyen Sayın Hocam Öğr. Görevlisi Tuba OKUTAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda laboratuvar ortamından ve tecrübelerinden faydalandığım Hocalarım Sayın Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ, Prof. Dr. İnanç ÖZGEN ve Araştırma Görevlisi Abayhan BURAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca ve daima büyük bir fedakarlıkla yanımda ve yüreğimde hissettiğim canım babam Kemal ÖZTÜRK'e, canım annem Havva ÖZTÜRK' e, canım ablam Ümmügülsüm ALICI' ya ve canım kardeşim Hikmet ÖZTÜRK' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Rabia ÖZTÜRK
ELAZIĞ, 2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Sekonder Metabolit	3
1.1.1. Terpenoidler	4
1.1.2. Alkaloidler.....	4
1.2. Antioksidanlar	5
1.3. Fenolik Bileşikler	6
1.4. Flavonoidler.....	6
1.5. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	7
1.5.1. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).....	7
1.5.2. ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)].....	8
1.6. Bitki Doku Çalışmaları.....	8
1.7. Mikroçoğaltım.....	9
1.8. Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemleri.....	10
1.9. Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemleri İle Yürütülen Çalışmalar	10
1.10. Doku Kültürü İle İlgili Yürütülen Çalışmalar.....	13
2. MATERYAL VE METOT	16
2.1. Materyal.....	16
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	16
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar	16
2.2. Metot	17
2.2.1. Bitkilerin Sterilizasyonu.....	17
2.2.2. Ortam ve Malzeme Sterilizasyonu	18
2.2.3. Kültür Ortamı ve Eksplantların Aktarılması	18
2.2.4. Kallus Gelişimi.....	19
2.2.5. Kallus Ekstrakte İşlemi	19
2.2.6. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) Antioksidan Analizi.....	19
2.2.7. ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)] Antioksidan Aktivite Analizi.....	20
2.2.8. Toplam Fenolik Madde Miktarının Analizi	20
2.2.9. Toplam Flavonoid Madde Miktarının Analizi.....	20
3. BULGULAR.....	22
3.1. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Bileşikler.....	22
3.2. DPPH ve ABTS Antioksidan Aktiviteleri	24
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	31
KAYNAKLAR.....	39
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Geçici Daldırma Biyoreaktöründe Mikroçoğaltım ile Üretilen *Melissa officinalis* L. (Oğul Otu) Bitkisinin Antioksidan Kapasitelerinin İncelenmesi

Rabia ÖZTÜRK

Yüksek Lisans Tezi

FIRAT ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Temmuz 2024, Sayfa: x + 42

Bu çalışmanın amacı, invitro koşullarda geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanılarak *Melissa officinalis* L. bitkisinin nod kısımlarından elde edilen kallusların toplam fenolik, toplam flavonoid ve antioksidan kapasitelerini belirlemektir. Hazırlanan MS ortamının içerisine farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonu eklenerek kallus gelişimi sağlanmıştır. Ekimi gerçekleşen *M. officinalis* L. bitkisinin nod kısımları +22 °C 'de 2500 lux floresan ışık altında iklimlendirme odalarında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık bir ortamda gelişimleri takip edilmiştir. Biyoreaktör sisteminde 30 dakika aralıklarla 2 dakika daldırma ve 2 dakika havalandırma süreleri olacak şekilde ayarlanmıştır. *M. officinalis* L. bitki eksplantları 2 hafta kültürde bekletilmiş ve 2 defa alt kültüre alınmıştır. Kallus morfolojisinden en iyi kallus gelişiminin 1BAP+1 2,4-D mg/L ve 1BAP+1,5 2,4-D mg/L konsantrasyonlarında olduğu gözlenmiştir. Kallusların rengi koyu yeşil olup sert bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. 1BAP+2 2,4-D mg/L konsantrasyonunda ise renk gelişimi yeşil-sarı olarak gözlenmiş olup kallusların kırılğan olduğu tespit edilmiştir. BAP ve IAA kombinasyonunda belirgin şekilde kök ve sürgün gelişimi gözlenmiş olup kallus gelişimi gözlenmemiştir. BAP ve picloram kombinasyonunda gelişim gösteren kalluslar ilerleyen süreçlerde kahverengi rengini alıp daha yumuşak ve kırılğan özellik göstererek gelişimini tamamlamadığı görülmüştür. Çalışmada etanol, metanol ve HIP çözücülerini kullanılmıştır. ABTS radikali giderme yönteminde çözücülerle hazırlanmış ekstraktların en yüksek aktiviteleri kıyaslandığında sırasıyla; Metanol > Etanol > HIP ekstraktları olarak tespit edilmiştir. DPPH radikali süpürme yönteminde, çözücülerle hazırlanmış ekstraktların en yüksek aktiviteleri kıyaslandığında sırasıyla; Etanol > Metanol > HIP ekstraktları olarak tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmayla geleneksel doku kültürüne alternatif olarak yeni nesil doku kültürü çalışmalarının gelişimi amaçlanmış olup yapılacak yeni çalışmalara katkı sağlayacağını düşünürüz.

Anahtar Kelimeler: *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* L., Geçici daldırma biyoreaktör, kallus, fenolik madde, flavonoid madde, antioksidan

ABSTRACT

Investigation of Antioxidant Capacities of *Melissa officinalis* L. (Lemon Balm) Plant Produced by Micropropagation in a Temporary Immersion Bioreactor

Rabia ÖZTÜRK

Master's Thesis

FIRAT UNIVERSITY

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Bioengineering

July 2024, Pages: x + 42

The aim of this study is to determine the total phenolic, total flavonoid and antioxidant capacities of calluses obtained from the node parts of the *Melissa officinalis* L. plant using a temporary immersion bioreactor system under *in vitro* conditions. Callus development was achieved by adding a combination of different plant growth regulators into the prepared MS medium. The development of the node parts of the cultivated *M. officinalis* L. plant was monitored in air-conditioning rooms under 2500 lux fluorescent light at +22 °C in a 16-hour light and 8-hour dark environment. In the bioreactor system, 2-minute immersion and 2-minute aeration times were set at 30-minute intervals. *M. officinalis* L. plant explants were kept in culture for 2 weeks and subcultured twice. From the callus morphology, it was observed that the best callus development occurred at the concentrations of 1BAP+1 2,4-D mg/L and 1BAP+1,5 2,4-D mg/L. It was determined that the callus was dark green in color and had a hard structure. At the concentration of 1BAP+2 2,4-D mg/L, color development was observed as green-yellow and it was determined that the calli were fragile. In the combination of BAP and IAA, significant root and shoot development was observed, but no callus development was observed. It was observed that the calli that developed in the combination of BAP and picloram did not complete their development, turning brown in time and becoming softer and more fragile. Ethanol, methanol and HIP solvents were used in the study. When the highest activities of the extracts prepared with solvents in the ABTS radical scavenging method are compared, respectively; It was determined as Methanol > Ethanol > HIP extracts. In the DPPH radical scavenging method, when the highest activities of extracts prepared with solvents are compared, respectively; It was determined as Ethanol > Methanol > HIP extracts. This study aims to develop new generation tissue culture studies as an alternative to traditional tissue culture, and we believe that it will contribute to new studies.

Keywords: *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* L., Temporary immersion bioreactor, callus, phenolic substance, flavonoid substance, antioxidant

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1.	Rosmarinik asit kimyasal yapısı 3
Şekil 1.2.	Terpenoid kimyasal yapısı 4
Şekil 1.3.	Alkaloid'in kimyasal yapısı 5
Şekil 1.4.	Fenolik bileşiğin genel yapısı 6
Şekil 1.5.	Flavonoidlerin genel yapısı..... 7
Şekil 1.6.	DPPH radikalinin yapısı 7
Şekil 1.7.	ABTS katyon radikali 8
Şekil 3.1.	Farklı konsantrasyonlarda gelişen <i>M. officinalis</i> kallus dokularının metanol ekstralarının ABTS grafiği 25
Şekil 3.2.	Farklı konsantrasyonlarda gelişen <i>M. officinalis</i> kallus dokularının etanol ekstralarının ABTS grafiği 26
Şekil 3.3.	Farklı konsantrasyonlarda gelişen <i>M. officinalis</i> kallus dokularının HIP ekstralarının ABTS grafiği 27
Şekil 3.4.	Farklı konsantrasyonlarda gelişen <i>M. officinalis</i> kallus dokularının metanol ekstralarının DPPH grafiği 28
Şekil 3.5.	Farklı konsantrasyonlarda gelişen <i>M. officinalis</i> kallus dokularının etanol ekstralarının DPPH grafiği 29
Şekil 3.6.	Farklı konsantrasyonlarda gelişen <i>M. officinalis</i> kallus dokularının HIP ekstralarının DPPH grafiği. 30

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1.1. <i>M. officinalis</i> L. yapraklarından elde edilen uçucu yağların bileşenleri.....	3
Tablo 2.1. Murashige ve Skoog (MS) Bileşenleri ve Miktarları.....	18
Tablo 3.1. Bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonları	22
Tablo 3.2. Farklı konsantrasyonlarda gelişen <i>M. officinalis</i> kallus dokularının metanol ekstrelerindeki toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g) ve toplam flavonoid madde miktarı(mg KE/g) ...	23
Tablo 3.3. Farklı konsantrasyonlarda gelişen <i>M. officinalis</i> kallus dokularının etanol ekstrelerindeki total fenolik ve total flavonoid madde miktarları.....	23
Tablo 3.4. Farklı konsantrasyonlarda gelişen <i>M. officinalis</i> kallus dokularının HIP ekstrelerindeki total fenolik ve total flavonoid madde miktarları.....	24

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

cm	: santimetre
dk	: dakika
g	: gram
g/L	: gram/litre
N	: Normal
nm	: nanometre
m	: metre
mg	: miligram
mg/L	: miligram/litre
ml	: mililitre
mm	: milimetre
mmol/L(mM)	: milimol/litre
µl	: mikrolitre
µM	: mikromol/litre
°C	: santigrat derece

Kısaltmalar

MS	: Murashige and Skoog
2,4-D	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
IAA	: Indole acetic acid
BAP	: Benzil amino purin
KIN	: Kinetin
PIC	: Picloram
BBD	: Bitki büyüme düzenleyicileri
GAE	: Gallic acid equivalent
ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
TEAC	: Trolox equivalent antioxidant capacity
BA	: Benzil adenin
BHA	: Butilhidroksianisol
HIP	: Hekzan izopropil alkol
PG	: Propil galat
TBHQ	: tert-Butilhidrokinon
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
TIS	: Geçici daldırma biyorektör sistemi
IBA	: Indole butyric acid
GA ₃	: Gibberellic acid

1. GİRİŞ

Melissa officinalis L., (Oğul Otu) bitkisi, Orta ve Güney Avrupa'dan İran ve Orta Asya'ya yayılan Lamiaceae familyasına ait aromatik bir tıbbi bitki türüdür. Melisa bitkisinde ticari olarak faydalandığımız en önemli ülkeler Bulgaristan, Romanya ve İspanya'dır. Melisa bitkisinin *Melissa officinalis* subsp. *altissima*, *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* ve *Melissa officinalis* subsp. *inodora* olmak üzere 3 ayrı alt türü kayıt altına alınmıştır. Bu alt türlerin içinde *Melissa* subsp. *officinalis*, ticari değeri ve limon kokusu özelliği açısından Türkiye ve Balkan ülkeleri açısından büyük öneme sahiptir (Ozturk vd., 2004).

Çok yıllık bir bitki olan melisa bitkisi gür bir bitki olup, dik olarak büyümekte ve yüksekliği 1 m'yi bulmaktadır. 2-8 cm uzunluğunda olan bu bitkinin yaprakları, yumuşak ve tüylü olup, kalp şeklindedir. Melisa bitkisinin yaprak yüzeyleri sert ve belirgin damarlı olup, yaprak kenarları dişlidir. Bu bitki yaz mevsiminde çapraz tozlaşma yapmakta ve yine bu mevsimlerde 4-12 küçük salkımlardan oluşan beyaz ya da uçuk pembe çiçekler açmaktadır. Bir diğer adı ise 'Limon balsamı' olan bu bitkinin bu ismi almasının temel nedeni, tadının ve kokusunun yoğun bir şekilde limona benzemesidir. Tohumları koyu kahverengi veya siyah olup, yaklaşık 1-1,5 mm uzunluğunda ve 0,5 – 0,7 g ağırlığındadır.

M. officinalis, bitkisinde, farklı çevre şartlarıyla uyumlu hale gelmesine olanak sağlayan tüylü bir kök sistemi mevcuttur. Sahip olduğu bu kök sistemi; bitkinin üst kısımlarının ölmesiyle birlikte, bitkinin ilkbahar aylarında tekrardan çoğalmasına olanak sağlar (Moradkhani vd., 2010).

Melisa bitkisi, toprağının pH değerinin 5-7 arasında olması gerekir ve kumlu ve tınlı topraklarda verimi yüksektir. Bitki kısmi bir gölgede büyüyebilir, ancak tam bir gelişim sağlayabilmesi için bol güneş alan bir ortamda yetiştirilmelidir (Janina, 2003). Melisa bitkisi, 15 - 35°C'de hızla büyüyebilir ve özellikle tohumun gelişim döneminde ekimi yapılan alanın 500-600 mm yağış alması gerekir, eğer böyle bir durum mümkün değilse toprak sulanmalıdır. Bitki gelişimini sağladıkça kökleri gelişir ve buna bağlı olarak su ihtiyacı azalır (Davis, 1988).

Melisa bitkisi, eski zamanlarda Rahibeler ile İsviçreli doktor ve kimyacı olan Paracelsus (1493-1541) tarafından tonik olarak kullanılmış, bu toniğin ismini ise "Yaşam iksiri olarak tanımlamıştır. İngiliz bir yazar olan John Evelyn (1620-1706) Melisa bitkisini, melankolida uzaklaştırıcı ve zihni güçlendirici etkisinden dolayı "beynin hükümdarı" olarak adlandırmıştır. Bu bitki, İbranice'de uçucu yağ olarak "bal smin" veya "yağların lideri" olarak belirtilmiştir (Moradkhani vd., 2010).

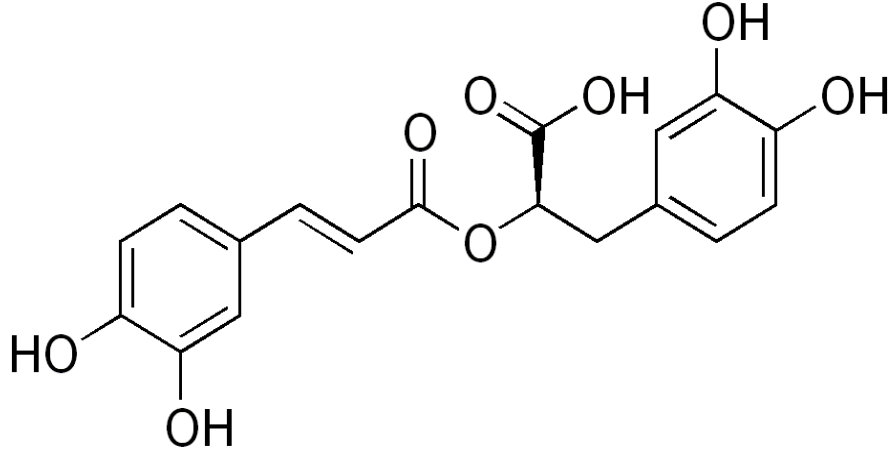
Dioscorides (MS 40-90) farmakolojinin babası olup, De Materia Medica eserinde bitkiyle alakalı şu bilgiye yer vermiştir: "Akrep, örümcek ve köpek ısırığında melisa bitkisinin yapraklarını kaynatmak iyi bir çözümdür." Dizanteri, mantar, bağırsak ülserleri, yakınma, zor nefes alma, eklem ağrısı ve diş ağrısı rahatsızlıklarını iyileştirmede melisa bitkisinden

faýdalanılmaktadır. Kanama, diş ve kulak ağrısı, sabah bulantısı, kellik ve boyun eğriliğinin tedavisinde melisa bitkisi Orta Çağ'da kullanılmaktaydı. Danimarka ülkesinde bu bitki üzüntünün neden olduğu uykusuzluğun tedavisinde yararlanılmaktadır. Avusturya hekimlerince, gastrointestinal, sinir, karaciğer ve safra hastalığında, Hırvatistan'da ise boğaz ağrısı ve öksürük rahatsızlığında faydalanılmaktadır. İspanya hekimleri, İslamiyet Çağ'ında canlandırıcı, panzehir ve ağrıyı kesici etkilerinden dolayı melisa bitkisinden faydalanmışlardır. Lübnan bitki bilimcileri, migren ve mide hastalıklarında ve bunun yanı sıra kalp işlevlerinde ve hafızayı kuvvetlendirmede bu bitkinin yapraklarından faydalanmışlardır. Fas hekimlerince *M. officinalis* bitkisi sakinleştirici ve kalp kasılması tedavilerinde yararlanılmıştır. Eski İran'larda melisa bitkisinin limon esansına değinerek "Citron'un aroması" olarak anılan Wdrangboy ve Wattrangboy kelimelerini kullanmışlardır. İranlı en önemli bilim insanlarından biri olan Jorjani (1042–1136), demans, epilepsi, felç, titreme, migren ve baş dönmesi vs. birçok nörolojik rahatsızlıklarda *M. officinalis* bitkisinden faydalanmışlardır. Şiddetli konjonktivit ve aköz hümörün matlığından dolayı görme yetisinin yitirilmesini tedavi etmede melisa bitkisinden faydalanılmaktadır (Shakeri vd., 2016).

Toksik mantar tüketimiyle ortaya çıkan, kalp spazmaları, grip ve bağırsak ülseri rahatsızlıkları melisa bitkisinin yapraklarının natron ile oral yoldan verilmesi, tedavide etkili olmuştur. Ortopne hastalığında, içerisinde melisa bitkisini bulduran multiherbal ilaçlardan faydalanılmıştır. Skrofula, şişlik, ülser, eklem ağrısı ve diş ağrısı hastalıklarına ise *M. officinalis* bitkisi ve tuz karıştırılarak yapılan lapanın iyi geldiği görülmüştür (İbn Beytar, 2001).

Heidar vd. (2010), melisa bitkisi içeriğinde barınan sitral, sitronelal, geraniol, β -pinen, α -pinen, β -kariofilen gibi yağ bileşenlerinin varlığı % 96 kadar olduğu bilinmektedir. *M. officinalis* yapraklarında elde edilen uçucu yağ bileşenleri Tablo 1.1.' de gösterilmiştir. Ayrıca Carnat vd. (1998), oğul otu bitkisinin uçucu yağlarının ana bileşenlerinin %48'ini sitral, %39,47 sitronelal ve %2,37' sini ise karyofilenin oluşturduğunu belirtmiştir. Taze limon balsamının, fenolik bileşik, askorbik asit ve karotenoidler içerdiği belirtilmiştir (Davis, 1988).

M. officinalis bitkisini bu kadar önemli kılan spazmolitik, antimikrobiyal, antitümör ve antioksidan aktiviteleri içerisinde bulduran uçucu yağlarıdır ve bu bitkinin en önemli fenolik bileşiği RA' dır. RA bileşeni (Şekil 1.1.), herpes virüslerine karşı virostatik olarak, sedatif olarak ve farmasötik preparasyonlarda sindirime yardımcı olarak kullanılmaktadır (Encalada vd., 2011).



Şekil 1.1. Rosmarinik asit kimyasal yapısı

Tablo 1.1. *M. officinalis* L. yapraklarından elde edilen uçucu yağların bileşenleri (Heidar vd., 2010)

Bileşenler	Alınma Süresi	Ağırlık %
β-ocimene Z	1020	0.2
β-ocimene E	1032	0.1
Sitronella	1086	0.01
Neral	1145	43.8
Geraniol	1221	5.3
Geranial	1246	5.2
Timol	1258	7.9
Karvakrol	1274	0.8
Sitronellil format	1276	0.2
Geranil asetat	1362	2.3
Germakren D	1375	0.3
β-karyofilen	1424	13.5
α-humulen	1448	0.7
Karyofilen oksit	1575	0.3
Globulol	1581	6.8
Humulen epoksit	1617	0.3
5-sedranon	1629	0.2
Toplam		89.01

1.1. Sekonder Metabolit

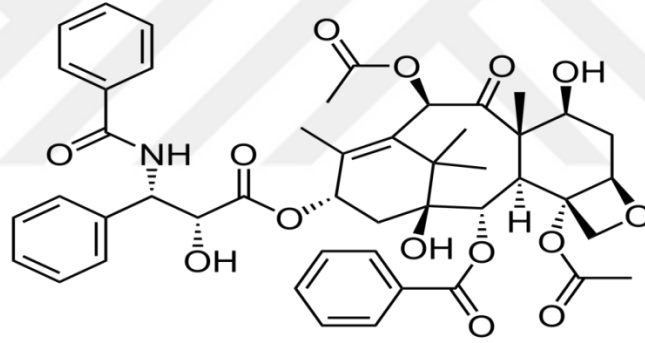
Sekonder metabolitler (ikincil metabolitler), bitkinin büyümesine ve gelişmesine katılmayıp, bitkinin yan ürünü olarak üretilen kimyasal bileşiklerdir. Sekonder metabolitler, birincil metabolitlere kıyasla tüm bitkilerde bulunup, bitki için gerekli olan metabolit işlevleri yerine getirirler (Croteau vd., 2000).

Ekonomik açıdan da çok büyük öneme sahip olan sekonder metabolitler ilaçlar, kokular, tatlar, böcek ilacıları, boyalar, fitokimyasallar, toksinler vs. çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Diğer önemli rolleri ise bitkilerin çevreye uyum sağlamalarını ve hayatta kalmalarını sağlamaktır. Fitoantisipinler, yalnızca enfeksiyonlarda ve yaralanmalarda ortaya

çıkarken; fitoantisipinler, yapısal olarak bitkilerde bulunmaktadır. Sekonder metabolitlerin biyosentetik kökenlerine göre, 3 gruba ayrılırlar: terpenoidler, alkaloidler ve fenilpropanoidler ve müttefik fenolik bileşikler (Zárate vd., 2013).

1.1.1. Terpenoidler

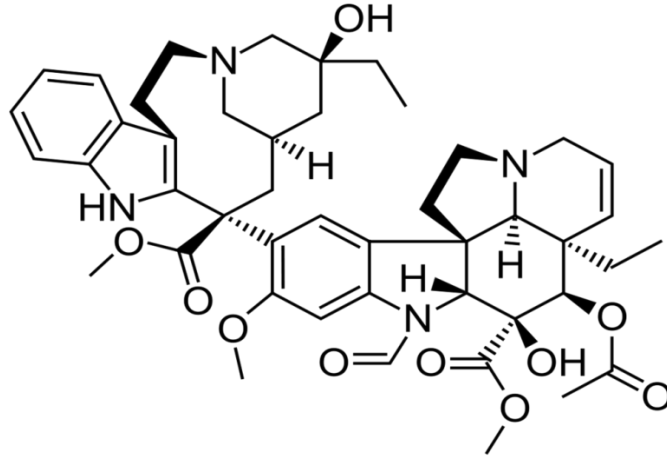
Terpenoidler, bitkilerin yapısında bulunan çok çeşitli doğal bir ürün sınıfıdır. Terpenoid ya da terpen denilmesinin sebebi terebentin (Almanca'da "terpentin")'nin ayrıştırılmasından kaynaklanmaktadır. Dallanmış 5 karbonlu birimlerin füzyonu sonucu izopentan iskeletinin biraraya gelmesiyle terpenler oluşmuştur. Monomerlerinin bir diğer ismi izopren olup, bu ismi almasının nedeni birden fazla terpenoid maddenin termal ayrışması ile alken gazının izoprenin ortaya çıkmasını sağlamaktır. Uygun kimyasal koşullar sağlanırsa izopren 5'in katları şeklinde polimerleşip birden fazla terpenoidin oluşumunu sağlayabilir. Aşağıdaki Şekil 1.2.'de dallanmış 5 karbonlu monomer birimlerin füzyonu sonucu oluşan polimerlere örnek bir terpenoid verilmiştir. Terpenoid'in kimyasal yapısı Şekil 1.2.'de gösterilmiştir (Croteau vd., 2000).



Şekil 1.2. Terpenoid kimyasal yapısı

1.1.2. Alkaloidler

İsmi sodanın ilk olarak ayrıştırıldığı bitki olan Arapça al-qali adından alan alkaloid, 1819 yılında Almanya'nın Halle kentinde eczacı olan Carl Meissner tarafından bulunmuştur. 3000 yıldan fazla bir zamandır alkaloidler, insanoğlunun hayatında varlığını sürdürmektedir. İnsanoğlunun yaşamında yeri olan bu bileşik gerek bitkinin nektarı olarak, gerekse ilaç ve zehir yapısında yerini her zaman korumuştur. Alkaloid içeren kodein afyon haşhaşından elde edilmiş olup hem öksürük kesici hem de analjezik olarak kullanılmaktadır. Şekil 1.3.'te alkaloidin kimyasal yapısı gösterilmiştir (Croteau vd., 2000).



Şekil 1.3. Alkaloid'in kimyasal yapısı

1.2. Antioksidanlar

Antioksidanlar, substratın oksidasyonunu büyük oranda yavaşlatan ve elimine eden bileşiklerdir. Antioksidanların içerdikleri bileşikler, serbest radikal temizleyicileri, indirgen ajanları, metal şelatörleri ve ekşimiş kokular sebebiyet veren sekonder lipid oksidasyon ürünlerinin sönümleyicileridir. Bu bileşikler; askorbik asit, fenolik bileşikler ve tokoferoller gibi doğal bir şekilde bulunur ya da BHA olarak ifade edilen bütillenmiş hidroksianisol, BHT olarak ifade edilen bütillenmiş hidroksitoluen, PG olarak bilinen propil galat ve TBHQ olarak ifade edilen tenbütilhidrokinon gibi sentezlenirler ve gıdalarda önemli role sahiptirler. Gıdasal ürünlere antioksidanların eklenmesiyle lipidlerin oksidatif bozulması elimine edilebilmiştir. Vücudumuzda ortaya çıkan sağlık problemlerinde rol oynayan, reaktif nitrojen türleri (RNS) ve klorin (RCS) hasarlarını engellemek için antioksidanlar uygulanmıştır. Etki mekanizmalarına bağlı olarak antioksidanlar, birincil antioksidanlar ve ikincil antioksidanlar olarak ikiye ayrılır. Birincil antioksidanlar, hidrojen bağımlı ve oksidasyon zincir reaksiyonunu kırıp radikallerin kararlı bir hale gelmesini sağlayan antioksidanlardır. İkincil antioksidanlar ise oksidasyon hızını yavaşlamasına neden olan metal iyon şelatlanması, birincil antioksidanların yenilenmesi, hidroperoksitlerin ayrışması ve oksijenin arındırılmasını sağlayan antioksidanlardır (Shahidi ve Zhong, 2007).

Doğal bir antioksidan olan polifenolik bileşikler, anti-glisemik, antiviral, antikanser ve anti-inflamatuar aktiviteler ile anti-alerjik ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı canlılık için çok önemli bir bileşendir (Gündeşli vd., 2019).

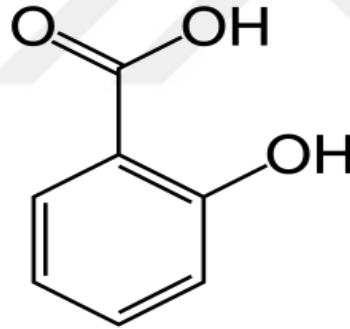
İnsan vücudu için çok büyük fizyolojik öneme sahip olan serbest radikaller, reaktif oksijen türlerini ve reaktif nitrojen bileşiklerini içermektedirler. Dengeyi sağlamak için ise serbest radikaller ile antioksidanların daimi bir uyum içinde olması şarttır. Bu uyumun bozulması durumunda oksidatif stres meydana gelir ve bu da olumsuz bir durumdur. Eşleşmemiş elektronlar

içerip, kararsız olan serbest radikaller, fagositoz sonucu oluşurlar. Süperoksit ve hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve geçiş metalleri oksijenli solunum yapan hücrelerde, serbest radikaller olarak bulunurlar (Özkök ve Yalçın, 2022).

1.3. Fenolik Bileşikler

Fenolik maddeler; bitkilerin çeşitli organlarında bulunurlar. Fenolik bileşiklerin yapılarında, bir hidroksil grubu ve bu hidroksil grubunun bağlı olduğu en az bir aromatik halka bulunmaktadır. Flavonoidler ve flavonoid olmayanlar şeklinde iki ana gruba ayrılmakla birlikte büyük yapısal değişiklik gösteren 8000'den fazla çeşidi vardır (Laura vd., 2019).

Fenolik bileşiklerin kimyasal yapısına bakıldığında hidroksil grubu asitliğinde, benzen halkası bazlığında rol oynar. Fenolik bileşiğin yapısı şekil 1.4.' te gösterilmiştir. Fenolik bileşikler organik çözücüde daha iyi çözünmekle birlikte suda daha az çözünürler. Bitkilerin hücre duvarı yapılarında, çiçeklere rengini vermede, patojen ve strese karşı savunmada, meyvenin özelliklerinde (aroma, renk ve burukluk), tohumun yapısında, tozlaşmasında, çimlenmesinde, gelişiminde önemli rol oynarlar. Fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri, indirgeyici ve hidrojen verici olmalarından kaynaklanmaktadır (Sulusoglu, 2014).



Şekil 1.4. Fenolik bileşiğin genel yapısı

1.4. Flavonoidler

Flavonoidler; fenolik bileşiklerin içinde en biyoaktif grup olup, en temel yapısı flavon olarak adlandırılmaktadır. Bitkilerde sıklıkla glikozit formları halinde bulunup, oksijen içeren bir piren halkasının iki benzen halkasına bağlanmasıyla oluşurlar. Kereviz, maydanoz, kekik, bazı meyveler (kavun ve karpuz), sebzelerde bol miktarda bulunurlar. Kaempferol, kuersetin, mirisetindir ve bunların glikozitleri başlıca favonoidlerdir. Kaempferol, yapraklı sebzeler (tarhun, maydanoz, dereotu vs.) ve meyvelerde; kuersetin, meyveler (üzüm, kiraz ve elma gibi) ve sebzelerde (enginar, Çin lahanası, acı biber marul, soğan vs.); mirisetin ise en fazla çilek ve cevizde bulunan flavonoidlerdir (Laura vd., 2019).

Flavoidler, serbest radikallerle reaksiyona girip onları elimine ederler ve böylece antioksidan özelliklerini gösterirler. Flavonoidlerin yapısı Şekil 1.5. 'te gösterilmiştir. Etki mekanizması basit bir şekilde sıralanırsa;

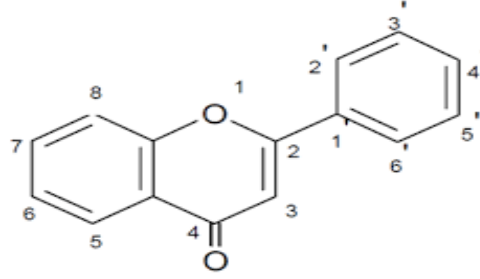
1. Serbest oksijen radikali (O_2^-), hidroksil radikali ($\bullet OH$) ve singlet oksijeni (1O_2) ile reaksiyona girerek bu moleküllerin zararlı etkilerini elimine ederler.

2. Hücrede meydana gelen lipid peroksil ($LOO\bullet$) zincirini Peroksil radikalini ($ROO\bullet$) ve alkoksil radikalini ($RO\bullet$) yakalayarak kırarlar.

3. Geçiş metallerini (demir, bakır vs.) şelatlar.

4. Protein kinaz enzimini engeller.

5. Laktat transportunu elimine eder (Topdemir, 2019).

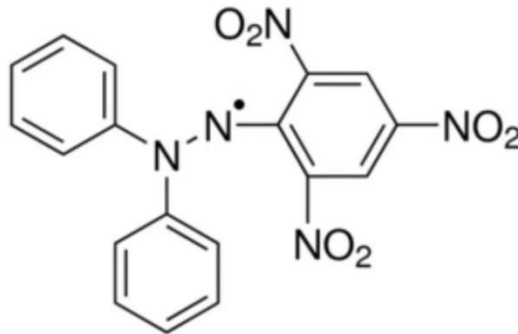


Şekil 1.5. Flavonoidlerin genel yapısı

1.5. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

1.5.1. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)

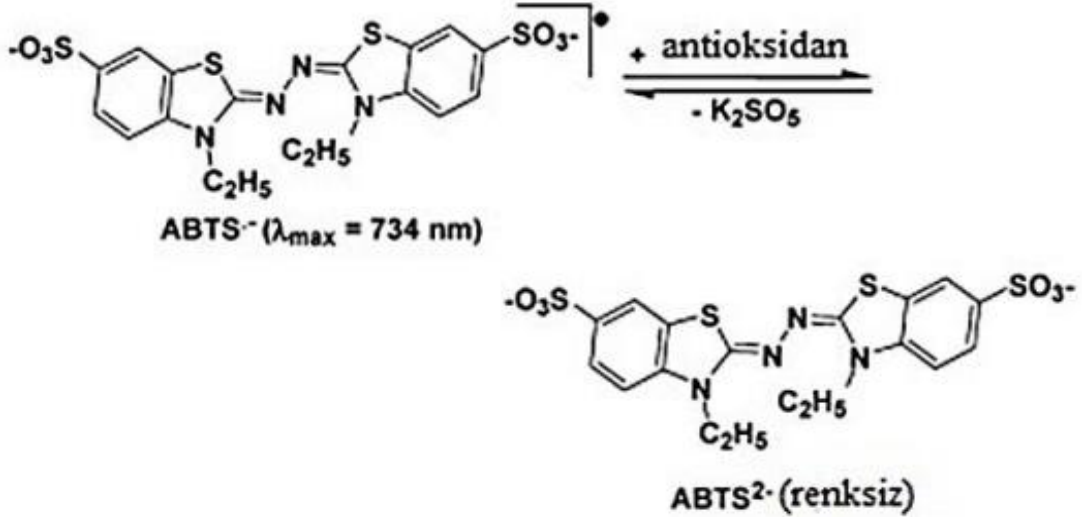
DPPH analizi ilk defa, 1958 yılında Blois tarafından ortaya atılmıştır. 1958 yılını takip eden yıllarda ise Brand-Williams ve arkadaşları bu metodu geliştirerek, birçok araştırmacı tarafından kullanılacak şekilde revize etmişlerdir. DPPH radikalinin yapısı Şekil 1.6.'da gösterilmiştir (Karabakan, 2017).



Şekil 1.6. DPPH radikalinin yapısı

1.5.2. ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)]

Antioksidan kapasite yöntemlerinden biri olan ABTS ilk kez Miller ve Rice-Evans tarafından ortaya konulmuş ve zamanla bu analiz geliştirilerek metodlaştırılmıştır (Miller vd. 1993). Bu analizde güçlü kimyasal yükseltgenler olan potasyum persulfat ($K_2S_2O_8$), manganaz dioksit (MnO_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ABTS kimyasalı ile reaksiyona girerek ABTS katyon radikali ($ABTS^{\bullet-}$) sentezlerler (Şekil 1.7). H_2O_2 ile metmiyoglobinin etkileşerek ferrilmiyoglobin sentezlerler. ABTS radikalinin kararlı kalabilmesi için, $25\text{ }^\circ\text{C}$ 'de karanlık bir ortamda ve 2 günü geçmemesi gerekir. 660 nm, 734 nm ve 820 nm dalga boylarında ABTS en yüksek absorbandsını oluşturur. ABTS radikali ve antioksidanlar reaksiyona geçtiğinde, absorbandsındaki düşüş aktif ve güçlü bir antioksidanın varlığını gösterir (Huang vd., 2005).



Şekil 1.7. ABTS katyon radikali

1.6. Bitki Doku Çalışmaları

Son zamanlarda artan kullanım alanlarıyla bitki doku kültürü tekniklerinin popülerliği fazlaşmıştır. Bitki doku kültürü, hazırlanan besiyerlerine bitkinin hücre, doku ve organ gibi bölümlerini kullanarak aseptik koşullar altında tam bir bitki elde etmeyi amaçlayan bitki biyoteknolojisi alanının önemli bir dalıdır. Kullanılan tekniğin amacı donör bitkiyi klonal çoğaltıp; ticari değeri bulunan türleri üretmenin yanı sıra nesli tükenme tehlikesi bulunan endemik türlerin korunmasında da imkan sağlamaktadır. Doku kültürü çalışmalarında bitkinin kültürünün başarısı; kullanılan bitkinin hücrelerini, dokusunu ve organını etkileyen etmenlere bağlıdır. Besin bileşenleri ve büyüme düzenleyicilerinin seçimi en büyük etmenleri

oluşturmaktadır. Doku kültürü tekniğinde kullanılan besin ortamı; bitkinin türüne ve hatta o bitkinin eksplant türüne bağlı olarak oluşturulan protokolün içerisinde bulunan bileşenlere bağlıdır. Kullanılan materyallerin gelişimlerinin en iyi şekilde olması için, kullanılacak olan ortamın besinleri optimum koşullarda sağlanmalıdır (Hürkan, 2021).

Doku kültürü besiyerini; inorganik bileşikler (mikro ve makro elementler), organik bileşikler (şekerler, vitaminler, agar, aminoasitler, bitki büyüme düzenleyicileri, silikajel, aljinat, nişasta ve jelatin) ve moleküler mekanizması tanımlanmamış destek maddeleri (organik ekstraktlar) oluşturmaktadır (Hürkan, 2020).

Bitki doku kültürü uygulamaları;

- Mikroçoğaltım
- Embriyogenesis
- Organogenesis
- Meristem kültürü
- Germplazm muhafazası
- Somoklonal varyasyon
- Hoploid ve diploid bitki üretimi
- Protoplast kültürü ve Somatik melezleme
- Anter ve ovaryum kültürü başlıklarından oluşmaktadır (Yenice, 2010).

1.7. Mikroçoğaltım

Bir bitkinin herhangi bir yerinden alınan eksplantın (embriyo, gövde, sürgün, kök, kallus vs.) yapay bir kültür ortamında çoğaltılıp, bunun sonucunda yeni bir bitkinin elde edilmesine mikroçoğaltım denilmektedir. Bir bitkinin mikroçoğaltım olarak başarısını, materyalin genotipi, yaşı ve hangi koşullarda yetiştiği önemli kılmaktadır.

Mikroçoğaltımın avantajları;

- Hastalıklardan arındırılmış bitkilerin üretilmesi potansiyeli
- Kontrollü laboratuvar koşullarında üretim
- Üretimi zor olan bitkilerin daha kolay bir şekilde üretilmesi
- Tek bir bitkiden hızlıca ve fazla sayıda bitkilerin üretilmesi
- Bütün bir yıl boyunca üretim (Cengiz, 2018).

Mikroçoğaltımın dezavantajları;

- Özel ekipman / tesisler gerekli
- Daha fazla teknik uzmanlık gerekli
- Tüm türler için optimize edilmemiş protokoller
- Üretilen bitkiler endüstri standartlarına uymayabilir
- Kurulumu nispeten pahalı (Bürün, 2021).

Mikroçoğaltım olarak ilk çalışma botanikçi Haberlandt'ın 1902 yılında, tek bir hücreden tam bir canlının elde etmeye çalışmasıyla başlamıştır. Botanikçi Haberlandt, izole ettiği bitki hücrelerini kültür ortamına aktarmıştır ancak hücreler hacimlerini 11 kat arttırmalarına rağmen çoğalamamışlardır. Haberlandt 'tan sonra yapılan ve olumsuz sonuçlar doğuran çalışmalarda başarısızlığı, o zamanlarda bilinmeyen bitki büyüme düzenleyicilerden kaynaklandıklarını düşünmüşlerdir. Yapılan ilk başarılı çalışma White'ın 1934 yılında, B vitaminlerini içeren maya özü (yeast extract) içerisinde domates köklerini geliştirmesidir. 1939 yılında ise Amerika' da White ve Fransa' da Nobecourt ve Gautheret birbirlerinden bağımsız olarak kallus dokusunun besiyeri ortamında çoğalabildiğini kanıtlamışlardır (Taşkara, 2021).

1.8. Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemleri

Klasik doku kültürü uygulamalarında; *in vitro* ortamlarda elde edilen bitkilerin çoğaltılması hem maliyet olarak hem de büyük bir oranda el emeği gerektirdiğinden, bu şekilde bir üretim bitkilerin klonal olarak çoğaltılmasında sınırlıdır. Klasik doku uygulamalarına kıyasla, geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde ortamı katılaştırıcı agar kullanılmaz. Biyoreaktör sistemlerde kullanılan sıvı kültür ortamı, agarlı yarı-katı (agarlı) ortama kıyasla birçok avantaja sahiptir:

- Kültür şartlarının homojen olması ve bitki eksplantların ihtiyacı olan besinleri kolayca alabilmesi açısından, daha zahmetsiz bir uygulamayla çok fazla miktarda bitkinin üretiminin sağlanabilmesi (Zhu vd., 2005),

- Kullanılan büyük ölçekli reaktörler sayesinde, bitki eksplantlarının alt kültüre alınma sürelerini uzatması,

- Bitkiciklerin gelişim aşamasında O₂'yi tam olarak alamaması ve vitrifikasyon (kristalleşme) gibi durumlara daha az rastlanması,

- Bitkinin kahverengileşmesine (nekroz) sebep olan toksik maddelerin, sıvı kültürlerde nadir olarak rastlanması,

- Biyoreaktör sistemlerin daldırma ve havalandırma sürelerinin her bitki için optimum koşullara getirilip o bitkinin gelişimine olanak sağlamasıdır (Maurizio vd., 2015).

Geçici daldırma biyoreaktör sistemleri ile ilgili yapılan çalışmalarda başarı sağlanan ilk bitkiler *Solanum tuberosum* ve *Coffee arabicam* somatik embriyolarından olup Harris ve Mason (1983) adında iki bilim insanı tarafından geliştirilmiştir (Hasan Ali, 2019).

1.9. Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemleri İle Yürütülen Çalışmalar

Zhu vd. (2005), geçici daldırma biyoreaktör sistemini kullanarak RITA kaplarında elma anacı M26 büyümesi için şartların optimizasyonunu amaçlayan çalışmanın sonuçlarını rapor etmişlerdir. Çeşitli tür ve boyut olarak alınan eksplantları, çeşitli konsantrasyonlarda bitki

büyüme düzenleyicilerini (BAP, IBA ve Kinetin) çoğalma ve uzama aşamalarında ve sürgün uzama zamanında ortam değişikliği test edilmiştir. En iyi sürgün oluşumunun yüksek sitokinin konsantrasyonlarından elde edildiği görülmüştür.

Welander vd. (2014), geçici daldırma biyoreaktör sistemine dayanarak oluşturulan yeni bir kültür kabı kullanarak *Digitalis lutea* Purpurea, *Echinacea purpurea* ve *Rubus idaeus*'un mikroçoğaltımı değerlendirilmiştir. Sıvı ortamda çoğalma katsayısı ve sürgün gelişimi yarı-katı ortama göre daha iyi sonuç vermiştir. Sıvı ve yarı katı ortamda geliştirilen *Digitalis* ve *Rubus* bitkisinin sürgün sayısı hemen hemen aynıyken, *Echinacea* bitkisi sıvı ortamda yarı-katı ortama kıyasla daha fazla sürgün oluşturmuştur.

Daungban vd. (2017), çalışmalarında 700 ml'lik iki adet şişeyle geçici daldırma biyoreaktör sistemi oluşturup, bu sistemin içerisinde yer alan sıvı kültür ve muz eksplantlarını temas ettirip oluşan sürgünlerin sayısına etkilerini incelemişlerdir. Bazı eksplantları kesilmeden bırakıp veya uzunlamasına kesit alarak (2 ya da 4 parça) karşılaştırmışlardır. Klasik doku kültüründe ekimi yapılan muzlar, kap başına daha az sürgün ve daha fazla küçük sürgün geliştirmişlerdir.

Mosqueda Frómata vd. (2017), yaptıkları çalışmada gerbera bitkisinin sürgünlerini invitro ortamda çoğaltmak için geçici daldırma biyoreaktör sistemini kullanarak sistemin uygulanabilirliğini değerlendirmişlerdir. IAA kullanılarak aynı ortam ile desteklenmiş sürgünler 7 ile 14 gün sonra, aynı ortam kullanılarak ancak IAA ile desteklenmiş sürgünler, geçici daldırma biyoreaktör sisteminde köklenmesi teşvik edilmiştir. Dış ortam için gelişimini tamamlamış bitkicikler, dış ortama alıştırılmıştır. Geçici daldırma biyoreaktör sistemi ile yapılan bu çalışma, gerbera bitkisinin köklendirilmesi ve iklimlendirilmesi açısından yapılan ilk çalışmadır.

Welander vd. (2016) yaptıkları bu çalışmada, geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanılarak birkaç *Vaccinium* (Yaban Mersini) bitki çeşitlerinin büyük ölçekli mikro çoğaltımını değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Agarın kullanılmaması, köklenme ve sürgün oluşumunun daha az alt kültüre alınarak gelişiminin sağlanması hem maliyet hem de zaman açısından daha avantajlı olmuştur. Biyoreaktörde bulunan havalandırma sistemi sayesinde, bitki kalitesi daha da iyileştirilmiştir.

Ziv vd. (1998) yaptıkları çalışmada, özellik olarak steril tek kullanımlık ve aynı zamanda ışığı geçirebilen plastik kaplardan oluşan hava taşımali biyoreaktör sistemi kullanılarak birkaç bitkinin meristematik hücrelerinin çoğalmasını amaçlamışlardır. Hava kaldırmalı cam biyoreaktöre dayandırılan plastik biyoreaktörler; şekil, boyut ve yapısal özellik bakımından birbirine benzemektedir. Plastik biyoreaktörler, tek aşılama, toplama portu, dağıtma ve karıştırma aksesuarları kullanılarak geliştirilmiştir. Plastik biyoreaktörler, kullanılan bitkinin hücre duvarı ve boyutundan kaynaklı kesme hasarı ve köpürme sorunlarını önemli ölçüde elimine etmiştir.

Yapılan çalışmada kullanılan bu biyoreaktörler, patates, eğrelti otu, muz ve glayöl meristem ve tomurcuk hücreleri kullanılarak propagül gelişimi için kullanılmıştır.

Hanhineva vd. (2005), yaptıkları çalışmada yeni bir sürgün gelişimi için çilek yaprağı eksplantlarını geçici daldırma biyoreaktör sisteminin kullanılabilirliğini test etmişlerdir. Bitki çeşidi türlerinden *Bounty*, *Jonsok*, *Korona*, *Polka* ve *Zephyr* ticari olarak temin edildikten sonra, hem geçici biyoreaktör sisteminde hemde yarı katı ortamda çoğaltılmış ve her iki ortamın eksplantın gelişimi açısından karşılaştırılması yapılmıştır. Çalışmada kullanılan çilek bitkisi geçici daldırma biyoreaktör sistemi için avantajlı bulunmuştur.

Gao vd. (2015), yaptıkları çalışmada geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanılarak Çin su kestanesinin hem soğancık hem de sürgün gelişimi incelenmiştir. Bitki için optimum şartları gözlemlendiğinde; 36,5 kat çoğalma oranı ve 68,9 sürgün oluşturma kapasitesi artışı ve vitrifikasyon (camlaşma) düşüklüğü açısından en iyi süre her 8 saatte bir kültür ortamına 15 dakika daldırma olarak olarak faydalı bulunmuştur.

Ziv (1991), yaptığı çalışmada geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanarak *Nepthro lepis*, *Philodendron* ve *Gladiolus* koltuk altı tomurcuk eksplantlarının sıvı kültürde gelişimlerini gözlemlemiştir. Eksplantlar geçici daldırma biyoreaktörlerde meristemoid kümeler üretirken, yarı katı kültürde yapraklı sürgünler oluşturduğu gözlenmiştir. Sıvı kültürden ayrılan meristemoid kümeler, toprağa aktarılmadan önce yarı katı kültüre aktarılıp sürgün gelişimi sağlanmıştır. Yaptığı çalışmada geçici biyoreaktör sisteminin daha uygun olduğunu belirlemiştir.

Yenice (2010), su mercimeği ile yaptığı çalışmada bitki büyüme düzenleyicilerinin protein miktarına etkilerini incelemek için geçici daldırma biyoreaktör sistemini kullanmışlardır. Bitki eksplantları farklı oranlarda bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, Kinetin, TDZ) içeren, sukroz ilave edilen ve edilmeyen sıvı kültür ortamına aktarılmış ve olumlu yönde etkileri olduğu gözlemlenmiştir.

Biçen (2017), geliştirdiği bu protokolda mersin bitkisinde (*Myrtus communis* L.) Plantform biyoreaktör sistemi ile yarı katı kültür ortamının kıyaslamasını gerçekleştirmiştir. Yapılan bu çalışmada, iki çeşit Mersin genotipinden yararlanılmıştır. Hem plantform biyoreaktör sistemi hem de yarı katı kültür ortamında hazırlanmış besiyeri içeriği 1,0 mg/L BAP konsantrasyonlu, köklendirme yapmak için hazırlanan besiyerinde 1,0 mg/L IBA konsantrasyonlu besin ortamları uygulanmıştır. Plantform biyoreaktör sisteminde 4 ve 8 saat daldırma süreleri kullanılmış, yarı katı kültür ortamıyla karşılaştırılması yapılmıştır. Yapılan çalışmaya bakıldığında ise Plantform biyoreaktör sisteminde gelişen bitkilerin yarı katı kültür ortamında gelişen bitkilere kıyasla daha başarılı olduğu gözlenmiştir.

Sacco vd. (2013), yaptıkları çalışmada *Stevia rebaudiana* Bertoni (Şeker Otu) bitkisinin geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanarak sıvı kültürde mikroçoğaltımını gözlemlemiştir. Yaptıkları bu çalışmada sıvı kültürleri (RITA ve Plantform biyoreaktör sistemleri) ve yarı katı

(agarlı) kültürü karşılaştırmışlardır. Hem RITA hem de Platform biyoreaktör sistemlerinde; hormonsuz sıvı besin ortamı, BA (0,3 mg/L) ilave edilmiş sıvı kültür ortamı ve IAA (0,5 mg/L) ilave edilmiş sıvı kültür ortamı kullanılmış ve bu iki reaktör sistemindeki çoğalma oranı yarı katı kültür ortama göre daha fazla olduğu görülmüş, BAP ise materyal başına düşen sürgün sayısında artışı sağlamıştır.

Umarusman vd. (2020), yaptıkları çalışmada geçici daldırma biyoreaktör sistemi ve yarı katı kültür karşılaştırılmasını kullanarak beş farklı böğütlen çeşidinin mikroçoğaltım ve köklendirme çalışmasına bakılmıştır. Yarı katı kültür mikroçoğaltım denemelerinde MS besin ortamına BA ve GA₃ kombinasyonu, köklendirme denemelerinde ise MS besin ortamına NAA ve IBA kombinasyonları kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonunda en iyi mikroçoğaltım değeri 1mg/L BA, en yüksek kök başarısı 1mg/L NAA kombinasyonlarında gözlenmiştir. Yapılan analizler bu defa geçici daldırma biyoreaktöründe çalışılmış ve gerek mikroçoğaltım gerekse kök gelişimi açısından biyoreaktör sisteminin daha etkili olduğunu ortaya koymuştur.

Erçetin (2013), yaptığı çalışmada kallus kültürü, süspansiyon kültürü ve geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanarak *A. densiflora* bitkisinde bulunan şikonin ve türevlerinin miktarlarını araştırmıştır. Besiyerleri olarak Murashige ve Skoog (MS), Gamborg (B5) ve Schenk ve Hildebrandt (SH) ve bu besiyerlerine farklı bitki büyüme düzenleyicileri kullanılıp bitki eksplantlarının ekimi yapılmıştır. En iyi kallus gelişimi MS ortamında gözlenmiş olup M9 ve M10 ortamlarına (Şikonin için kullanılan ortam) aktarılmıştır. Gelişimleri kallus kültürü ve süspansiyon kültüründe 50 gün ve biyoreaktörlerde 25 gün olarak gözlenip, analizleri yapılmıştır. Çalışılan bitkinin kök ve kabuk kısımlarındaki şikonin, alkannin ve asatilalkannin değerleri karşılaştırmalı olarak kalitatif ve kantitatif analizleri yapılmıştır. Yapılan bu analizde M10 ortamının M9 ortamına kıyasla sekonder metabolit açısından daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Orhan Fedekar (2015), yaptığı çalışmada *Prunus cerasifera* L. bitkisini doğal şartlarda yetiştirmek zor olduğu için yarı katı kültür ile geçici daldırma biyoreaktör sisteminde çalışmalar yapıp, her iki çalışmayı da kıyaslamıştır. Bu çalışmada yeni nesil doku kültürü geleneksel doku kültürüne kıyasla daha avantajlı bulunmuştur.

1.10. Doku Kültürü İle İlgili Yürütülen Çalışmalar

Topdemir vd. (2023), yaptıkları çalışmada oksin türevi olan NAA, sitokinin türevleri olan BAP ile IBA içeren besin ortamları hazırlanmış ve yetiştirilen kivi bitkisinin (*Actinidia deliciosa*) kolitedonları eksplant kaynağı kullanılarak kallus indüksiyonu için kültüre alınmıştır. Gelişen kallus hücrelerinin antioksidan kapasite ve antioksidan aktivite analizleri yapılmıştır. Kallus ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarı içeriğinde 0,5 mg/L NAA ve 1 mg/L BAP ile 0,5 mg/L IBA bulunan besin ortamında gelişen kallus dokularının kontrol grubuna ait kallus dokularındaki aktiviteye kıyasla düşük olduğu tespit edilmiştir. Bunun aksine NAA ve BAP

kombinasyonu içeren besiyeri gruplarında gelişen kallus dokularında yüksek miktarda toplam fenolik madde olduğu tespit edilmiştir. Topdemir vd. (2018), yaptıkları bir başka çalışmada *M. officinalis* bitkisinin nodları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Farklı bitki hormonu içeren Murashige Skoog besiyerinde indüklenen kallus dokularında yapılan ABTS analizinde 0,191 mmol/L ile en düşük değer 1,5 mg/L 2,4-D ile 0,5 mg/L BAP içeren besiyerinde, en yüksek değer 0,365 mmol/L şeklinde 1,5 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L PİC ile 0,5 mg/L KİN içeren besiyerinde olduğu rapor edilmiştir.

Topçu Bayram (2010), yaptığı çalışmada *M. officinalis* L. bitkisinin farklı bitki büyüme düzenleyicileri bulunan MS ortamına aktarılıp, bitki eksplant üzerinde etkileri incelenmiştir. Araştırmada Kazdağı florasında, Çanakkale yöresinde ve yurtdışı kökenli (İtalya) genotipler kullanılmıştır. Eksplantların aksiler meristemleri kullanılıp, farklı bitki büyüme düzenleyicilerde etkileri incelenmiştir. Bitki boyu, yeşil sürgün ağırlığı, kök gelişimi ve boğum sayısına bakılmıştır. Kullanılan kombinasyonlardan IBA ve IAA kombinasyonunda kök gelişimi olurken, BA ve kinetin kombinasyonunda sürgün gelişiminin olduğu bildirilmiştir.

Başak ve Candan (2008), yaptıkları çalışmalarda *Lallemantia canescens* bitkisini *in vitro* ortamda kallus kültürü çalışılmıştır. Geliştirilen kallus dokularında toplam fenolik ve flavonoid bileşik tayinleri ile antioksidan aktivite etkileri incelenmiştir Erdağ vd. (2019), yaptıkları çalışmada endemik bir tür olan *Dorystoechas hastata* bitkisinin farklı eksplantları ve bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak elde edilen kalluslarda etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmada kontrol olarak sadece ½ MS ve bunun dışında ½ oranında MS içeren besiyeri ortamına bitki hormonları olarak BA ile 2,4-D eklenip bu eksplantların üzerinde etkileri incelenmiştir. Doğal yetiştikleri ortamdaki ve *in vitro* ortamda elde edilen bitkiciğin yaprak saplarından alınan eksplantlardan hiçbir gelişim gözlenmemiştir. Yaprak saplarından alınan eksplantlarından sadece ½ oranında MS ve 2mg/L BA içeren besiyeri ortamında kallus gelişimi gözlenmiş olup, en yüksek kallus gelişiminin ise ½ oranında MS ile 1mg/L BA ve 2mg/L 2,4-D içeren besin ortamında (%55) olduğu gözlemlenmiştir.

Beceren (2013), yaptığı çalışmada kallus çoğaltımı için siyah havucun hipokotil bölgesinden eksplant alıp antioksidan aktivite tayini yapılmıştır. Yapılan çalışmada kullanılan eksplantlar farklı büyüme düzenleyici kombinasyonları ile hazırlanmış MS ortamına aktarılmıştır. Yüksek kallus gelişiminin 0,5 mg/L oranında 2,4-D içeren MS ortamında 31,191 g ağırlığında olduğu bildirilmiştir. Gelişimi gerçekleşen kallusların 2,4-D ve kinetin içerikli 4 farklı besiyerine uygulanmıştır. Oluşan siyah havuç kallus dokularından hazırlanan ekstraktların antioksidan tayinleri yapılarak, doğal olarak yetiştirilen siyah havuç ile karşılaştırılması yapılmıştır. Elde edilen en yüksek antioksidan aktivite değerlerinin 0,5 mg/L 2,4-D ve 0,5 mg/L kinetinli besiyerinde gelişim gösteren kallus dokularında olduğu tespit edilmiştir.

Karataş (2013)'ın yaptığı çalışmada da siyah havuç bitkisinden kallus dokularını elde edip, toplam fenolik, toplam flavonoid bileşik miktarları ile antioksidan aktivite tayinlerini yapmıştır. Bitkinin hipokotil kısımlarından elde edilen kalluslar 30 g/L sükröz, 2 g/L phytigel ve 2 mg/L 2,4 -D + 0,2 mg/L BAP içeren MS besiyeri ortamında kültüre alınmıştır. Elde edilen sonuçlar toplam fenolik bileşiklerin ve serbest radikal giderme aktivitesinin (DPPH) yüksek olduğunu göstermektedir.

Yapılan bu tez çalışmasında, saksıda yetiştirilen *M. officinalis* fideleri materyal olarak kullanılmıştır. Saksıdan alınan fidelerin nod kısımları yıpratılmadan ve kurummasına imkan verilmeden kallus indüksiyonu için *in vitro* koşullarda kültüre alınmıştır.



2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

2 normal değerinde Folin-Ciocalteu reaktifi: Çalışmada çözelti 10 kat seyreltilerek kullanılmıştır.

%75 oranında Sodyum Karbonat Çözeltisi: Na_2CO_3 katı kimyasalı 7,5 g tartımı yapıp 100 ml distile suya tamamlanarak hazırlanmıştır.

%2 oranında 1 ml hacminde AlCl_3 (metanol/glasiyel asetik asit (v/v)) çözeltisi: 2 g AlCl_3 kimyasalı (Katı) tartılıp, totalde 100 ml hazırlanan metanol:glasiyel asetik asit (1:1) karışımında çözdürülmüştür.

50 mmol/L Fosfat Tampon Çözeltisi: Çalışmada kullanılan çözelti 0,615g potasyumdihidrojenfosfat (KH_2PO_4) ve 3,57 g dipotasyumhidrojenfosfat (K_2HPO_4) 500 ml hacmindeki balon jofede saf su ile çözdürülmüştür. Hazırlanan çözeltinin pH değeri 7,2-7,4 arasında dengelenmiştir.

7 mM ABTS stok çözeltisi: 77 mg ABTS tartılarak balon jofeye alınmış ve üzerine 20 ml hacminde fosfat tampon çözeltisi eklenip çözdürülmüştür. Ayrı bir balon jofe daha kullanılarak 13 mg potasyum persülfat tartılmış üzerine 20 ml hacminde fosfat çözeltisi eklenerek çözdürülmüştür. Hazırlanan bu iki çözelti karıştırılarak erlende karıştırılıp, ışık geçmesini önlemek amacıyla alüminyum folyo ile sarılmıştır. Hazırlanan karışım koyu mavi bir renk oluşumunun gerçekleşmesi için 16 saat oda sıcaklığı ve karanlık koşullarda inkübe edilmiştir.

Gallik asit çözeltisi: 50 mg ağırlığında gallik asit kimyasalına çözünmesi amacıyla iki damla etil alkol eklenmiştir. Balon jofeye aktarılan bu çözelti 100 ml saf suya tamamlanmıştır.

Kuersetin çözeltisi: 50 mg ağırlığındaki kuersetin kimyasalı balon jofeye aktarılıp, 100 ml çözelti olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

2,5mmol/L Troloks çözeltisi: Balon jofe içerisine 32 g troloks kimyasalı tartılarak üzerine çözünmesi için iki damla etil alkol eklenmiştir. Çözünmesi gerçekleşen çözelti 50ml balon jofeye aktarılıp üzeri saf su ile tamamlanmıştır.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre: Shimadzu, UV-1800

Hassas Terazi: Shimadzu TXB622L

pHmetre: Thermo Scientific Orion Star A111

Otoklav: JeioTech ST-85G

Sterilizatör: JeoTech, ON-21E
Laminar Kabin (Laminarflow): Thermo Scientific S2020 1.2
Blender: Spice&Herb Grinder, IC-10B
Otomatik Pipetler: Brand Transferpette S, 100-1000 µl
Manyetik Karıştırıcı: Isolab MS-010
Buzdolabı: Hotpoint, Ariston, A+Class
Sükroz: BioShop
Murashige ve Skoog (MS): Merck
Agar: Duchefa
Etil alkol (EtOH) %96: Honeywell
Teksoll %96: Tekkim
Indol Asetik Asit (IAA): CDH
Benzilaminopürin (BAP): Caisson Biochemie
2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D): Duchefa
Picloram (PIC): Alfa Aesar
ABTS %98: Merck
Potasyum peroksidisülfat: Kimyalab
Trolox %97: Sigma-Aldrich
Dipotasyumhidrojenfosfat (K₂HPO₄): Kimyalab
Potasyumdihidrojenfosfat (KH₂PO₄): Kimyalab
Gallik asit: Merck
Folin-Ciocalteu's phenol reagent: AFG Sicientific
Sodyum karbonat: Kimyalab
Alüminyum klorür: Edukim
Glasiyel asetik asit: Kimyalab
Metanol: Sigma-Aldrich
Kuersetin: Sigma-Aldrich
DPPH: Merck
Hexan: Carlo Erba
2-propanol: Carlo Erba

2.2. Metot

2.2.1. Bitkilerin Sterilizasyonu

Tez çalışmasında kullanılacak olan melisa bitkisi fidelerinin ön yıkaması akan su altında gerçekleştirildikten sonra, ekimi için bistüri yardımıyla nod kısımları alınmıştır. Bitkiden alınan nod

kısımları % 70 değerinde hazırlanan etil alkolde 1dk süreyle bekletilmiştir. Steril olan laminar flow kabinin içine alınan eksplantlar, ticari olarak satışı yapılan %5' lik Sodyum hipokloritte (NaOCl) 15 dakika boyunca steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminde son olarak ticari çamaşır suyundan arındırmak için ise 3 tekrar (5 dakika) olmak üzere distile su ile muamele edilmiştir.

2.2.2. Ortam ve Malzeme Sterilizasyonu

Laminer flow kabin içi kültüre alma işlemi gerçekleşmeden önce, etil alkol ve UV ışığı uygulanarak mikroorganizmalardan arındırılmıştır. Ekim işlemi aşamasında kullanılacak olan petri aliminyum folyo ile kaplanarak 170 °C 'de 1 saat etüvde steril edilmiştir. Çalışmada gerekli olacak saf su, besi yeri, pens ve beher 121 °C, 1 atm basınç ve 20 dakika olacak şekilde sterilizasyonları yapılmıştır.

2.2.3. Kültür Ortamı ve Eksplantların Aktarılması

Yapılan çalışma için *in vitro* koşullarda bitki eksplantlarının ihtiyacı olan makro ve mikro besin elementleri, vitaminleri ile suyunu karşılayan MS besiyeri ortamı kullanılmıştır. MS besiyeri ortamının sahip olduğu içerik ve miktarları Tablo 2.1.' de verilmiştir.

Tablo 2.1. Murashige ve Skoog (MS) Bileşenleri ve Miktarları

Kimyasallar	Konsentrasiyon (mg/L)
KNO ₃	1900
(NH ₄)NO ₃	1650
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
CaCl ₂ 2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
Na ₂ EDTA	33.6
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
Myo-inositol	100
Pyridoxin -HCl	0.5
Nicotinicacid	0.5
Thamin -HCl	0.1
Glisin	2
Sakkaroz	30000
pH	5.7

Bu tez çalışması için hazırlanan kültür ortamında, bitki büyüme düzenleyicileri olarak Benzilaminopürin (BAP), Indolasetikasit (IAA), picloram (PIC) ve 2,4-diklorofenoksiasit (2,4-D) kombinasyonlarından yararlanılmıştır.

Besiyeri hazırlanırken içerik olarak 4,4 g/L MS ile 30 g/L sükröz tartımı yapıp manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. Homojen bir çözelti halini aldığında pH değeri 5,6-5,8 aralığına getirilmiştir. Hazırladığımız besiyerine farklı bitki büyüme düzenleyicileri ekleneceği için karıştırmamak amacıyla besiyerini eklediğimiz şişeler etiketlenmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinde BAP sabit olarak alınıp 24 farklı kombinasyon oluşturulmuştur. 5'er tekrarlı olmak üzere her konsantrasyon için totalde 10 adet cam şişe (1L) kullanılmıştır (daldırma-havalandırma). Besiyeri sterilizasyonunun işleminden sonra otoklavdan çıkardığımız besiyeri ve diğer malzemeler ekim yapılacak kabine bırakılmıştır. Kabinin içinde bulunan 10 adet şişenin 5 adetine besiyerini (her şişeye 300 mL) aktarıp, kabinin içinde soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan besiyerine (sıvı kültür) her şişeye 3 adet (5*3=15 eksplant) nod olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan şişeler ile boş şişeler kabinin içinde birleştirilip hava kompresörüne bağlanmak üzere kabinin dışına çıkarılmıştır.

2.2.4. Kallus Gelişimi

Ekimi gerçekleşen *M. officinalis* eksplantları 2500 lux floresan ışık altında 22 ± 2 °C sıcaklığa sahip iklimlendirme bölümlerinde 8 saat karanlık 16 saat aydınlık bir ortamda gelişimleri takip edilmiştir. Biyoreaktör sisteminde 30 dakikada 2 dakika daldırma süresi ve 30 dakikada 2 dakika havalandırma süresi olacak şekilde ayarlanmıştır. *M. officinalis* bitki eksplantları 2 hafta kültürde bekletilmiş ve 2 defa alt kültüre alınmıştır.

2.2.5. Kallus Ekstrakte İşlemi

Kültür ortamında geliştirilen *M. officinalis* kallusları cam şişelerden pens yardımıyla ayrılıp, besiyerinden arındırılmak amacıyla saf sudan geçirildi. Arındırılan kalluslardan 1'er g örnek tartıldıktan sonra 10 ml etanol, metanol ve HIP eklendi. Elde edilen etanol, metanol ve HIP karışımları homojenizatörde parçalandı ve santifirüjlendi. Elde edilen süpernatantlardan toplam fenolik bileşik tayini, toplam flavonoid bileşik tayini ile antioksidan aktivite tayinin göstergesi olan DPPH ve ABTS tayinleri gerçekleştirildi.

2.2.6. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) Antioksidan Analizi

25 mg/L DPPH radikali metil alkolde çözünmesi sağlandı. DPPH çözeltisinden 4 ml ve bitki ekstratlarından 100 µL alınıp deney tüplerine aktarılıp, vorteksledi. Vorteksleme işlemi tamamlanan örnekler karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında inkübasyonu sağlandı. Bekleme

süreleri tamamlanan örneklerin 517 nm’de köre karşı absorpsanları ölçüldü (Brand-Williams vd., 1995). Örneklerin % serbest radikal süpürme analizinde aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

$$\% = [(Kontrol\ Absorbans - Örnek\ Absorbans) / Kontrol\ Absorbans \times 100]$$

2.2.7. ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)] Antioksidan Aktivite Analizi

M. officinalis kallus örneklerinin ABTS• radikal giderme aktivite tayini 7 mM değerinde hazırlanan ABTS (2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) çözeltisi ile 2,45 mM oranında hazırlanan potasyum persülfat çözeltisinin oksidasyonu sonucunda oluşturuldu ve elde edilen çözelti oda sıcaklığında 16 saat süre boyunca karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda çözelti, absorpsansı 0,7-0,8 olacak şekilde 734 nm dalga boyunda etil alkol ile seyreltildi. Etanol ile hazırlanan ABTS çözeltisinden 2 ml deney tüplerine alıp üzerine 100 µL ekstrakt eklendi. 15 dk oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletilen örneklerin absorpsanları 734 nm dalga boyunda okundu. Örneklerin ABTS radikal giderme aktivitesi aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ ABTS radikal Giderme Aktivitesi} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀= Kontrol Absorbans Değeri

A₁= Örnek veya standardın absorpsans değeri (Pellegrini vd., 2003).

2.2.8. Toplam Fenolik Madde Miktarının Analizi

Yapılan deneyde toplam fenolik madde miktarının tayini Singleton vd. (1999) tarafından uygulanan Folin-Ciocalteu metoduna göre belirlendi. Uygulanan metotta, 50 µL kallus ekstratları üzerine 500 µL Folin - Ciocalteu reaktifi cam tüplere aktarıldı. 3 dk sonunda elde edilen karışımlara % 2 oranında hazırlanan Na₂CO₃ çözeltisi 3 mL eklendi. Hazırlanan karışımlar optimum 2 saat bekletildi. Bekleme süreleri dolan çözeltilerin 760 nm dalga boyunda absorpsanları okundu. Toplam fenolik madde miktarları gallik asit çözeltisi ile çizilen kalibrasyon eğrisine bağlı olarak çıkarımı yapıldı.

2.2.9. Toplam Flavonoid Madde Miktarının Analizi

Hazırlanan kallus örneklerindeki toplam flavonoid madde miktarının saptanması Kim ve ark. (2003)’ın belirlediği yöntemle analiz edildi. Bu analiz için 200 µL kallus ekstraktı ile 300 µL %5 oranında hazırlanan NaNO₂ karıştırılıp, oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edildi. Elde edilen karışımlara % 10 oranında hazırlanan AlCl₃’den 0,3 mL, 1 M NaOH’ dan 2 mL ve 2,4 mL distile su eklenerek, homojen bir karışım olması için vorteksledi. Örneklerin absorpsans değerleri spektrofotometrede, 510 nm dalga boyuna karşı ölçümü yapıldı. (+)- katesin ile hazırlanan

kalibrasyon eğrisinde kallus ekstratlarının toplam flavonoid madde miktarları yorumlanması yapıldı.



3. BULGULAR

Bu çalışmada geçici daldırma biyoreaktör sisteminde kallus gelişimini sağlayabilmek için *M. officinalis* bitkisinin nod kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Farklı bitki büyüme düzenleyicilerinde kallus gelişiminin gözlemlendiği Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonları

Besi yeri ortamı	BAP (mg/L)	IAA (mg/L)	Picloram (mg/L)	2,4-D (mg/L)	Kallus Gelişimi
1	0.50	-	-	-	Gelişim yok
2	0.50	1.0	-	-	Gelişim yok
3	0.50	1.5	-	-	Gelişim yok
4	0.50	2.0	-	-	Gelişim yok
5	1.0	-	-	-	Gelişim yok
6	1.0	1.0	-	-	Gelişim yok
7	1.0	1.5	-	-	Gelişim yok
8	1.0	2.0	-	-	Gelişim yok
9	0.50	-	-	-	Gelişim yok
10	0.50	-	1.0	-	Gelişim var, kararma gözlendi (sağlıksız kallus)
11	0.50	-	1.5	-	Gelişim var, kararma gözlendi (sağlıksız kallus)
12	0.50	-	2.0	-	Gelişim var, kararma gözlendi (sağlıksız kallus)
13	1.0	-	-	-	Gelişim yok
14	1.0	-	1.0	-	Gelişim var, kararma gözlendi (sağlıksız kallus)
15	1.0	-	1.5	-	Gelişim var, kararma gözlendi (sağlıksız kallus)
16	1.0	-	2.0	-	Gelişim var, kararma gözlendi (sağlıksız kallus)
17	0.50	-	-	-	Kontamine gözlendi.
18	0.50	-	-	1.0	Kontamine gözlendi.
19	0.50	-	-	1.5	Kontamine gözlendi.
20	0.50	-	-	2.0	Kontamine gözlendi.
21	1.0	-	-	-	Gelişim yok
22	1.0	-	-	1.0	Gelişim gözlendi (koyu yeşil)
23	1.0	-	-	1.5	Gelişim gözlendi (koyu yeşil)
24	1.0	-	-	2.0	Gelişim gözlendi (açık yeşil)

Kallus dokusundan elde edilen metanol, etanol, HIP ekstratları ile toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivite tayinleri olan DPPH ve ABTS metodları yapılmıştır.

3.1. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Bileşikler

Tablo 3.2.'deki analiz sonuçlarında 1mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D 'de $1,98 \pm 0,01$ (mg GAE/g) değerine göre, toplam fenolik madde miktarı 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D anlamlı bir şekilde artmıştır ($p < 0,001$), 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D 'de azaldığı bulunmuştur ($p < 0,01$).

Tablo 3.2. Farklı konsantrasyonlarda gelişen *M. officinalis* kallus dokularının metanol ekstrelerindeki toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g) ve toplam flavonoid madde miktarı(mg KE/g)

Gruplar (mg/L)	Toplam Fenolik Madde Miktarı	Toplam Flavonoid Madde Miktarı
1 BAP +1 2,4-D	1,98 ± 0,01	0,22 ± 0,00
1 BAP +1,5 2,4-D	1,99 ± 0,04***	0,27 ± 0,01***
1 BAP +2 2,4-D	1,44 ± 0,04**	0,23 ± 0,00

(): p>0.05 Gruplar arasındaki farklılık değeri istatistiki açıdan önemsiz

(*): p<0.05 Gruplar arasındaki farklılık değeri istatistiki açıdan kısmen önemli

(**): p<0.01 Gruplar arasındaki farklılık değeri istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

(***): p<0.001 Gruplar arasındaki farklılık değeri istatistiki açıdan oldukça önemli

Analiz sonuçlarında 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D'de 0,22 ± 0,00 (mg KE/g) değerine göre toplam flavonoid madde miktarı 1 mg/L BAP +1,5 mg/L 2,4-D 'de yüksek miktarda bulunmuştur (p<0,001). 1 mg/L BAP +2 mg/L 2,4-D 'de artış gözlenirse de anlamlı bir sonuç bulunmamıştır (p>0,05).

Tablo 3.3.' teki analiz sonuçlarında 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D 'de 0,49 ± 0,04 (mg GAE/g) değerine göre, toplam fenolik madde miktarı 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D anlamlı bir şekilde artmıştır (p<0,001). 1 mg/L BAP +2 mg/L 2,4-D ' de ise azaldığı bulunmuştur (p<0,001).

Tablo 3.3. Farklı konsantrasyonlarda gelişen *M. officinalis* kallus dokularının etanol ekstrelerindeki total fenolik ve total flavonoid madde miktarları

Gruplar (mg/L)	Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GAE/g)	Toplam Flavonoid Madde Miktarı (mg KE/g)
1 BAP + 1 2,4-D	0,49 ± 0,04	0,38 ± 0,01
1 BAP +1,5 2,4-D	0,54 ± 0,00***	0,40 ± 0,01***
1 BAP +2 2,4-D	0,03 ± 0,01***	0,37 ± 0,01

(): p>0.05 Gruplar arasındaki farklılık değeri istatistiki açıdan önemsiz

(*): p<0.05 Gruplar arasındaki farklılık değeri istatistiki açıdan kısmen önemli

(**): p<0.01 Gruplar arasındaki farklılık değeri istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

(***): p<0.001 Gruplar arasındaki farklılık değeri istatistiki açıdan oldukça önemli

Analiz sonuçlarında 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D'de 0,38 ± 0,01 (mg KE/g) değerine göre toplam flavonoid madde miktarı 1 mg/L BAP +1,5 mg/L 2,4-D 'de yüksek miktarda artış bulunmuştur (p<0,001). 1 mg/L BAP +2 mg/L 2,4-D 'de ise düşüş gözlenirse de anlamlılık tespit edilmemiştir (p>0,05).

Tablo 3.4.' teki analiz sonuçlarında 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D'de 0,22 ± 0,01 (mg GAE/g) değerine göre toplam fenolik madde miktarı 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP +2 mg/L 2,4-D ' de ise her iki konsantrasyonda düşüş gözlenirse de anlamlılık tespit edilmemiştir (p>0,05).

Tablo 3.4. Farklı konsantrasyonlarda gelişen *M. officinalis* kallus dokularının HIP ekstrelerindeki total fenolik ve total flavonoid madde miktarları

Gruplar (mg/L)	Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GAE/g)	Toplam Flavonoid Madde Miktarı (mg KE/g)
1 BAP + 1 2,4-D	0,22 ± 0,01	0,02 ± 0,01
1 BAP +1,5 2,4-D	0,09 ± 0,02	0,04 ± 0,01*
1 BAP +2 2,4-D	0,05 ± 0,01	0,00 ± 0,04

(): p>0.05 Gruplar arasındaki farklılık değeri istatistiki açıdan önemsiz

(*): p<0.05 Gruplar arasındaki farklılık değeri istatistiki açıdan kısmen önemli

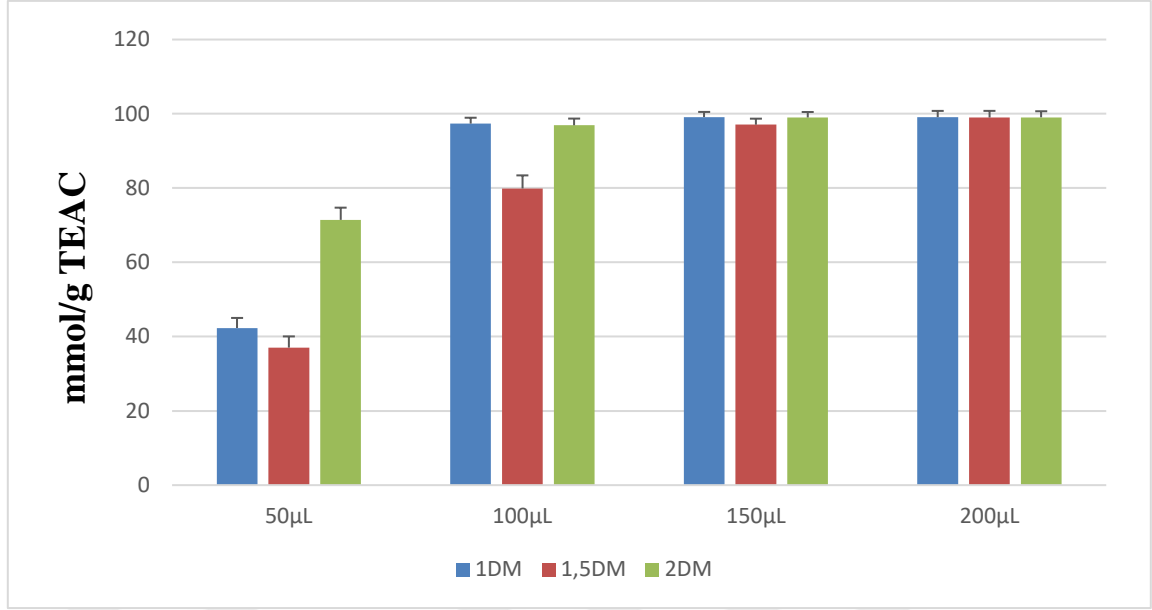
(**): p<0.01 Gruplar arasındaki farklılık değeri istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

(***): p<0.001 Gruplar arasındaki farklılık değeri istatistiki açıdan oldukça önemli

Analiz sonuçlarında 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D 'de $0,02 \pm 0,00$ (mg KE/g) toplam flavonoid madde miktarı 1 mg/L BAP +1,5 mg/L 2,4-D 'de artış gözlenip anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). 1 mg/L BAP +2 mg/L 2,4-D 'de azalma gözlenirse de anlamlı bir sonuç tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

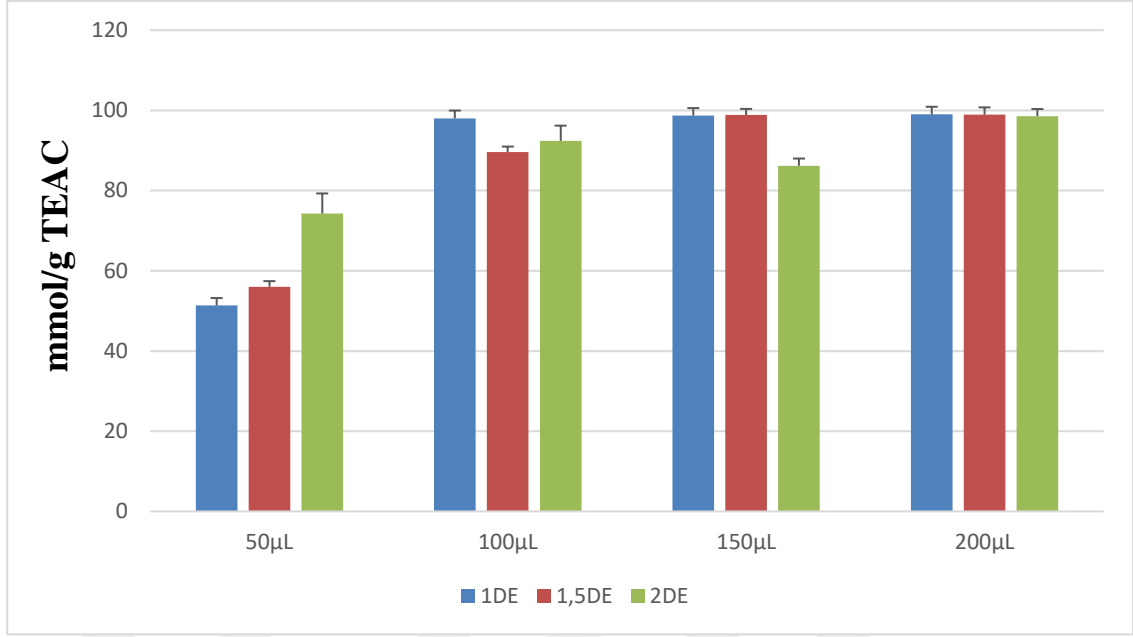
3.2. DPPH ve ABTS Antioksidan Aktiviteleri

Analiz sonuçları metanol ekstratlarının ABTS radikalini temizleme aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde; 50 µL değeri 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D olan konsantrasyonu, 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D ve 1BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarından yüksek tespit edilmiştir. 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D konsantrasyonundan düşük bulunmuştur. 100 µL değeri 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonları arasında belirgin bir fark bulunmamıştır. Buna karşı 1,5 2,4-D mg/L konsantrasyonu düşük tespit edilmiştir. 150 µL değeri 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D ve 1BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonları arasında belirgin bir fark bulunmamıştır. Buna karşı 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonu anlamlı olmasada düşük tespit edilmiştir. 200 µL değeri 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP+ 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonunda anlamlı farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 3.1).



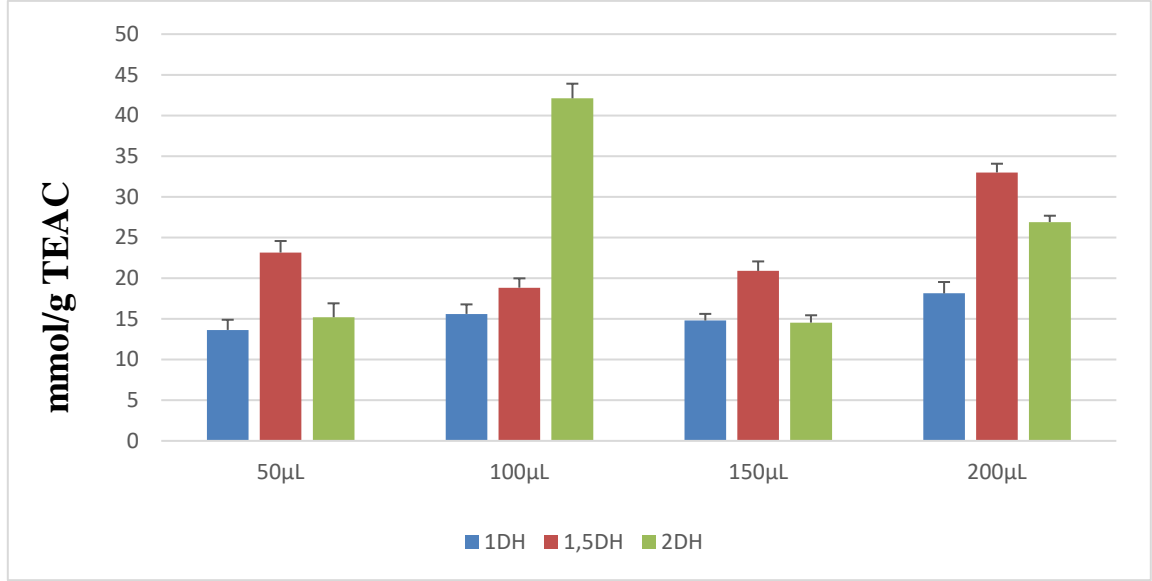
Şekil 3.1. Farklı konsantrasyonlarda gelişen *M. officinalis* kallus dokularının metanol ekstratlarının ABTS grafiği

Analiz sonuçları etanol ekstratlarının ABTS radikalini temizleme aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde; 50 µL değeri 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D olan konsantrasyonu, 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarından yüksek tespit edilmiştir. 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonuna düşük tespit edilmiştir. 100 µL değeri 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarından yüksek tespit edilmiştir. 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D mg/L konsantasyonundan düşük tespit edilmiştir. 150 µL değeri 1BAP + 1 2,4-D mg/L ve 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonları arasında belirgin bir fark bulunmamıştır. Buna karşı 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonu düşük bulunmuştur. 200 µL değeri 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 3.2).



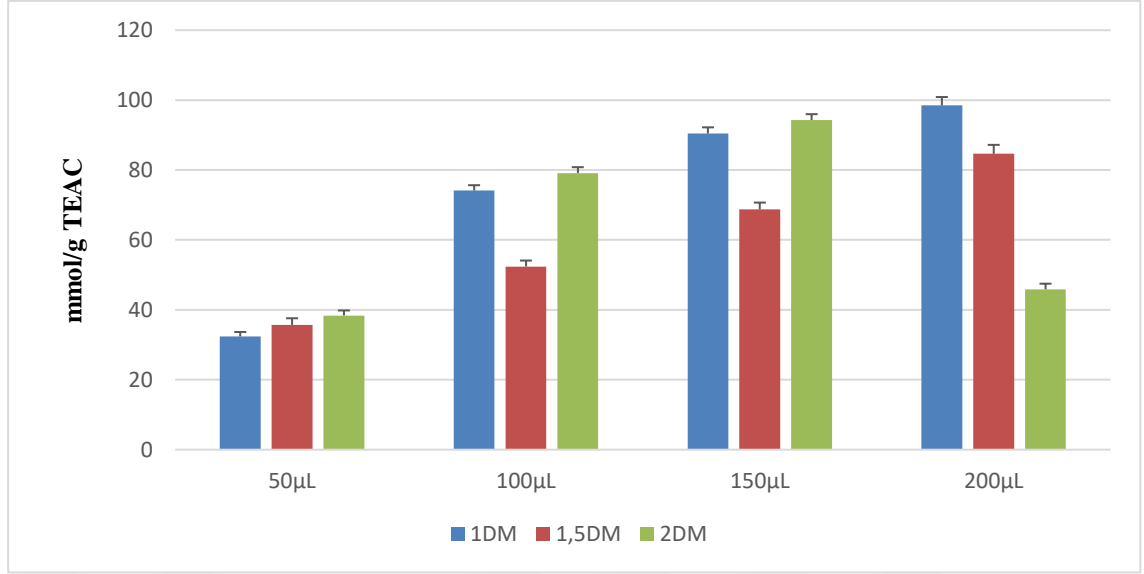
Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonlarda gelişen *M. officinalis* kallus dokularının etanol ekstratlarının ABTS grafiği

Analiz sonuçları HIP ekstratlarının ABTS radikalini temizleme aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde; 50 µL değeri 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonu, 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarından yüksek tespit edilmiştir. 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonundan düşük tespit edilmiştir. 100 µL değeri 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarından yüksek tespit edilmiştir. 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonundan düşük tespit edilmiştir. 150 µL değeri 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarından yüksek bulunmuştur. 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonları arasında belirgin bir farklılık tespit edilmemiştir. 200 µL değeri 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonu, 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D tespit edilmiştir. 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonundan düşük tespit edilmiştir (Şekil 3.3).



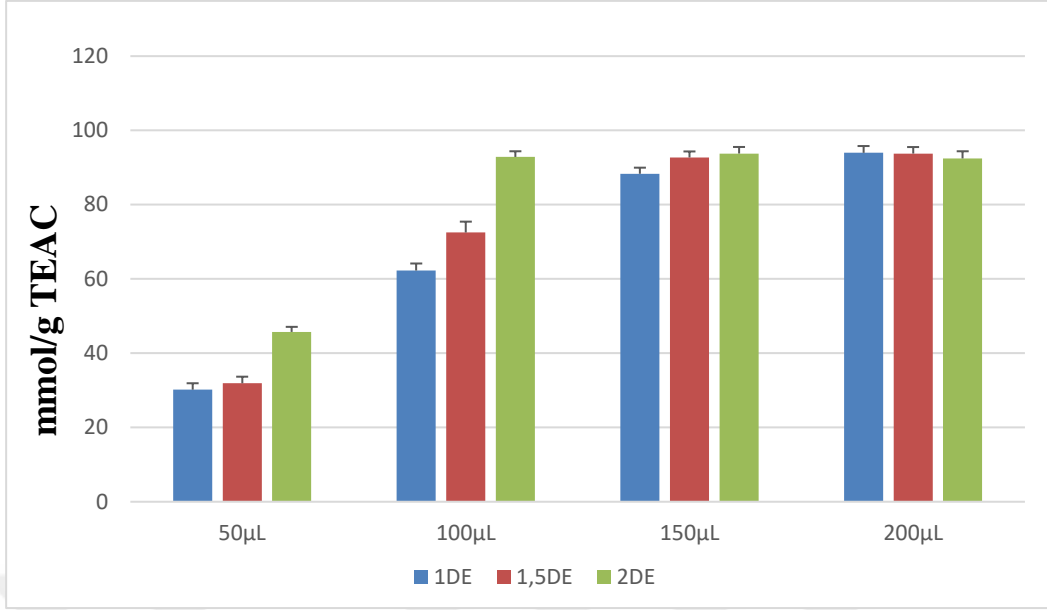
Şekil 3.3. Farklı konsantrasyonlarda gelişen *M. officinalis* kallus dokularının HIP ekstrelerinin ABTS grafiği

Analiz sonuçları metanol ekstratlarının DPPH radikalini süpürme aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde; 50 µL değeri 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonları arasında belirgin farklılık tespit edilmemiştir. 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarına kıyasla düşük tespit edilmiştir. 100 µL değeri 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarından yüksek tespit edilmiştir. 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonundan düşük tespit edilmiştir. 150 µL değeri 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarından yüksek tespit edilmiştir. 1 BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonundan düşük tespit edilmiştir. 200 µL değeri 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarından yüksek tespit edilmiştir. 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonundan düşük tespit edilmiştir (Şekil 3.4).



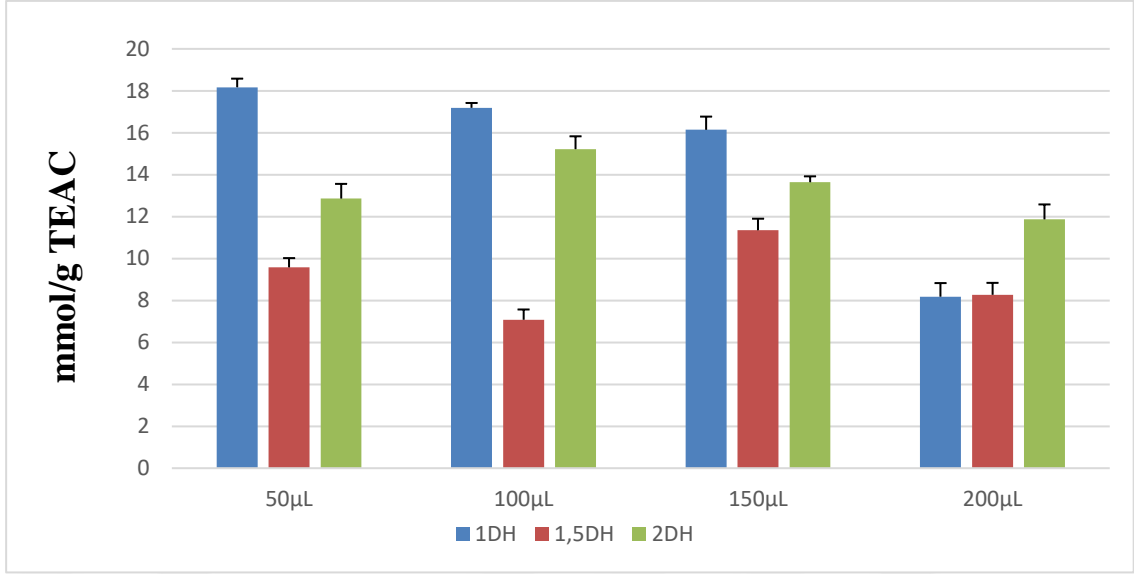
Şekil 3.4. Farklı konsantrasyonlarda gelişen *M. officinalis* kallus dokularının metanol ekstratlarının DPPH grafiği

Analiz sonuçları etanol ekstratlarının DPPH radikalini süpürme aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde; 50 µL değeri 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D olan konsantrasyonu, 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarından yüksek olduğu belirlenmiştir. 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D ile 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonları arasında belirgin farklılık tespit edilmemiştir. 100 µL değeri 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 2,4-D ve 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarından yüksek tespit edilmiştir. 1 mg/L BAP + 2 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonundan düşük olduğu belirlenmiştir. 150 µL değeri 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonları arasında belirgin bir fark tespit edilmemiştir. 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D konsantrasyonundan yüksek oldukları tespit edilmiştir. 200 µL değeri 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Farklı konsantrasyonlarda gelişen *M. officinalis* kallus dokularının etanol ekstraktlarının DPPH grafiği

Analiz sonuçları HIP ekstratlarının DPPH radikalini süpürme aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde; 50 µL değeri 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D konsantrasyonunun 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonunun 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonundan yüksek tespit edilmiştir. 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonunun 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonundan düşük olduğu tespit edilmiştir. 100 µL değeri 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D ile 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonları arasında belirgin fark tespit edilmiştir. 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonundan yüksek oldukları tespit edilmiştir. 150 µL değeri 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D konsantrasyonu 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarından yüksek olduğu tespit edilmiştir. 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonunu ve 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonundan daha düşük olduğu tespit edilmiştir. 200 µL değeri 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonunun 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarından yüksek tespit edilmiştir. 1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D ile 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonları arasında fark tespit edilmiştir. (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Farklı konsantrasyonlarda gelişen *M. officinalis* kallus dokularının HIP ekstraktlarının DPPH grafiği.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmanın amacı, ülkemiz Akdeniz bölgesinde doğal olarak yetişen *M. officinalis* (Oğul Otu) bitkisinin geleneksel mikroçoğaltım yöntemlerine alternatif olarak yeni nesil bir yöntem olan geçici daldırma biyoreaktör sistemi geliştirilmiştir.

Çalışmada besi ortamına farklı bitki büyüme düzenleyicileri eklenerek *M. officinalis* bitki eksplantları besiyerine aktarılıp kallus gelişimleri sağlanmış ve kallus dokularının farklı organik çözücülerde oluşturulan ekstraları ile toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ile antioksidan aktivite tayinleri için DPPH ve ABTS analizleri yapılmıştır. Elde edilen analiz sonuçlarında en yüksek ve en düşük değerler belirlenmiştir.

Yeni nesil doku kültürü yöntemleri ile yapılan litaretür çalışmaları araştırıldığında, bitki gelişimini teşvik eden faktörler (bitki büyüme düzenleyicileri, ışık etkisi, sıcaklık, nem, daldırma süresi, havalandırma vs.) bitkinin yapılan analizlerinde farklı sonuçlar verdiğini ortaya koymuştur.

Ziv vd. (1998), plastik kaplardan oluşan hava taşımali biyoreaktör sistemi kullanılarak birkaç bitkinin meristematik hücrelerinin çoğalmasını amaçlamışlardır. Bitkinin türüne bağlı olarak 26-30 günlük bir sürede meristem hücrelerinin biyokütlesi, 5-8 kat artmıştır. Bıçak ızgarasından yapılmış bir kesici yardımıyla meristem hücreleri mekanik olarak ayrılmıştır. Daha fazla büyümenin sağlanması amacıyla kesilmiş propagüller, agarlı ortama aktarılmıştır. Bitkinin sürgün ve yaprak gelişimini takip edildiğinde eğrelti otunda 16 hafta, patates, muz ve glayölde 12-14 hafta süresince gelişim gösterdiği gözlenmiştir. Bitkilerin mikroçoğaltımı açısından bu çalışmaya bakıldığında, büyük ölçekli sıvı kültürlerin faydalı olup olmadığı tartışılmaktadır.

Mosqueda Frómata vd. (2017), yaptıkları çalışmada gerbera bitkisinin sürgünlerini *in vitro* ortamda çoğaltmak için geçici daldırma biyoreaktör sistemini kullanarak sistemin uygulanabilirliğini değerlendirmişlerdir. 6, 8 ve 12 saat aralıklarda daldırma sıklığı, 2 saatte bir 1 dakika olacak şekilde ek havalandırma ve 14, 21, 28 ve 35 şeklindeki farklı gün sayısında sürgün kültürünün süresi gibi faktörler araştırılmıştır. 8 saatte bir daldırma ile beraber ek bir havalandırma işlemi gerçekleştirilerek, kontrole kıyasla çok daha iyi gelişmiş sürgünler üretilmiştir. Ortalama çoğalma oranına bakıldığında 9 sürgün/eksplant oluşmuştur. Sürgünlerin yüksek taze ve kuru ağırlığa sahip olmasını sağlayan ideal süre 6 saat olmasına karşın bu süre hiperhidrisiteyi arttırmıştır. 8 veya 12 saate ayarlanan daldırma frekanslarında, sürgün gelişiminde hiçbir farklılık gözlenmemiştir. 1 gün içerisinde 12 saat aralıklarla yapılan ek havalandırma, havalandırmasız kontrole kıyasla sürgün hiperhidrisitesini %31,37'den %5,24'e düşürmüştür. Bağlı su içeriği açısından düşük taze ile kuru ağırlığa sahip olan sürgünlerde %89,8'lik düşüş oluşma nedeni, 8 saatte bir ek hava beslemesi uygulanmasıdır. 28. günün sonunda 6,7 ve 35. günün sonunda 6,1 değerinde sürgün/eksplant sayısı artmıştır. IAA kullanılarak aynı

ortam ile desteklenmiş sürgünler 7 ile 14 gün sonra, aynı ortam kullanılarak ancak IAA ile desteklenmiş sürgünler, geçici daldırma biyoreaktör sisteminde köklenmesi teşvik edilmiştir.

Daungban vd. (2017), muz eksplantların her birini, 6 hafta süreyle ve 3 kültür döngüsü şeklinde 0,125 ve 0,250 mg/L tidiazuron (TDZ) ekleyerek analiz etmişlerdir. Başarılı veriler elde etmek için eksplantları 4 parçaya ayırmak ve 0,125 mg/ L TDZ ile geçici daldırma yeni nesil doku kültürü tekniğini kullanmışlardır. 3. kültür döngüsünde ise her eksplant başına 11,03'e kadar yeni sürgünle sonuçlandığını göstermişlerdir. 1. döngüde kap başına sürgün sayısı 2,08 ve 5,74 katına, 2. ve 3. döngüde ise kap başına sürgün sayısı 48 ve 132 katına çıkmıştır. Klasik doku kültüründe ekimi yapılan muzlar, kap başına daha az sürgün ve daha fazla küçük sürgün geliştirmiştir.

Welander vd. (2014), geçici daldırma biyoreaktör sistemine dayanarak oluşturulan yeni bir kültür kabı kullanarak *Digitalis lutea Purpurea*, *Echinacea purpurea* ve *Rubus idaeus'* un mikroçoğaltımı değerlendirilmiştir. *Digitalis* ve *Echinacea* en fazla sıvı ortamda yaş ağırlık kazanırken, *Rubus* yarı-katı ortamda yaş ağırlığı en fazla kazanmıştır. Kuru ağırlık bakımından ise *Digitalis*, *Echinacea* ve *Rubus* türleri kuru ağırlık benzerdir. Geçici daldırma biyoreaktör sisteminin, yapılan bu çalışmada uygun olduğu gözlenmiştir.

Gutiérrez vd. (2016), *G. angustifolia'* nın mikroçoğaltımını geçici daldırma biyoreaktör sistemlerde değerlendirip, elde ettikleri sonuçları klasik doku kültürüyle elde ettikleri sonuçlar ile karşılaştırmışlardır. Çalışmalar, gün içerisinde 3 veya 4 defa 2 dk'lık daldırma ve 3,0 mg/L benzilaminopurin (BAP) ile hazırlanan MS ile oluşturulan klasik doku kültürü kullanılmıştır. Çalışma, geçici daldırma sistemi için 20 kap oluşturulup, her bir kap için 200 ml sıvı kültür içermiştir. Bu sistemde, 6 ve 8 saatlik frekanslar oluşturulmuş ve 2 dk'lık daldırmalar gerçekleştirilmiştir. En iyi sonuçlar ise gün içinde 4 daldırma döngüsü (6 saatte bir) baz alınarak, her eksplantta 2,7 sürgünlük çoğalma ve çok daha fazla rizom büyümesi elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında; sıvı ortam yarı katı ortama kıyasla, sürgün çoğalma oranları ve rizom büyümeleri açısından daha fazla başarı göstermiştir.

Zhu vd. (2005), yaptıkları çalışmada geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanılarak elma anaçlarının sürgün gelişimini incelenmiştir. En iyi sürgün uzamasının 1,1µmol BAP ve 0,25 µmol IBA konsantrasyonunda ve en iyi sürgün çoğalmasının 4,4 µmol oranında BAP ve 0,5 µmol oranında IBA konsantrasyonundan elde edilmiştir. Daldırma sıklığı günde 16 defa ayarlanarak, sürgünde günde 8 defa çoğalma olduğu gözlenmiştir.

Gao vd. (2015), geliştirdikleri bu protokolda geçici daldırma biyoreaktör sistemi ve yarı katı kültür metodunu kullanarak, Çin su kestanesinin hem soğancık hem de sürgün gelişimini incelemişlerdir. Bu çalışmada, Çin su kestanesinin 3 ayrı türü kullanılmıştır. Geçici daldırma biyoreaktör sisteminde bu bitkinin optimum şartları gözlemlendiğinde; çoğalma oranı (36,5 kat) ve sürgün oluşturma kapasitesi (68,9) artması ve vitrifikasyon oranının düşüklüğü açısından en

iyi süre her 8 saatte bir kültür ortamına 15 dakika daldırma olarak gözlenmiştir. Sürünen köksap sürgün uçları, korm sürgün uçlarından biraz daha yüksek sürgün oluşum kapasitesine sahiptir; geçici daldırma biyoreaktör sistemlerde, 4 mg/L oranında 6-benzilaminopurin ve 0,5 mg/L oranında 1-naftalinasetik asit (NAA) içeren Murashige–Skoog (MS) ortamı kullanılarak en fazla sürgün çoğalma oranı 43,7 kat olarak elde edilmiştir. Köklenme aşamasına bakıldığında ise kök oluşturma kapasitesi, kök uzunluğu ve köklenme yüzdesi (sırayla 3,8, 8,5 cm ve %78) olarak maksimum gelişim 2.0 mg/L NAA içeren ortamla sağlandığı gözlenmiştir; ayrıca bu durum daldırma sıklığını da azaltmıştır. Diğer türdeki bitkiciklere kıyasla *E. dulcis Guiti* No. 1 sp. bitkicikleri sürünen rizom, çap ve %95 hayatta kalma oranı ile en yüksek gelişime sahip olmuşlardır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara bakılacak olursa, Çin su kestanesi fidanlarının güvenilirliği ve verimliliği açısından, geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanmanın büyük bir avantaj sağladığı gözlenmiştir.

Yenice (2010), çalışmasında geçici daldırma biyoreaktör sistemini kullanarak bitki büyüme düzenleyicilerinin su mercimeğinin üzerinde etkilerini incelemiştir. Her materyal başına bitki artışı 0,2 mg/L BAP bulunan, sukroz bulunmayan sıvı kültürde 50,44 adet, 0,05 mg/L Kinetin bulunan sıvı kültürde 57,82 adet ve 0,6 mg/L, TDZ bulunan sıvı kültürde 50,74 adet olarak gözlemlenmiştir. Protein değeri %25,5 çıkan su mercimeğinin azot analizi yapılırken Kjendahl Yöntemi kullanılmıştır. 0,5 mg/L BAP uygulanan bitkinin protein miktarında %29,18 oranında bir artış görülmüştür. Yapılan bu tez çalışmasında, geçici daldırma biyoreaktör sistemi tekniğiyle çoğaltımın su mercimeği bitkisinde protein miktarı için olumlu sonuçlandığı tespit edilmiştir.

Orhan Fedekar (2015), doğal yöntemlerle köklendirilmesi zor olan Myrobolan B (*Prunus cerasifera* L.) bitkisinin geçici daldırma biyoreaktöründe mikroçağaltım yapılması amaçlanmıştır. Yarı katı kültürde elde edilen sürgünlerde, geçici daldırma biyoreaktörü kullanılarak optimizasyonu sağlanmıştır. Geçici daldırma biyoreaktöründe daldırma süresi 1 saat 20 saniye ayarlandıktan sonra 250 ml sıvı kültüre 6 adet eksplant ekilmiş ve 40 gün alt kültüre alınmıştır. Bu ekimin sonunda 7,33 sürgün gelişimi, 14,68 ortalama sürgün artışı ve % 8,33 vitrifikasyon olarak sonuçlanmıştır. Yapılan çalışmanın sonucu değerlendirildiğinde geçici daldırma biyoreaktör sisteminin klasik kültüre kıyasla daha avantajlı olduğu görülmüştür.

Biçen (2017), yaptığı çalışmada mersin bitkisini hem geleneksel hem de yeni nesil kültürde aynı hormonları kullanmış olup yeni nesil kültürde 4 ve 8 saat daldırma sürelerini ayarlamıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda yeni nesil doku kültürünün daha avantajlı olduğunu gözlenmiştir.

Hanhineva vd. (2005), çalışmalarında çilek yaprağı eksplantlarında sürgün gelişimini geçici daldırma biyoreaktör sisteminin kullanılabilirliğini test etmişlerdir. Hem sürgün çoğaltma hem de gelişim gösteren bitkicikler alt kültüre alınması açısından geçici daldırma biyoreaktör sisteminin yarı katı ortama kıyasla daha uygun bir sistem olduğu gözlenmiştir. Geçici biyoreaktör sistemi ile geleneksel kültür ortamındaki işçilik sürelerini kıyasladıklarında, geçici biyoreaktör

sisteminin daha avantajlı olup bu işçilik süresinin yarıdan daha aza indiği gözlemlenmiştir. Çalışmada kullanılan bu yeni sistem, çilek çeşitlerinin *in vitro* ortamda çoğaltılması açısından uygun bir yöntem olduğu gözlenmiştir.

Sacco vd. (2013), *Stevia rebaudiana* Bertoni (Şeker Otu) bitkisinin geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanarak sıvı kültürleri (RITA ve Plantform biyoreaktör sistemleri) ve yarı katı (agarlı) kültürü karşılaştırmışlardır. RITA biyoreaktör sisteminde 3 saatte bir daldırma gerçekleştirilirken, PLANTFORM biyoreaktör sisteminde 8 saatte bir daldırma gerçekleştirilmiştir. PLANTFORM sistemlerde 8 saatte bir daldırmanın sürgün oluşumunda en iyi sonucu verdiği gözlemlenirken, 3 saatte bir daldırmanın eksplantta kallus ve camlaşma oluşturduğu tespit edilmiştir ve yarı katı kültüre kıyasla daha iyi sonuçlar elde etmişlerdir.

Ziv (1991), çalışmasında *Neptho lepis*, *Philodendron* ve *Gladiolus* koltuk altı tomurcuk eksplantlarının yeni nesil doku kültüründe gelişimini gözlemlemiştir. *Gladiolus* eksplantının gelişimini arttırmak amacıyla sürgün morfogenezi, tomurcuk ve protokorm üretiminde kültüre bitki büyüme düzenleyiciler eklenmiştir. Protokormlar çapı; Benzyladenin (BA), naftalenasetik asit (NAA), yüksek sükroz seviyeleri ve paclobutrazol uygulanarak 4-6 mm' ye ulaşmıştır. Meristemoid kümelerden ayrılıp agarlı kültüre aktarılan protokormlar, hem doğrudan toprağa aktarılan ve depo edilen bitkicikler hem de soğancıklar üretilmiştir. *Philodendron* eksplantları; sıvı besiyerinde bulanana paclobutrazol nedeniyle çoğalma oranı artış gösterirken, yaprağının gelişimi büyük bir oranda kısıtlanmıştır. Sıvı kültürden ayrılan tomurcuk kümeleri yarı katı kültüre aktarılıp sürgünler geliştirilmiştir. Yapılan bu çalışmanın sonucunda, protokormlar agarsız ortamda geliştirilip mikro çoğaltımın süresiz kısaltılmıştır.

Bu tez çalışmasının sonuçları değerlendirildiğinde ekimi gerçekleştiren *M. officinalis* bitkisinin nod kısımları 2500 lux floresan ışık altında, $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık altında iklimlendirme odalarında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyodundaki gelişimleri takip edilmiştir. Biyoreaktör sisteminde 30 dakika aralıklarla 2 dakika daldırma ve 2 dakika havalandırma süreleri olacak şekilde ayarlanmıştır. *M. officinalis* bitki eksplantları 2 hafta kültürde bekletilmiş ve 2 defa alt kültüre alınmıştır. Çalışmada elde edilen kallus morfolojisinden en iyi kallus gelişiminin 1BAP ve 1 2,4-D mg/L içeren besiyeri ortamı ile 1BAP ve 1,5 2,4-D mg/L içeren besiyerinde olduğu gözlenmiştir. Kallusların rengi koyu yeşil olup sert bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. 1BAP+2 2,4-D mg/L konsantrasyonunda ise renk gelişimi yeşil-sarı olarak gözlenmiş olup kallusların kırılma özelliği tespit edilmiştir. BAP ve IAA kombinasyonunda belirgin şekilde kök ve sürgün gelişimi gözlenmiş olup kallus gelişimi gözlenmemiştir. BAP ve picloram kombinasyonunda gelişim gösteren kalluslar ilerleyen süreçlerde kahverengi rengini alıp daha yumuşak ve kırılma özelliği göstererek gelişimini tamamlamadığı görülmüştür (Tekdal, 2020). Bitki büyüme düzenleyicilerinin oranları doku kültürü tekniklerinde, bitkinin gelişimi üzerine

etkileri çok önemlidir. Çoğunlukla hızlı hücre çoğalması ve kallus oluşumu, yüksek oksin düşük sitokinin oranıyla teşvik edilmektedir (Chawla and Wenzel, 1987).

Geleneksel doku kültüründe kallus oluşumuyla alakalı yapılan literatür araştırmasında;

Hamid vd. (2012), turunçgil anaçlarının kotiledon eksplantlarıyla yaptıkları çalışmada 2 mg/L oranında hazırlanmış 2,4-D konsantrasyonunun kullanıldığı ortam haricinde diğer tüm ortamlarda kallus oluşumu gözlemiştir.

Erdağ vd. (2019), *Dorystoechas hastata* bitkisi ile yaptıkları çalışmada tek başına BA ve 2,4-D konsantrasyonları kallus oluşumunu düşüğe olsa teşvik ettiği gözlenmiştir. En yüksek kallus gelişimi 1mg/L BA ve 2 mg/L 2,4-D içeren besiyerinde gözlenmiştir. Bu ortamı sırayla 1 mg/L BA ve 0,5 mg/L 2,4-D içeren besin ortamı, 1 mg/L BA ve 1 mg/L 2,4- D içeren besin ortamı ile 2 mg/L BA ve 1 mg/L 2,4- D içeren besin ortamında olduğu izlemiştir.

Franklin ve Dias (2006), *Hypericum perforatum* bitkisinin kök ve yapraklarından kallus elde etmek için yaptıkları araştırma çalışmasında da 1 mg/L BAP ve 1 mg/L 2,4-D içeren besin ortamı ile 0,5 mg/L BAP ve 0,5 mg/L 2,4-D içeren besin ortamı kullanılmış ve kallus gelişiminin olmadığı gözlenmiştir.

M. officinalis L. bitkisi ile yapılan bu tez çalışmasında nod kısımlarından alınan eksplant 1 BAP ve 1 2,4-D içeren besin ortamı, 1 mg/L BAP ve 1,5 mg/L 2,4-D içeren besin ortamı ile 1 mg/L BAP ve 2 mg/L 2,4-D içeren besin ortamlarında ekimi yapılmış ve Franklin ve Dias (2006) çalışmasının aksine kallus gelişimi gözlenmiştir. Endemik bir tür olan *Hypericum spectabilenin* bitkisinin yapraklarından 1 mg/L BAP ve 2 mg/L 2,4-D içeren besin ortamında gelişen kallus dokularının varlığı mevcut tez çalışmasının bulgularını desteklemektedir (Karakuş, 2011).

Bitkilerde sekonder metabolitler; tozlaşma, çevresel koşullara uyum sağlama, mikroorganizma, böcek vs. karşı kimyasal savunma ve diğer bitkilerle rekabet halinde olma vb. durumlarda var oldukları bilinmektedir (Vanisree vd., 2004). Bitkilerde çok az bulunur ve depolanırlar. Bitkilerin organize olmuş dokularında (çiçek, meyve ve yapraklarında) ekstraksiyonları zor elde edilirken organize olmamış kallus kültürlerinde daha kolay elde edilir (Oskay vd., 2009).

Kallus kültürleri sekonder metabolit üretiminde diğer biyoteknolojik yöntemlere kıyasla daha fazla çalışılmaktadır. Elde edilmek istenen bileşiğin miktarı, besiyerinde bulunan bitki büyüme düzenleyicileri ve temel maddelerin ilavesi ile kallus kültürü oluşturularak elde edilebilmektedir (Demir, 2018). Bu çalışmada kallus kültürü oluşturulmasının ve antioksidan kapasite tayininin belirlenmesinin amacı hem sekonder metabolit elde edilmesinde hem de izole edilmesinde önemli bir çalışma niteliği taşımaktadır.

Topdemir vd. (2018), yaptıkları geleneksel doku kültürü çalışmalarında en yüksek toplam fenolik madde içeriğinin $1,523 \pm 0,117$ mg GAE/g değerinde 1,5 mg/L 2,4-D ve 0,5 mg/L BAP içeren besin ortamında yetişen kallus dokularındaki etanol ekstresinden elde etmişlerdir. En

düşük toplam fenolik madde içeriği ise, $1,178 \pm 0,064$ mg GAE/g değeri ile 1 mg/L PIC ve 0,5 mg/L BAP içeren besin ortamında yetişen kallus etanol ekstresinden elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında en yüksek toplam fenolik madde içeriğinin $0,54 \pm 0,00$ mg GAE/g değeri ile 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonu olup bir önceki çalışmadan sitokinin konsantrasyonu ve toplam fenolik miktarı değeri olarak düşük olduğu gözlenmiştir. En düşük toplam fenolik madde içeriği $0,03 \pm 0,01$ mg GAE/g olarak 1 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonundan elde edilmiştir.

Sitokinin ya da oksin türlerinin, konsantrasyonu veya oksin/sitokinin oranı, besi yerlerine aktarılmış bitki hücrelerinin gelişiminde önemli farklılıklara yol açar (Mantell vd., 1983). Sitokininlerin etkisi incelenen türlere ve bu türlerin bitki kısımlarında farklılık göstermektedir. Kültürlerde sekonder metabolitlerin artması ve azalması bitkinin türüne göre farklılık göstermektedir (Mok vd., 1976).

Toplam flavonoid madde miktarı $4,930 \pm 0,379$ mg KE/g ile en yüksek olarak 2 mg/L PIC ve 0,5 mg/L BAP içeren besiyerinde, $2,709 \pm 0,157$ mg KE/g değeri ile en düşük olarak 1,5 mg/L 2,4-D ile 1 mg/L PIC ve 0,5 mg/L KIN içeren besiyerinde olduğu tespit edilmiştir. Yapılan mevcut çalışma da toplam flavonoid madde miktarı $0,40 \pm 0,01$ mg KE/g değeri ile en yüksek olarak 1 mg/L BAP + 1,5 mg/L 2,4-D konsantrasyonunda, en düşük değerinin $0,37 \pm 0,01$ mg KE/g olarak 1 mg/L BAP ve 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonunda gelişen kallus dokularında olduğu bulunmuştur.

Bitkilerin antioksidan aktivitelerinin tayini için ABTS aktivite ve DPPH serbest radikal süpürme yöntemleri en sık kullanılan güvenilir ve ekonomik analizlerdir (Koçak vd., 2020).

Salehi vd. (2005), yaptıkları çalışmada *Ziziphora clinopodioides* bitkisinin metanol ekstratlarının ABTS ve DPPH analizlerini incelemişler ve güçlü aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Öğretmen (2022), yaptığı çalışmada *Scilla bifolia* bitkisinin bitki sapı, soğan, çiçek ve yaprak kısımlarını kullanarak elde edilen ekstratların antioksidan aktivitelerini incelemiştir. DPPH radikali giderme tayini skapus kısmında ($94,20 \pm 0,36$) en fazla elde edilirken, soğan kısmında ($32,01 \pm 0,06$) en az elde edilmiştir. $92,65 \pm 0,27$ ve $87,41 \pm 0,34$ değerleri ise yaprak ve çiçek kısımlarından tespit etmiştir. ABTS aktivite tayinine bakıldığında bitkinin farklı kısımlarında $9,32 \pm 0,03$ ve $2,59 \pm 0,00$ $\mu\text{mol/g}$ arasında değiştiği tespit edilmiştir. Bitkinin yaprak, sap ve çiçek kısımlarının ABTS aktivite tayinine bakıldığında DPPH değerleriyle benzer olarak en yüksek ve soğan kısmında ise en düşük oranda olduğu belirlenmiştir.

Kaya (2022), yaptığı çalışmada *Helichrysum plicatum* bitki çiçeklerini farklı çözücülerle hazırlanmış ekstratların antioksidan kapasitelerini araştırmıştır. ABTS radikali giderme yönteminde, ekstratların en yüksek konsantrasyondaki etkinlikleri karşılaştırıldığında; Troloks> BHT> BHA> etanol ekstratı> aseton ekstratı> su ekstratı> kloroform ekstratı> hekzan ekstratı

olarak belirlemiştir. DPPH radikali giderme yönteminde, ekstrelerin en yüksek konsantrasyondaki aktivitelerini karşılaştırdığında; BHA> Troloks > BHA > su ekstratı> aseton ekstratı >etanol ekstratı >kloroform ekstratı >hekzan ekstratı olarak belirlemiştir. Mevcut çalışmada ise etanol, metanol ve BHT çözücüleri kullanılmıştır. ABTS radikali giderme yönteminde çözücülerle hazırlanmış ekstrelerin en yüksek aktiviteleri kıyaslandığında sırasıyla; Metanol> Etanol> HIP ekstreleri olarak tespit edilmiştir. DPPH radikali süpürme yönteminde, çözücülerle hazırlanmış ekstrelerin en yüksek aktiviteleri kıyaslandığında sırasıyla; Etanol >Metanol> HIP ekstreleri olarak tespit edilmiştir.

Ekstraksiyon işlemlerinde çözücünün polar veya apolar olması ekstraksiyon verimini etkilemektedir. Bilim insanlarının polar ve apolar çözücülerle yapmış oldukları araştırmalar sonucunda, % ekstre oranları üzerinden en etkili olanın polar çözücüler olduğunu gözlemlemişlerdir. Radikal giderme aktivitelerinin ise en iyi polaritenin apolar çözücülerden ziyade polar çözücülerde yüksek bulunduğu tespit edilmiştir. Metanol ve etanol polar çözücüler olup elüsyon etkileri polariteleri ile artmaktadır (Hayouni vd., 2007; Özcan vd., 2007).

Özcan ve Acet (2022), yaptıkları çalışmada *Lamiaceae* familyasına ait bir tür olan *Stachys macrantha* bitkisinin toprak üstü kısımlarından alınan eksplantları kullanmışlardır. Bitkiden aldıkları eksplantları metanol, etanol ve etil asetat çözücüleri ile ekstrakte ettikten sonra toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivite (ABTS, DPPH) tayinlerini incelemişlerdir. Elde ettikleri verilere göre, metanol ekstraktları, etanol ve etil asetat ekstraktlarıyla karşılaştırdıklarında aktivitelerinin belirgin derecede yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Türkmen vd. (2022), yaptıkları çalışmada metanol ve su ekstrelerinin antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerini incelemişlerdir. Çalışmada en etkili çözücünün (metanol ekstraktının % DPPH' radikali giderme aktivitesi hariç) metanol olduğunu tespit etmişlerdir. Mevcut çalışmada ise en etkili çözücünün (metanol ve apolar HIP ekstraktlarında, %DPPH radikali giderme ve toplam flavonoid madde miktarı tayini hariç) metanol olduğu tespit edilmiştir.

Mevcut çalışmada % DPPH radikali giderme ve ABTS aktivite tayin yöntemlerini ile alakalı grafikleri daha ayrıntılı incelersek; Grafik 3.1.'de konsantrasyon arttıkça metanol ekstrelerindeki ABTS radikalinin giderilmesinde de paralel olarak artış tespit edilmiştir. Grafik 3.2.'yi incelediğimizde konsantrasyon arttıkça 1mg/L BAP +1mg/L 2,4-D ve 1mg/L BAP +1,5 mg/L 2,4-D bitki büyüme düzenleyicileriyle oluşturulan kombinasyonların etanol ekstrelerindeki ABTS radikallerinin giderilmesinde de artış tespit edilmiştir. Ancak 1mg/L BAP +2 mg/L 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisinin etanol ekstrelerindeki ABTS radikallerinin giderilmesinde artış ve azalış görüldüğü tespit edilmiştir. Bu değişkenlik kullanılan ekstraktın konsantrasyonundan, kullanılan toprak ve mevsimsel farklılıktan kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Grafik 3.3. ve Grafik 3.6.'yı incelediğimizde her iki grafiğin konsantrasyonlarındaki HIP ekstrelerinin

antioksidan aktivitelerinde (ABTS ve DPPH) artış ve azalış olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni, çözücü olarak HIP' in bitki dokularında kullanımının hayvan dokularında kullanımında olduğu gibi etkili olmaması ve HIP apolar bir çözücü olduğu için polaritesinin düşük olması olarak düşünülmektedir. Grafik 3.4.' ü incelediğimizde konsantrasyon arttıkça 1mg/L BAP +1mg/L 2,4-D ve 1mg/L BAP +1,5 mg/L 2,4-D bitki büyüme düzenleyicileriyle oluşturulan kombinasyonların metanol ektrelerindeki DPPH radikallerinin süpürülmesinde de artış tespit edilmiştir. Ancak 1mg/L BAP +2 mg/L 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisinin etanol ektrelerindeki ABTS radikallerinin giderilmesinde artış gözlenirken 200 µL azalış tespit edilmiştir. Bu değişkenlik kullanılan ekstratın konsantrasyonundan, kullanılan toprak ve mevsimsel farklılıktan kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Grafik 3.5.' i incelediğimizde konsantrasyon arttıkça etanol ektrelerindeki DPPH radikalinin süpürülmesinde de paralel olarak artış tespit edilmiştir.

% DPPH radikal giderme ve toplam flavonoid madde miktarının etanolde yüksek çıkmasının polarite dışında nedenleride vardır. Bunlar; kullanılan çözücünün farklılığı, ekstrat işleminde kullanılan teknik, laboratuvar şartlarının farklılığı, ekstratın konsantrasyon farklılığı, kullanılan toprak ve iklim şartları, mevsimsel farklılıklar vs. bir çok sebebin sonucu etkilediği düşünülmektedir (Türkmen vd., 2023).

M. officinalis bitkisinin geçici daldırma biyoreaktör sistemiyle uygulanan kallus kültürü tekniği çalışmalarında antioksidan aktivite tayinleri ilk defa incelenmiştir. Sonuçların mukayese edilebileceği analitik veri mevcut değildir. Mevcut çalışmayı kıyaslayabilmek için yeni nesil doku kültürü ile araştırılan bitkilerin sürgün kök vs. (kallus hariç) kısımları ve geleneksel doku kültüründe geliştirilen Melisa ve farklı bitki türleri çalışmaları kıyaslanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada, *M. officinalis* bitkisinin geçici daldırma biyoreaktör sistemi ile mikroçoğaltımı gerçekleştirilmiş olup bitki doğal ortamından ve geleneksel doku kültürü (yarı-katı kültür) ortamından daha kısa sürede ve daha fazla sayıda üretilmiştir. Geleneksel doku kültüründe bitki dokularının besi yeriyle sürekli temas etmesiyle bitkide hiperhidrasyon (vitrikasyon) gibi sorunlar çok sık ortaya çıkmış olsa da yeni nesil doku kültüründe yapılan çalışmalarda bitki besi ortamıyla sürekli temas halinde olmadığı için bitki dokularında daha az hiperhidrasyon görülmektedir (Niemenak vd., 2008). Geleneksel doku kültüründe her bitkinin gelişimini teşvik eden faktörler (sıcaklık, ışık, nem vs.) farklı ve çok önemlidir. Yeni nesil doku kültüründe ise optimum koşulları sağlamak için bu faktörlere ek olarak her bitki için daldırma ve havalandırma sürelerinin optimizasyonunu sağlamak gerekir. Yapılan literatür araştırmalarında, melisa bitkisi ile alakalı geleneksel doku kültürü çalışmaları yapılsa da yeni nesil doku kültürü ile alakalı bir çalışma yapılmamıştır. Yapılan bu çalışmayla geleneksel doku kültürüne alternatif olarak yeni nesil doku kültürü çalışmalarının gelişimi amaçlanmış olup yapılacak yeni çalışmalara katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

- Başak, S. Ş. ve Candan, F. (2008). *Lallemantia canescens* (L) Fisch & Mey bitkisinin ve kallus doku kültürünün antioksidan aktivitesi. ITU Journal Series C: Basic Sciences, 6(1).
- Becerem, (2013). P. *Daucus Carota* SSP. sativus var. atrorubens alef (Siyah havuç) hipokotilinden kallus üretimi ve antioksidan tayini (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Biçen, B. (2017). Mersin Bitkisinin (*Myrtus communis* L.) Klasik ve Yeni Nesil Doku Kültürü Teknikleri ile Çoğaltılması ve Köklendirilmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bürün, B. (2021). Bitki Biyoçeşitliliğinin Korunmasında Biyoteknolojinin Kullanımı Ve Türkiye'deki Çalışmalar. Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri Ve Biyoteknoloji, 10(1), 1-16.
- Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL (1998) the aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharmaceutics Acta Helvetiae*, 72: 301-305.
- Cengiz, M. (2018). Bazı turunçgil genotiplerinin klasik ve yeni nesil doku kültürü teknikleri ile mikroçoğaltımı ve genetik kararlılığının belirlenmesi (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Chawla, H. S. and Wenzel, G. (1987). Regeneration potential of callus from wheat and barley.
- Croteau, R., Kutchan, T. M. and Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- Daungban, S., Pumisitapon, P., Topoonyanont, N. and Poonnoy, P. (2017). Effects of explants division by cutting, concentrations of TDZ and number of sub-culture cycles on propagation of 'Kluai Hom Thong' banana in a temporary immersion bioreactor system. *Thai Journal of Science and Technology*, 6(1), 89-99.
- Davis, P. (1988). *Aromatherapy-an AZ*: CW Daniels, Saffron Walden, UK, citing Naves Natural Perfume Materials. NY Reinhold Publ, 14(6), 452-456.
- Demir, E. (2018). *Aksenik juvenil sakız ağacı (Pistacia lentiscus L.) eksplantlarından kallus kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonu* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Encalada, M. A., Hoyos, K. M., Rehecho, S., Berasategi, I., de Ciriano, M. G. Í., Ansorena, D., Astiasaran, I., Blasco, I. N., Cavero R.Y. and Calvo, M. I. (2011). Anti-proliferative effect of *Melissa officinalis* on human colon cancer cell line. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(4), 328-334.
- Erçetin, T. (2013). *Arnebia densiflora* Ledeb. Bitkisinde bitki doku kültürü metotları ile şikonin ve türevlerinin üretilmesi.
- Erdağ, B., Emek, Y. ve Aydoğan, S. K. (2019). *Dorystoechas hastata* Bitkisinde Eksplant Tipi ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerine Bağlı Kallus Gelişimi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (16), 367-373.
- Franklin, G. and Dias, A. C. P. (2006). Organogenesis and embryogenesis in several *Hypericum perforatum* genotypes. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42, 324-330.
- Gao, M., Jiang, W., Wei, S., Lin, Z., Cai, B., Yang, L., Lou, C., He, X., Je, T. and Chen, L. (2015). High-efficiency propagation of Chinese water chestnut [*Eleocharis dulcis* (Burm. f.) Trin. ex Hensch] using a temporary immersion bioreactor system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), 121, 761-772.
- Gutiérrez, L. G., López-Franco, R. and Morales-Pinzón, T. (2016). Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) using a temporary immersion system RITA®. *African Journal of Biotechnology*, 15(28), 1503-1510.
- Gündeşli, M. A., Korkmaz, N. ve Okatan, V. (2019). Polyphenol content and antioxidant capacity of berries: A review. *International Journal of Agriculture Forestry and Life Sciences*, 3(2), 350-361.

- Hamid, B., Ouiam, C., Dambier, D. ve Froelicher, Y. 2012. Mise au point des conditions de calogènèse, caulogènèse et rhizogènèse chez les porte-greffes d'agrumes à partir d'épicotyle: cas du citrange Troyer. *J Appl Biosci* 60, 4375-4387.
- Hanhineva, K., Kokko, H. and Kärenlampi, S. (2005). Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41, 826-831.
- Hasan Ali Dagman, F. (2019). Bazı meyve anaçlarının klasik doku kültürü ve yeni nesil geçici daldırma biyoreaktör sistemi ile mikroçoğaltımı (Doctoral dissertation, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana).
- Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M. and Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food chemistry*, 105(3), 1126-1134.
- Heidar, M., Elmira, S. and Hojat, M. (2010). Investigation of antioxidant capacity of *Melissa officinalis* L. essential oils. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(14), 1391-1395.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Hürkan, Y. K. (2020). Bitki Biyoteknolojisinde Doku Kültürü Yöntemleri. Tarımsal ve Endüstriyel Biyoteknoloji Uygulamaları, K. Hürkan, Ed.. Ankara, Türkiye: IKSAD Publishing House, 92-93.
- Hürkan, Y. K. (2021). Bitki Doku Kültürü Besiyerine Eklenen Bazı Önemli Organik Ekstraktlar Üzerine Derleme. *Environmental Toxicology and Ecology*, 1(1), 1-7.
- Ibn Beytar, Z. (2001). Al-Jamee Le-Mofradaat al-Adwiah wal-Aghziyah (Comprehensive Book in Simple Drugs and Foods). Beirut: Dar-Al-Kotob Al-ilmiah, 467.
- Janina, M. S. (2003). *Melissa officinalis*. *The Int. J. Aromather*, 10, 132-139.
- Jorjani, E. (1976). Zakhireye Kharazmshahi (Treasure of the Khwarazm Shah). Entesharat-e Bonyade Farhang-e Iran, Tehran [in Persian].
- Karabakan, B. (2017). Aspir bitkisinde ekim öncesi hidropriming uygulamalarının fizyolojik ve biyokimyasal etkileri (Master's thesis, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi).
- Karakuş, P. (2011). Güneydoğu Anadolu bölgesinde yetişen ve endemik bir tür olan *Hypericum spectabilen*in *in vitro* mikroçoğaltım yollarının araştırılması (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Karataş, İ. (2013). Siyah havuç (*Daucus carota*) kallus ve hücre süspansiyon kültüründe antosiyanin üretimine UV-C stresinin ve riboflavinin etkilerinin belirlenmesi.
- Kaya, E. (2022). *Helichrysum plicatum* Çiçeklerinin Su, Etanol, Aseton, Kloroform ve Hekzan Ekstrelerinin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(2), 840-849.
- Kim, D. O., Jeong, S. W. and Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food chemistry*, 81(3), 321-326.
- Koçak, Y., Oto, G., Meydan, İ. ve Seçkin, H. (2020). Van Bölgesinde Yetişen *Allium schoenoprasum* L. Bitkisinin Toplam Flavonoid, DPPH Radikal Söndürme, Lipid Peroksidasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 30(1), 147-155.
- Laura, A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J. and Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic compounds. In *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (pp. 253-271). Woodhead publishing.
- Mantell, S. H., Pearson, D. W., Hazell, L. P. and Smith, H. (1983). The effect of initial phosphate and sucrose levels on nicotine accumulation in batch suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Reports*, 2, 73-77.

- Maurizio, L., Roncasaglia, R., Bujazha, D., Baileiro, F., da Silva, D. C. and Ozudogru, E. A. (2015). Improvement of shoot proliferation by liquid culture in temporary immersion. In 6th International ISHS Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants (pp. 19-24).
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. and Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science* (London, England: 1979), 84(4), 407-412.
- Mok, M. C., Gabelman, W. H. and Skoog, F. (1976). Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Daucus carota* L.
- Moradkhani, H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri, B., Sadat-Hosseini, M., Fayazi-Barjin, A. and Meftahzade, H. (2010). *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(25), 2753-2759.
- Mosqueda Frómata, O., Escalona Morgado, M. M., Teixeira da Silva, J. A., Pina Morgado, D. T. and Daquinta Gradaille, M. A. (2017). *In vitro* propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. in a temporary immersion bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 129, 543-551.
- Niemenak, N., Saare-Surminski, K., Rohsius, C., Ndoumou, D. O. and Lieberei, R. (2008). Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant cell reports*, 27, 667-676.
- Orhan Fedakar, S. (2015). Myrobolan b erik kök anacının (*Prunus cerasifera* L.) sıvı kültürlerde büyük ölçekte mikroçoğaltımı.
- Oskay, M., Oskay, D. and Kalyoncu, F. (2009). Activity of some plant extracts against multi-drug resistant human pathogens.
- Öğretmen, Ö. Y. (2022). *Scilla bifolia* L.(orman sümbülü) bitki kısımlarının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 7(1), 9-14.
- Özcan, K. ve Acet, T. (2022). *Stachys macrantha* (K. Koch) Stearn'ın biyolojik aktivitesinin belirlenmesi. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 11(1), 156-163.
- Özcan, M.M., Baydar, H., Sağdıç, O. ve Ozkan, G. (2007). Türkiye'de ticari açıdan önemli Lamiaceae familyasına ait baharat veya çeşni olarak kullanılan bitkilerin fenolik bileşenleri ile antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi. TÜBİTAK Projesi. No:TOGTAG-3319. Konya. Türkiye.
- Özkök, A. O. ve Yalçın, B. (2022). Effects of antioxidant use on semen storage in honey bees. *International Journal of Science Letters*, 4(1), 183-189.
- Ozturk, A., Unlukara, A., Ipek, A. ve Gurbuz, B. (2004). Effects of salt stress and water deficit on plant growth and essential oil content of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Pak. J. Bot.*, 36(4), 787-792.
- Pellegrini, N., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. and Serafini, M. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *The Journal of nutrition*, 133(9), 2812-2819.
- Sacco, E., Mascarello, C., Pamato, M., Musso, V. and Ruffoni, B. (2013). Evaluation of temporary immersion system for *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. In VIII International Symposium on *in vitro* Culture and Horticultural Breeding 1083 (pp. 327-334).
- Shahidi, F. and Zhong, Y. (2007). Measurement of antioxidant activity in food and biological systems.
- Shakeri, A., Sahebkar, A. and Javadi, B. (2016). *Melissa officinalis* L.–A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology*, 188, 204-228.
- Salehi, P., Sonboli, A., Eftekhari, F., Nejad-Ebrahimi, S. and Yousefzadi, M. (2005). Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* (B. OISS.) R. ECH. f. from Iran. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 28(10), 1892-1896.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.

- Sulusoglu, M. (2014). Phenolic compounds and uses in fruit growing. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 1(Özel Sayı-1), 947-956.
- Taşkara, E. G. (2021). Kabak (*Cucurbita pepo* L.) Bitkisinin Biyoreaktör Sisteminde Mikroçoğaltımı ve Genotoksik Hasarın Değerlendirilmesi
- Tekdal, D. (2020). Bezelye (*Pisum sativum* L.) Bitkisinin Organogenez Yöntemi ile Rejenerasyonu.
- Topçu Bayram, Ö. (2010). Oğulotu (*Melissa officinalis* L.) genotiplerinin doku kültürüne yanıtlarının belirlenmesi (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Topdemir, A., Okutan, T., Kırmızıyaka, G. ve Yılmaz, Ö. (2023) Naftalin Asetik Asit, 6-Benzilaminopürin ve İndol-3-Bütirik Asit Kombinasyonlarının *Actinidia deliciosa* Kallus Gelişimi Üzerine Biyokimyasal Bir Araştırma. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 27(2), 249-260.
- Topdemir, A., Nazmi, G. Ü. R. ve Demir, Z. (2018). *Melissa officinalis* L. kallus kültürlerinin antoksidan özellikleri. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 1(1), 12-15.
- Topdemir, A., Gür, N. ve Buran, A. (2019). Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) bitkisi kallus kültürlerinin toplam fenolik ve flavonoid miktarının tespiti.
- Türkmen, F. U., Koyuncu, G., Önalın, F. E. S. ve Erol, Ü. H. (2023). Kilis' te Sebze Olarak Tüketilen *Erodium cicutarium* (L.) L'Hér.'un Metanol Ekstraktının Antioksidan ve Antibakteriyal Aktiviteleri, Fenolik Bileşimi ile Aroma Bileşiklerinin Belirlenmesi. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 13(4), 1460-1475.
- Türkmen, F. U., Önalın, F. E. S. ve Takcı, H. A. M. (2022). Nar kabuklarının su ve metanol ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin incelenmesi. *Akademik Ziraat Dergisi*, 11(2), 363-372.
- Umarusman, M. A., Şimşek, Ö., Biçen, B., Serçe, S. ve Kaçar, Y. A. (2020). Farklı Böğürtlen (*Rubus fruticosus* L.) Çeşitlerinin Klasik ve Yeni Nesil Doku Kültürü Teknikleri ile Mikroçoğaltım Olanaklarının Araştırılması. *Alatarım*, 19(2), 75-84.
- Vanisree, M., Lee, C. Y., Lo, S. F., Nalawade, S. M., Lin, C. Y. and Tsay, H. S. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin*, 45(1), 1-22.
- Welander, M., Persson, J., Asp, H. and Zhu, L. H. (2014). Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 179, 227-232.
- Welander, M., Sayegh, A., Hagwall, F., Kuznetsova, T. and Holefors, A. (2016). Technical improvement of a new bioreactor for large scale micropropagation of several *Vaccinium cultivars*. In XI International Vaccinium Symposium 1180 (pp. 387-392).
- Yenice, Z. (2010). Geçici daldırma sistem biyoreaktörlerle su mercimeği (*Lemna minor* L.) bitkisinin *in vitro* çoğaltımı (Master's thesis, Biyoteknoloji Enstitüsü).
- Zárate, R., el Jaber-Vazdekis, N. and Verpoorte, R. (2013). Metabolic engineering of plant cellular metabolism: methodologies, advances, and future directions. In *Biotechnology for medicinal plants* (pp. 359-393). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Zhu, L. H., Li, X. Y. and Welander, M. (2005). Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, 253-261.
- Ziv, M. (1991). Morphogenic patterns of plants micropropagated in liquid medium in shaken flasks or large-scale bioreactor cultures. *Israel Journal of Plant Sciences*, 40(2), 145-153.
- Ziv, M., Ronen, G. and Raviv, M. (1998). Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants. *in vitro cellular and developmental biology*. Plant, 152-158

ÖZGEÇMİŞ

Rabia ÖZTÜRK

[Redacted]

[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]

[Redacted]

-
- [Redacted]
 - [Redacted]
 - [Redacted]
 - [Redacted]

[Redacted]

[Redacted]	[Redacted]
------------	------------