



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Doktora Tezi

**BİYOREAKTÖRLER İLE YERLİ BİTKİSEL GEN
KAYNAKLARINDAKİ BAZI SEKONDER METABOLİTLERİN
DOKU KÜLTÜRÜNDE ÜRETİLMESİ**

Berk BAŞTUĞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Botanik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Tamer ÖZCAN**

**II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Özge KARAKAŞ METİN**

Aralık, 2022

İSTANBUL

Bu çalışma, 21.12.2022 tarihinde aşığıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Botanik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Tamer ÖZCANI(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Gülşah ÇOBANOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Prof. Dr. Gülriz BAYÇU KAHYAOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Şener AKINCI
Marmara Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakülte

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FDK-2018-29537 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Çalışmalarımın başından beri karşılaştığımız tüm zorluklara rağmen çalışmalarımı destekleyen, motivasyon sağlayan, bilgi ve birikimi ile bana yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Tamer ÖZCAN'a

Doktora çalışmamı en başından beri çalışmalarımı teşvik ederek, her aşamada bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek sürekli destekleyen değerli hocam Doç. Dr. Özge KARAKAŞ METİN'e

Öğretici ve destekleyici yardımlarını benden esirgemeyen ve çalışmalarımda beni teşvik eden hocalarım Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ ve Prof. Dr. Gülşah ÇOBANOĞLU'na

Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan arkadaşlarım Yusuf Can GERÇEK, Hande MORGİL, Yiğit Sabri ÜNLÜ, Kadir BOZTAŞ, Almıla ÇİFTÇİ, Kayhan DEREÇİK, Barboros MÜLAYİM, Seran KIRKINCI, Fatma Nur BAŞTÜRK, Kemal ALÇIN'a dostluklarından dolayı çok teşekkür ederim.

Çalışmalarıma verdikleri destekten ötürü Zeytinburnu Tıbbi ve İtri Bahçesi'ne ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, başta genel müdürüm Şemsi Sina DEMİRTAŞ olmak üzere, tüm ANT MEDİKAL ailesine içtenlikle teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan, ilgi, sevgi ve desteklerini her zaman gösteren babam Ruhi BAŞTUĞ, annem Necla BAŞTUĞ ve kardeşim Mert BAŞTUĞ 'a her şey için teşekkür ederim.

Hayatımın en zorlu zamanlarında yanımda olan, beni motive eden, bana gösterdiği sabrı, sevgisi ve saygısı ile yaşama sevincim olan, desteği her an gösteren ve göstermeye devam eden hayat arkadaşım, eşim Gülçin GÜNGÖR'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

Aralık 2022

Berk BAŞTUĞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. BALLIBABAGİLLER (<i>LAMIACEAE</i>) FAMILİYASI	3
2.2. TIBBİ ADAÇAYI (<i>SALVIA OFFICINALIS</i> L.) BİTKİSİ.....	3
2.3. BİBERYE (<i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> L.) BİTKİSİ	4
2.4. BİTKİ SEKONDER METABOLİTLERİ.....	6
2.4.1. Terpenler.....	8
2.4.2. Alkaloidler	8
2.4.3. Fenolik Bileşikler	9
2.5. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ	10
2.6. BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİ	12
2.7. KALLUS KÜLTÜRÜ	14
2.8. SIVI KÜLTÜRLER VE GEÇİCİ DALDIRMA SİSTEMİ (TİS) BİYOREAKTÖRLERİ	14
2.9. ELİSİTÖRLER VE ELİSİTASYON	17
2.10. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	18
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	20
3.1. BİTKİSEL MATERYALİN ELDESİ.....	20
3.2. YÖNTEM.....	20
3.2.1. Çalışma Yapılan Laboratuvar ve Ortam.....	20
3.2.2. Örneklerin Sterilizasyonu	21
3.2.3. Eksplantların Kültüre Alınması.....	21
3.2.3.1. Ön Denemeler.....	21

3.2.3.2. <i>Salvia officinalis</i> L. Bitksininden Elde Edilen Eksplanların Kültüre Alınması	22
3.2.4. Ekstraksiyon	25
3.2.5. Analiz	25
3.2.5.1. Toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesi	26
3.2.5.2. Toplam Flavonoid Madde miktarlarının belirlenmesi	27
3.2.5.3. Toplam Antioksidan Madde Miktarlarının belirlenmesi	27
4. BULGULAR.....	29
4.1. ÖN DENEMELER.....	29
4.2. TIBBİ ADAÇAYI (<i>SALVIA OFFICINALIS</i> L.) BİTKİSİNDEN KALLUS KÜLTÜRÜ ELDESİ	30
4.3. FİTOKİMYASAL ANALİZLER	32
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	36
KAYNAKLAR.....	44
EKLER	49
ÖZGEÇMİŞ	51

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1: Sekonder metabolitlerin sınıflandırılması.....	8
Şekil 2: SETIS biyoreaktör sisteminin evreleri.....	16
Şekil 3: Elisitörlerin sınıflandırılması (Naik ve Al-Khayri, 2016).	17
Şekil 4: Zeytinburnu Tıbbi ve İtri Bitkiler Bahçesi'nden tedarik edilen <i>Salvia officinalis</i> L. ve <i>Rosmarinus officinalis</i> L. fideleri.....	20
Şekil 5: K1 besiyerinde ilk kültüre alınan <i>Salvia officinalis</i> L. eksplantları görünüşleri.	23
Şekil 6: K1 besiyerinde kültüre alınan <i>Salvia officinalis</i> L. eksplantlarının 3 hafta sonundaki görüntüleri.....	23
Şekil 7: K1 besiyerinde alt kültüre alınmış <i>Salvia officinalis</i> L. kallusları.....	23
Şekil 8: Biyoreaktör sistemine aktarılacak ve çalışmalara devam edilebilecek kallus boyutlarının görseli.....	24
Şekil 9: SETIS model geçici daldırma sistemi (TIS) biyoreaktörünün genel görünümü.	24
Şekil 10: F1 (A), F2 (B), F3 (C) ve FB1 (D) besiyerlerinde 8 hafta sonunda kallus gelişimi gözlenmeyen örnekler.....	29
Şekil 11: S1 (A), S2 (B), S3 (C) besiyerlerinde 8 hafta sonunda kallus gelişimi	29
Şekil 12: K1 besiyerinde gelişimleri uygun görülen <i>Salvia officinalis</i> L. (A ve B) ve <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (C ve D) kallusları.....	30
Şekil 13: K1 besiyerinde <i>Salvia officinalis</i> L. kalluslarının 3. (A), 4. (B), 7. ve 10. haftalardaki gelişimi.	30
Şekil 14: Biyoreaktör uygulamalarında K1 besiyerinin sıvı formunda <i>Salvia officinalis</i> L. eksplantlarından elde edilen kalluslarının 2. (B) ve 4. (C) haftalardaki gelişimi ve biyoreaktörün genel görünümü (A).	31
Şekil 15: Çeşitli aşamalarda katı kültürlerde karşılaşılan kontaminasyonların görünümü	31
Şekil 16: Çalışmalar sırasında gözlemlenen doku kararması için örnek görüntüsü.....	32
Şekil 17: Ekstraktların analizi sonucunda toplam fenolik maddelerin karşılaştırılması.	33

Şekil 18: Ekstrakların analizi sonucunda toplam flavonoid maddelerin karşılaştırılması.	33
Şekil 19: Ekstrakların CUPRAC yöntemi ile analizi sonucunda toplam antioksidan maddelerin karşılaştırılması.....	34
Şekil 20: Ekstrakların CERAC yöntemi ile analizi sonucunda toplam antioksidan maddelerin karşılaştırılması.....	35
Şekil 21: Biyoreaktör çalışmalarına uygun görülmeyen kırılğan (Tip 2) formatta ve beyaz renkte kalluslar (A ve B), çalışmalara uygun görülen kompakt (Tip 1), yeşil veya koyu yeşil renkte kalluslar (C ve D).	37
Şekil 22: <i>Salvia officinalis</i> L. kalluslarının katı besiyerinde (A) ve TIS biyoreaktöründe 4 haftalık kültür sonundaki görünümü.	38
Şekil 23: Kontrol Petri ve JA Biyoreaktör örneklerinin toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan miktarlarının karşılaştırılması	42

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1: <i>Salvia officinalis</i> L. taksonomisi.	4
Tablo 2: <i>Rosmarinus officinalis</i> L. taksonomisi.	5
Tablo 3: Ticari değeri yüksek olan bazı sekonder metabolitler.	6
Tablo 4: Fenolik bileşiklerin içerdikleri karbon sayılarına göre sınıflandırılması.	9
Tablo 5: Bitki büyüme düzenleyicilerinin doku kültüründeki etkileri	13
Tablo 6: Murashige & Skoog (1964) mikro ve makro element, Gamborg B5 vitamin formülasyonlarının içeriği.	21
Tablo 7: Öndenemelerde kullanılan besiyerlerinin kısa kodları ve içerikleri.	22
Tablo 8: Çevre, Gıda ve Enstrümantal Analiz Laboratuvarında bulunan ve çalışmalarda kullanılan altyapı/ekipmanlar.	25

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

%	: Yüzde
±	: Tolerans payı
µl	: Mikrolitre
µmol	: Mikromol
°C	: Santigrad derece
cm	: Santimetre
g	: Gram
mg	: Miligram
mmol	: Milimol
nm	: Nanometre

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

TIS	: Geçici daldırma sistemi
M	: Molarite
Rpm	: Dakika devir sayısı
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyicileri
MeJa	: Metil Jasmonat
IBA	: Indole 3-butyric acid

ÖZET

DOKTORA TEZİ

BİYOREAKTÖRLER İLE YERLİ BİTKİSEL GEN KAYNAKLARINDAKİ BAZI SEKONDER METABOLİTLERİN DOKU KÜLTÜRÜNDE ÜRETİLMESİ

Berk BAŞTUĞ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Tamer ÖZCAN

II. Danışman : Doç. Dr. Özge KARAKAŞ METİN

Bu tez çalışması kapsamında yerli gen kaynaklarında mevcut olan *Rosmarinus officinalis* L. ve *Salvia officinalis* L. eksplantlarından kallus kültürünün oluşturulmasını takiben *Salvia officinalis* L. kalluslarında TIS biyoreaktörü ve jasmonik asit uygulaması ile sekonder metabolit üretiminin artırılması amaçlanmıştır. Amaç doğrultusunda farklı bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonlarına sahip besiyerlerinde ön denemeler yapılmıştır. Ön denemelerde TIS biyoreaktör sistemine en uygun kallus oluşumu elde edilen besiyeri formülasyonu ile sistemin optimizasyonu yapılmıştır. Ön denemeleri ve optimizasyonu takiben *Salvia officinalis* L. eksplantlarından katı kültürde kallus kültürü oluşturulmuştur. Elde edilen kalluslarda, sekonder metabolit içeriğinin artırılması amacıyla jasmonik asit uygulanmış katı besiyeri ve TIS biyoreaktöründe, jasmonik asit uygulanmamış TIS biyoreaktöründe kültüre alınmıştır. Kültür süresinin sonunda kalluslardan elde edilen ekstraktlar toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan madde miktarları tespit edilerek, ilgili veriler karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilere göre TIS biyoreaktör yöntemi ve jasmonik asit uygulamalarının *in vitro* kültür koşullarında, klasik *in vitro* kültür yöntemlerine göre sekonder metabolit içeriğini arttırdığı ve sekonder metabolit üretimi için kullanılabileceği belirlenmiştir.

Aralık 2022, 65 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Salvia officinalis* L., bitki doku kültürü, geçici daldırma sistemi
biyoreaktörleri, jasmonik asit



SUMMARY

Ph.D. THESIS

PRODUCTION OF SOME SECONDER METABOLITS FROM NATIVE PLANT GENETIC RESOURCES IN TISSUE CULTURES BY BIOREACTORS

Berk BAŞTUĞ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Tamer ÖZCAN

Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Özge KARAKAŞ METİN

Within the scope of this thesis, it was aimed to increase the production of secondary metabolites by the application of TIS bioreactor and jasmonic acid in the callus of *Salvia officinalis* L. following the formation of callus culture in the TIS bioreactor in *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L.. For this purpose, preliminary experiments were carried out on media with different plant growth regulator concentrations. In the preliminary trials, the system was optimized with the medium formulation in which the most suitable callus formation was obtained for the TIS bioreactor system. Following preliminary experiments and optimization, callus culture was established the solid culture of *Salvia officinalis* L. from explants. In order to increase the secondary metabolite content, the obtained calluses were cultured in a solid medium and TIS bioreactor with jasmonic acid, and in a TIS bioreactor without jasmonic acid. At the end of the culture period, the amounts of total phenolic, flavonoid and antioxidants of the extracts obtained from the calluses were determined and the relevant data were compared. According to the data obtained, it was determined that the TIS bioreactor method and jasmonic acid applications increased the secondary metabolite content compared to classical in vitro

culture methods and could be used for secondary metabolite production under in vitro culture conditions.

December 2022, 65 pages.

Keywords: *Salvia officinalis* L., plant tissue culture, temporary immersion system bioreactors, jasmonic acid



1. GİRİŞ

İnsanlık tarihi boyunca bitkiler yiyecek, hayvan yemi, koku verici, tatlandırıcı ve tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Bazı bitkilerden tekstil lifi üretimi yapılırken, çok sayıda tür süs bitkisi olarak değerlendirilmekte, buna ek olarak pek çok bitkiden de içerdikleri kimyasallar sebebiyle ilaç elde edilmektedir. Türkiye’de tedavi amacıyla kullanılan takson adedinin en az 500, dünyada ise 100.000 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Günümüz teknolojisi ile söz konusu bitkilere bu özellikleri kazandıran kimyasal bileşiklerin bir kısmı bilimsel olarak tespit edilmiş olup, çalışmalar endüstriyel ölçekte üretim ve yararlanmaya odaklanmıştır. Günümüzde birçok modern ilaç, doğrudan veya dolaylı olarak bitkisel kaynaklardan elde edilmektedir. Bitkisel kökenli kimyasal bileşiklerden özellikle kanser tedavisi ve enfeksiyon hastalıklarının yanı sıra, metabolik sendrom, immün hastalıklar, depresyon, Alzheimer gibi vakalarda; antioksidan, antilipidemik, kardioprotektif özellik taşıyan biyoaktif maddelerde fonksiyonel gıdaların ve gıda destekleyicilerinin üretiminde yararlanılmaktadır.

Bitki sekonder metabolitleri, başta sağlık ve gıda olmak üzere birçok endüstride yoğun olarak kullanılan hammaddeler olduğundan; bu kullanımın oluşturduğu talebi karşılamak amacıyla, bitkilerde çok az miktarlarda üretilen sekonder metabolitlerin büyük miktarlarda üretilmesine olanak sağlayan *in vitro* bitki doku kültürü çalışmaları gün geçtikçe artmaktadır. Son yıllarda ülkemizin bitkisel kimyasallar açısından dışa bağımlılığını azaltmak amacıyla değerli sekonder metabolitlerin üretiminde yerli kaynakların kullanımı giderek önem kazanmaktadır. Bu kapsamda yerel kaynakların devreye sokularak üretilmesinde bütün bir bitkiyi yetiştirmek yerine bitki hücre ve doku kültürü uygulamaları alternatif bir üretim metodu olarak geniş olanaklar sunmaktadır.

Bitki hücre ve doku kültürü uygulamalarının son geldiği nokta ise üretimde biyoreaktörlerin kullanılmasıdır. Yüksek değerli sekonder metabolitlerin üretiminde bütün bir bitki yerine, çeşitli alternatif *in vitro* kültür tekniklerinin kullanılması birçok açıdan cazip olanaklar sunmaktadır. Bitki doku kültürü tekniklerinin son yıllardaki gelişimi sürecinde biyoreaktörlerin kullanımı, sıvı kültürlerde bitkilerin çoğaltılıp üretilmesini mümkün kılmıştır. Biyoreaktörler, canlı organizma, hücre veya dokuların sıvı besi ortamında kültüre alındığı, içerisindeki tüm büyüme koşullarının sıkı bir şekilde kontrol altında tutulduğu mekanik kap

veya tanklar olarak tanımlanabilir. Jelleştirici ajanların uygulandığı katı kültür ortamlarına kıyasla daha verimli ve hızlı bir gelişim sağlayan sıvı kültürlerin kullanılmasının, maliyetin düşmesi ve üretim süresinin kısalması gibi sürece olumlu etkileri bilinmektedir. Güncel biyoreaktör sistemlerinden olan geçici daldırma sistemi (TIS) biyoreaktörleri, kültür ortamının aseptik şartlarını bozmaksızın taze besi ortamı eklenmesine ve ürünlerin çıkarılmasına, pH düzenlemesi, hava sağlama, karıştırma ve ısı kontrolüne olanak sağlayan, genellikle cam veya plastikten yapılan kaplardır. Böylelikle biyoreaktör, kültür şartlarının yakın takibini mümkün kılan, gerekli fiziksel ve kimyasal müdahalelerin kolayca yapılabilirdiği ya da programlanabildiği mekanik ve bazı durumlarda elektronik özelliklere sahip teknolojik bir sistemdir. Sekonder metabolit üretiminde etkisi olan CO₂ döngüsü, oksijen desteği, pH, karbonhidratlar, bitki büyüme düzenleyiciler, sıvı ortam akışkanlığı, elisitör etkisi, hücre yoğunluğu gibi faktörlerin biyoreaktör sistemlerinde kolayca kontrol edilebilmesi, üretime yönelik olarak bu teknolojinin tercih edilmesine sebep olmaktadır.

Bu tez kapsamında, yerli bitkisel gen kaynaklarından olan *Salvia officinalis* L. eksplantlarından kallus kültürü elde edilmesi, TIS biyoreaktörlerinde kallus kültürüne başarılı bir şekilde devam edilmesi, kalluslarda mevcut olan bazı sekonder metabolitlerin TIS biyoreaktörü ve elisitör uygulamaları sonucunda artışının sağlanması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda aynı familyaya ait olan *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinde yapılan ön denemeler ile farklı hormon konsantrasyonları kullanılarak kallus üretimi için en uygun besiyeri tespit edilmiş ve çalışmanın optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Uygun besiyerinin tespit edilmesini takiben *Salvia officinalis* L. eksplantlarından kallus kültürü oluşturulmuştur. Oluşturulan kallus kültürünün TIS biyoreaktöründe de gelişmesi sağlanmıştır, kallusların içerdiği toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan miktarları tespit edilmiştir. Kallus kültürleri katı besiyerinde ve TIS biyoreaktöründe Jasmonik asit uygulaması ile kültüre alınmış, kültür sonunda kalluslardan elde edilen ekstraktların toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan miktarları tespit edilerek, karşılaştırılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BALLIBABAGİLLER (*LAMIACEAE*) FAMILYASI

Lamiaceae familyası dünyanın birçok yerinde, çok çeşitli habitat ve rakımlarda yayılış gösteren, dünyada yaklaşık olarak 250 cins ve 6500 adet türü saptanmış, ülkemizde endemik olarak 245 türü bulunan, geniş yayılış alanına sahip olan bir familyadır. Familya adaçayı, biberiye, kekik, lavanta, nane, oğulotu fesleğen gibi birçok tıbbi ve ekonomik değeri olan bitkileri içermekte olup, bitkileri genellikle çok yıllık otsu veya çalı formundadır (Türkmenoğlu ve diğ., 2019). Familya bitkilerinden birçok türün tıp ve eczacılıkta, kozmetik endüstrisinde, organik ve konvensiyonel tarımda, boya endüstrisinde ve gıda endüstrisinde geniş kullanım alanı mevcuttur (Dönmez ve diğ., 2011) (Türkmenoğlu ve diğ., 2019).

2.2. TIBBİ ADAÇAYI (*Salvia officinalis* L.) BİTKİSİ

Lamiaceae familyasına dahilinde, yaklaşık 900 tür ile en büyük cins grup olan *Salvia* cinsi; değerli tıbbi aromatik bitkilerden oluşup, cinsin ticari değeri en yüksek olan türlerinden biri *Salvia officinalis* L. (Tıbbi Adaçayı)'dir. Bitki Orta Doğu ve Akdeniz bölgelerinde doğal olarak yayılış göstermektedir. *Salvia officinalis* L. 60 cm yüksekliğe ulaşabilen çok yıllık çalı formunda bir bitkidir. Bitkinin gövdesi dik veya eğimli olup, çok sayıda ince koyu yeşil renkli dallara sahiptir. Yapraklar saplı, uzamış, zıt, basit, bazen bazal loplu, tırtıklı kenarlı, buruşuk yüzeyli olabilir. Yapraklarının alt yüzeyinde bulunan tüyler beyaz, üst yüzeyinde bulunan tüyler yeşilimsi veya yeşilimsi-gri renktedir. Çiçekleri 2-5 mm uzunlukta çiçek sapı olan, psödovertisillasterlerde 5-10 çiçek bulunan ve sahte oluşan başak formundadır. Kaliks 10-14 mm uzunluğunda tüylü ve beş dişlidir. Korolla yaklaşık 35 mm uzunluğunda, pembe, mor-mavi ve nadiren beyaz renktedir. Bitki bulunduğu ortamın iklim koşullarına bağlı olarak Mart ayından Temmuz ayına kadar çiçekli haldedir (Davis, 1982) (Grdiša ve diğ., 2015).

Salvia officinalis L. türünün toprak üstü kısımları uzun yıllardan beri yemek pişirme amacıyla ve geleneksel tıp uygulamalarında kullanılmaktadır. Tarih boyunca aroması sebebiyle baharat olarak kullanılan bu bitki; geleneksel tıpta ülser, nöbet, gut, iltihaplanma, baş dönmesi, ishal, titreme, hiperglisemi ve felç gibi birçok rahatsızlığın tedavisinde kullanılmıştır. Bunun yanında Avrupa geleneksel tıbbında hazımsızlık, aşırı terleme, yaşa bağlı demans, boğazda ve ciltte iltihaplanmalar gibi birçok hafif dereceli hastalığın tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir

(Ghorbani ve Esmailizadeh, 2017). *Salvia officinalis* L. türünün taksonomisi Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1: *Salvia officinalis* L. taksonomisi.

Âlem	Plantae (Bitkiler)	
Bölüm	Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)	
Sınıf	Magnoliopsida (İki çenekliler)	
Takım	Lamiales	
Familya	Lamiaceae (Ballıbabagiller)	
Cins	Salvia	
Tür	<i>Salvia officinalis</i> L. (Tıbbi adaçayı)	

Son yıllarda, *Salvia officinalis* L.'in geleneksel kullanımlarını belgelemek ve bu bitkinin yeni biyolojik etkileri belirlemek amacıyla birçok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalar antikanser, anti enflamatuvar, antinosiseptif, antidemans, antioksidan, antimikrobiyal, anti mutajenik, hipolipidemik ve hipoglisemik etkiler olmak üzere geniş bir farmakolojik aktivite varlığını ortaya çıkarmıştır. *Salvia officinalis* L. türünün çiçeklerinde, yapraklarında ve gövdesinde tanımlanan başlıca fitokimyasallar ve çeşitli bileşenler arasında alkaloidler, karbonhidrat, yağ asitleri, glikosidik türevler (örn. kardiyak glikozitler, flavonoid glikozitler, saponinler), fenolik bileşikler (örn. örneğin monoterpenoidler, diterpenoidler triterpenoidler, seskiterpenoidler) ve mumlar bulunmaktadır. *Salvia officinalis* L. bitkisinde bildirilen fitokimyasalların çoğu, uçucu yağından, alkollü ekstraktından, sulu ekstraktından, bütanol fraksiyonundan ve infüzyon preparasyonundan izole edilmiştir (Fu ve diğ., 2013).

2.3. BİBERYE (*Rosmarinus officinalis* L.) BİTKİSİ

Lamiaceae familyası, *Rosmarinus* cinsine ait bir tür olan *Rosmarinus officinalis* L. Akdeniz bölgesi kökenli çok yıllık odunsu bir bitkidir. *Rosmarinus officinalis* L. bitkisi doğal ortamında 1-2,5 metre yükseklikte, gövdesi dik, dört köşeli ve ikinci yılda odunlaşma eğilimindedir. Yapraklar koyu yeşil renkte küçük iğne benzeri şekle sahip olup, dalları yoğun bir şekilde kaplamaktadır. Bitki Haziran ayı başından Ağustos ayı sonuna kadar çiçek açar. Çiçekleri çok küçük, beyaz veya morumsu mavi renkte olup, terminal salkımda toplanmaktadır (Davis, 1982)

(Santos ve diğ., 2005). *Rosmarinus officinalis* L. içerdği sekonder metabolitler, yağlar ve besin değerleri ile önemli bir tıbbi ve aromatik bitki türüdür (Andrade ve diğ., 2018). Antik çağlardan beri baharat ve tıbbi tedavi olarak kullanılan bitki günümüzde de tatlandırıcı ve koruyucu özelliklerinden ötürü gıda endüstrisinde; antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinden ötürü kozmetik ürünlerde kullanılmaktadır (Begum ve diğ., 2013). *Rosmarinus officinalis* L. türünün taksonomisi Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: *Rosmarinus officinalis* L. taksonomisi.

Âlem	Plantae (Bitkiler)	
Bölüm	Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)	
Sınıf	Magnoliopsida (İki çenekliler)	
Takım	Lamiales	
Familya	Lamiaceae (Ballıbabagiller)	
Cins	<i>Rosmarinus</i>	
Tür	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Biberiye)	

Son yıllarda bu bitkiye ilgi artmış olup, 2010 yılından beri yılda ortalama 120 çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar bitkinin dispepsi ve spazmodik gastrointestinal bozukluklarının hafif formlarının tedavisinde, dolaşım anomalilerinde, kas veya eklem ağrılarının ve iltihaplarının tedavisinde tamamlayıcı tedavisinde kullanıldığını ortaya koymaktadır. Ayrıca bu çalışmalarda iltihaba bağlı hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere, *Rosmarinus officinalis* L. türünün anti-enflamatuvar aktivitesi hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak rapor edilmiştir (Borges ve diğ., 2019). *Rosmarinus officinalis* L. türünün uçucu yağlarından ve özlerinden izole edilebildiği en çok bildirilen fitokimyasallar arasında kafeik asit, karnosik asit, karnosol, rosmarinik asit, monomerik asit, oleanolik asit, ursolik asit, kafur, alfa-pinen, okaliptol, rosmadial, öjenol, rosmanol, rosmakinonlar, ve luteolin türevleri yer almaktadır (Oliveira ve diğ., 2019).

2.4. BİTKİ SEKONDER METABOLİTLERİ

Bitkilerin içerdiği kimyasallar genellikle 2 temel gruba ayrılmaktadır. Karbonhidrat, yağlar ve protein gibi yapıya katılan kimyasallar primer metabolitler olarak tanımlanır. Primer metabolitler en çok bitkinin tohum ve vejetatif organlarında bulunup; temel hücre metabolizmasında rol oynamalarından ötürü, bitkinin fizyolojik gelişimi için gereklidir (Oskay ve Oskay, 2009).

Bitkinin primer metabolitlerden biyosentetik yolla ürettiği, tozlaşma, mevcut çevreye uyum, diğer bitkilerle rekabet, mikroorganizma, böcek ve diğer avcılara karşı savunma amacıyla sentezlediği düşünülen, üretimi stres ortamında artan kimyasallar ise sekonder metabolitler olarak tanımlanır. Bitki organlarında oldukça düşük miktarlarda biriktirilmelerinden ötürü ekstraksiyonları ile saflaştırılmaları oldukça zordur (Topçu ve Çölgeçen, 2015).

Sekonder metabolitler farmasötik, zirai kimyasal, tatlandırıcı, koku ve renk verici, biyopestisit ve gıda katkı maddesi olarak kullanıldıkları için ekonomik değeri yüksek kimyasallardır. Özellikle ilaç endüstrisinde kullanılan kimyasalların yaklaşık % 25'i bitkisel kaynaklıdır. Dünyada ticari değeri yüksek olan bazı sekonder metabolitler, kullanım alanları, izole edildiği bitki türü ve ticari değerleri Tablo 3'te verilmiştir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002).

Tablo 3: Ticari değeri yüksek olan bazı sekonder metabolitler.

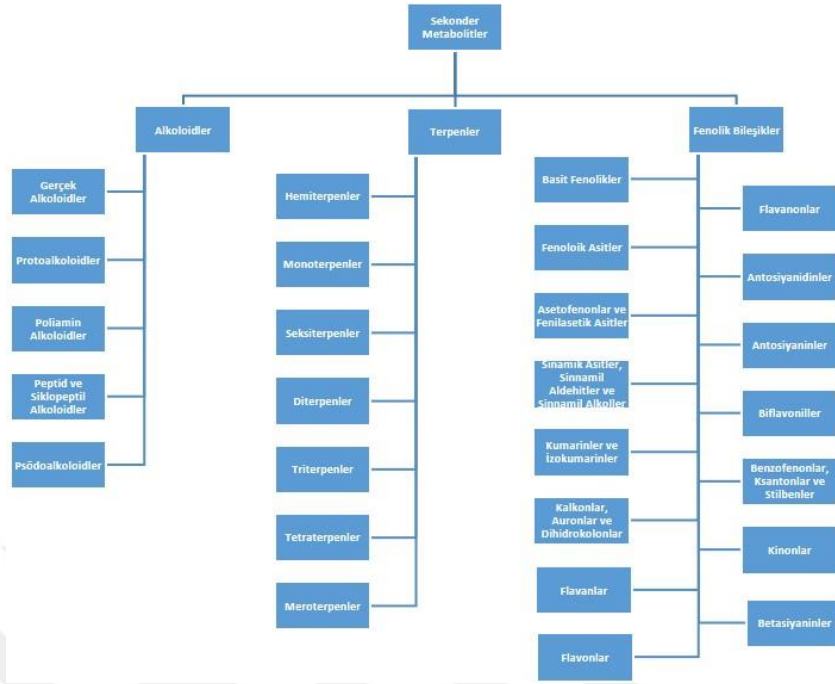
Ürün	Kullanım	Bitki Türü	Fiyat (US\$ / kilogram)
Ajmalisin	Antihipertansif	<i>Catharanthus roseus</i>	37.000
Artemisinin	Antimalaryal	<i>Artemisia annua</i>	400
Ajmalin	–	<i>Rauvolfia serpentina</i>	75.000
Asinin	–	<i>Acotinuspp.</i>	-
Berberin	İntestinalailment	<i>Coptis japonica</i>	3.250
Kamptotesin	Anti-tümör	<i>Camptotheca acuminata</i>	432.000
Kapsaisin	Counterirritant	<i>Capsicum frutescens</i>	750
Kastanospermin	Glycosideinhibitor	<i>Castanospermum australe</i>	-
Kodein	Sedatif	<i>Papaver somniferum</i>	17.000
Kolşisin	Anti-tümör	<i>Colchicum autumnale</i>	35.000
Digoksin	Kalp uyarıcı	<i>Digitalis lanata</i>	3.000
Diosgenin	Steroidaldprecursor	<i>Dioscorea deltoidea</i>	1.000
Elliptisin	Anti-tümör	<i>Orchrosia elliptica</i>	240.000
Emetin	–	<i>Cephaelispecacuanha</i>	1.500
Forskolin	Bronşiyal astım	<i>Coleus forskolii</i>	-
Cinsenosidler	Tıbbi tonik	<i>Panax ginseng</i>	-
Morfin	Sedatif	<i>Papaver somniferum</i>	340.000
Podopillotoksin	Anti-tümör	<i>Podophyllum petalum</i>	-
Kuinin	Antimalaryal	<i>Cinchon. ledgeriana</i>	500

Tablo 3'ün devamı

Sanguinarine	Antiplate	<i>Sanguinariacandensis</i>	4.800
Şikonin	Antibakteriyal	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	4.500
Paklitaksel	Anti-kanser	<i>Taxusbrevifolia</i>	600.000
Vinkristin	Anti-lökemik	<i>Catharanthus roseus</i>	2.000.000
Vinblastin	Anti-lökemik	<i>Catharanthus roseus</i>	1.000.000

Sekonder metabolitlerinin bitkideki fonksiyonları bilim adamları arasında tartışmalı olsa da ortak görüşler, bitkiyi herbivorlara, bakteriyal ve fungal patojenik saldırılara karşı koruması, çevredeki diğer bitkilerle rekabet etme yeteneğinin artırması, tozlaşmada faydalı organizmaları çekmesi, bitkinin ortamında gerçekleşen sıcaklık değişimleri, ışık, su ve mineral madde gibi stres faktörlerine karşı koruma sağlaması, hücresel düzeyde transdüksiyon mekanizmalarında, bitki büyüme ve gen düzenleyicileri olarak görev almaları sayılabilir (Oskay ve Oskay, 2009) (Çetin ve Baydar, 2016).

Bu özellikleri sebebiyle bitki sekonder metabolitlerinin kitlesel üretimi ve üretimin artırılması ticari olarak büyük önem taşımaktadır. Son yıllardaki çalışmalar sekonder metabolit üretiminde tüm bitkinin yetiştirilmesi yerine *in vitro* koşullarda hücre ve doku kültürü tekniklerinin alternatif olabileceğini göstermektedir. Biyoteknolojik olarak sekonder metabolit miktarının bitki hücre ve dokularında artırılmaya çalışılmasında doku kültürü yönteminin uygulama alanlarından biri olan biyoreaktör kullanımı en güncel ve yenilikçi yaklaşımlardandır (Topçu ve Çölgeçen, 2015).



Şekil 1: Sekonder metabolitlerin sınıflandırılması.

Sekonder metabolitler genel olarak terpenler, alkaloidler ve fenolik bileşikler olmak üzere 3 grupta sınıflandırılırlar (Şekil 1).

2.4.1. Terpenler

Bitkilerde büyüme düzenleyiciler, fotosentetik pigmentler ve membranların yapısal bileşenleri gibi işlevlerde rol oynayan, en büyük doğal ürün sınıflarından biridir. Birçok bitkide savunma görevi gören bileşiklerdir. Bu bileşiklerin koku potansiyelleri sebebiyle parfümeri ve gıda endüstrisinde kullanımları yaygındır. Bitki dokularında genellikle serbest, bazen proteinlerle birleşmiş, bazen de organik asit esterleri ya da glikozitleri halinde bulunabilirler. Bulundurdıkları beş karbon birim sayısına göre hemiterpenler (C_5), monoterpenler (C_{10}), seksiterpenler (C_{15}), diterpenler (C_{20}), triterpenler (C_{30}), tetraterpenler (C_{40}), meroterpenler olmak üzere 7 gruba ayrılmaktadırlar (Tiring ve diğ., 2021).

2.4.2. Alkaloidler

Yaklaşık 3000 yıldır ağır kesici, zehir ve tedavi edici yönleri için kullanılmaktadır. Bitkilerde daha çok herbivor, sinekler ve mikroorganizmlara karşı savunma amacıyla üretilmektedir.

Bunun yanında bitki tarafından salgılan bu bileşikler, feromon ya da savunma gibi işlerde kendi yararlarına kullanmak amacıyla böcekler tarafından çeşitli mekanizmalar geliştirilmiştir. İnsanlar tarafından günümüzde ilaç endüstrisinde aktif olarak kullanılmaktadır. İlaç endüstrisinde kullanılan alkoidlerin en önemlileri arasında kodein, morfin, atropine ve skopolamin sayılabilir. Alkoloidler genellikle gerçek alkoloidler, protoalkoloidler, poliamin alkoloidler, peptit ve siklopeptit alkoloidler, psödoalkoloidler olarak 5 ana gruba ayrılır (Tiring ve diğ., 2021) (Topçu ve Çölgeçen, 2015).

2.4.3. Fenolik Bileşikler

Fenolikler aromatik halkasında bir yada daha fazla hidroksil grubu içeren bileşikler olup, yaklaşık 10.000 çeşit bileşiğin yer aldığı büyük bir gruptur. Bitkilerde bu bileşikler proteinler ile kompleks yapı oluşturmalarının yanında, enzim aktivitesini inhibe eden ürünlerin üretiminde rol oynarlar. Fenolik bileşikler bitkinin büyümesinde, gelişiminde, tozlaşmasında, döllelenmesinde, tohum gelişiminde ve savunmasında aktif rol oynamaktadır. Bunun yanında bazı fenolik bileşikler antioksidan etkileri sebebiyle kalp hastalıklarının, iltihapların, kanserin ve diyabetin önlenmesinde kullanılmaktadır. Bitkide fenolik bileşikler yaralanma, kuraklık, metal ve açlık stresi, UV radyasyonu, patojen ve böcek saldırıları gibi etkenlere karşı tepki olarak sentezlenmektedirler. Fenolik bileşikler içerdikleri karbon sayılarına göre Tablo 3'teki gibi sınıflandırılmaktadır.

Tablo 4: Fenolik bileşiklerin içerdikleri karbon sayılarına göre sınıflandırılması.

Yapı	Sınıf
C ₆	Basit fenolikler
C ₆ -C ₁	Fenolik asitler
C ₆ -C ₂	Asetofenonlar ve fenilasetik asit
C ₆ -C ₃	Sinamik asitler, sinamil aldehytler, sinamil alkoller
C ₆ -C ₃	Kumarinler, izokumarinler
C ₁₅	Kalkonlar, auronlar, dihidrokolonlar
C ₁₅	Flavanlar
C ₁₅	Flavonlar
C ₁₅	Flavanonlar
C ₁₅	Antosiyanidin
C ₁₅	Antosiyanin
C ₃₀	Biflavonil
C ₆ -C ₁ -C ₆ , C ₆ -C ₁ -C ₆	Benzofenonlar, ksanton, stilbenler
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	Kinon
C ₁₈	Betasiyanin

Tablo 4'ün devamı

Lignanlar ve neolignanlar	Dimer veya oligomerler
Lignin	Polimerler
Tanenler	Oligomer veya polimerler
Filobafenler	Polimerler

2.5. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

Bitki doku kültürü laboratuvarında tüm bitkinin, bitki organlarının, dokularının ya da hücrelerinin kontrollü ortamlarda ve aseptik koşullarda geliştirilebilmesine olanak sağlayan *in vitro* kültür tekniğidir (Loyola-Vargas ve Ochoa-Alejo, 2018). Yöntemin temeli 1902'de Haberlandt tarafından ileri sürülen; “her bir bitki hücresi bağımsız olarak, uygun besin maddesi, ışık ve sıcaklık gibi ortam koşulları sağlandığında ana bireye benzer şekilde tam bir bitki geliştirme yeteneğine sahip olması” olarak tanımlanan totipotensi kavramına dayanır (Onay ve diğ., 2012). Sistem, bitkilerin ya da eksplantlarının gelişmesi için gerekli olan besinleri, enerjiyi ve suyu bazal besiyeri aracılığıyla sağlar. Buna ek olarak, optimize edilmiş ışık ve sıcaklık değerleri sağlayan kontrollü inkübasyon şartları bitki gelişimini teşvik eder (Phillips ve Garda, 2019).

Konvansiyonel bitki doku kültürü tekniklerinin temeli üç ana kısımdan oluşmaktadır:

- Gerekli inorganik ve organik maddeleri içeren kültürün gelişmesi için steril bir besi ortamının hazırlanması,
- Kültüre alınacak eksplantların (bitki parçalarının) kaynağını oluşturan, mantar, bakteri ya da her ikisini de taşıyan ana bitki materyalinin steril edilmesi,
- Ana bitki materyalinin meristem, anter, embriyo, yaprak ucu vb. bölgelerinden alınan eksplantların steril besi ortamına, steril şartlarda aktarılması ve gelişimine uygun şartlara yerleştirilmesidir (Gönülşen, 1987).

Sistemler dahilinde, ortama bitki büyüme düzenleyicileri (fitohormonlar ya da sentetik türevleri) eklenerek; çeşitli evrelerde, bitki materyali gelişimi manipüle edilebilir (Phillips ve Garda, 2019). *In vitro* kültür teknikleri günümüzde hastalıksız bitki üretimi, nadir genotiplerin hızlı çoğaltılması, nesli tükenme tehlikesine sahip ya da tehdit altında olan bitkilerin çoğaltılması (Oseni ve diğ., 2018), bitki genom transformasyonu, ticari değeri yüksek bitkisel

metabolitlerin üretimi gibi uygulamalarda vazgeçilmez olmuştur (Chandran ve diğ., 2020). Yöntemin, kallus kültürü, hücre süspansiyon kültürü, saçak kök kültürü, embriyo kültürü ve gövde kültürü gibi katı ortamlardan sıvı biyoreaktör çalışmalarına kadar uzanan farklı alanları bulunmaktadır (Karataş ve diğ., 2016).

Bitki doku kültürü uygulamalarında eksplantların büyümesi gelişmesi ve farklılaşması için kullanılan besiyerlerine eklenen maddelerin çeşitliliği ve miktarları çok önemlidir. Katı kültür besiyerleri; inorganik bileşikler olarak mikro ve makro elementleri; organik bileşikler olarak şekerleri, vitaminleri, bitki büyüme düzenleyicileri, aminoasitleri; jelleştirici ajanlar olarak agarı, agarozu, kerrajani, gellan sakızını ve moleküler mekanizması tanımlanmamış çeşitli destek maddelerini içermektedir. Besiyerine eklenen bu maddelerin çeşitleri ve konsantrasyonları yapılan çalışmalara göre farklılıklar içermektedir (Hürkan ve diğ., 2021).

Bitki doku kültürü çalışmalarında en çok karşılaşılan sorunların başında kontaminasyon gelmektedir. Sistemde kontaminasyon varlığı, tüm eksplantlara bulaşma riski taşıyarak, bulaş sonrası bütün materyalin kaybedilmesine yol açabilir. Yöntemde kullanılan besiyerleri bitkilere ek olarak bakteri, küf ya da maya gibi organizmaların gelişmesi için de zengin bir ortam sağladığından kontaminasyonu teşvik eder. Doku kültürü sistemlerinde kontaminasyon sebebi kaynaklar evrensel değildir. Ana bitki materyali, besiyeri, kullanılan ekipman, çalışma ortamı, kültür kapları kontaminasyonun kaynağı olabilir. Bu sebeple her adımda mükemmellik kontaminasyon riskini azaltmayı hedef alır (Singh, 2018). Laboratuvarlar, aseptik koşulları sağlamak amacıyla sterilizasyon uygulamalarına ek olarak, besiyerlerine antibiyotikler ya da ticari fungusit/biyositler eklemektedir. Kontaminasyona sebep olan organizmanın tanımlanamadığı durumlarda farklı antibiyotiklerden hazırlanan kokteyl solüsyonlar kullanılmaktadır. Fakat bu durum antibiyotiklerin fiyatları ve çeşitliliği sebebiyle ciddi bir maliyet artışına sebep olmaktadır. Ayrıca çeşitli antibiyotiklerin eksplant gelişimine olumlu ya da olumsuz etkileri bulunması sebebiyle, kültürde istenilen manipülasyonu etkilemektedir (Cosma ve Vancea, 2017). Bitki doku kültürlerinde karşılaşılan problemlerden biri de fenoliklerin oksidasyonu sebebiyle eksplantların kararmasıdır. Bitki hücreleri ya da dokuları ürettikleri fenolik bileşikler zaman içinde bulundukları ortama salmaktadır. Ortama geçen fenolik bileşikler okside olarak dokularda kararmaya sebep olmaktadır (Singh, 2018). Doku kararmalarının önüne geçmek için besiyerlerine aktif karbon ve polyvinyl pyrolidone (PVP) gibi fenolik bileşik tutucuları eklenmektedir (Alp ve diğ., 2010).

2.6. BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİ

Bitki büyüme düzenleyicileri (BBD); çimlenme, gövde uzaması, yaprak büyümesi ve gelişimi, çiçeklenme, meyve oluşumu ve olgunlaşması gibi bitkilerin büyüme ve gelişme süreçlerini kontrol ederler. Bitki büyüme düzenleyicileri genellikle hatalı olarak bitki hormonları ya da fitohormonlar olarak ifade edilir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin fonksiyonları hakkındaki araştırmalar karmaşık olabilir, çünkü bitki büyüme düzenleyicileri tipik olarak birbirleri ile uyum içinde çalışırlar. Bitkilerdeki konsantrasyonları zaman, mevsim ve bitkinin gelişme sürecine göre değişebilir. Bazı bitki büyüme düzenleyicileri hücre içinde hücrenin kendi kullanımı için sentezlenebilir. Bunun yanında diğer bitki büyüme düzenleyicileri bitkinin bir organında sentezlenerek spesifik bir amaç için bitkinin farklı bir organına aktarılabilir. Bitki tarafından sentezlenen bu maddeler endojen bitki büyüme düzenleyicileri olarak ifade edilir. Bununla birlikte bitki büyüme düzenleyicilerinin birçok doğal ve sentetik çeşitleri tanımlanmıştır; ve bitki üretimi ya da doku/hücre kültürü çalışmaları için tedarik edilebilmekte ve kullanılmaktadır. Bu durumda maddeler ekzojen bitki büyüme düzenleyicileri olarak ifade edilir (Gaba, 2004).

Bitki doku kültürü uygulamalarında ortama ekzojen olarak bitki büyüme düzenleyicileri eklenmesi, ortamda geliştirilmek istenen bitki eksplantlarının küçük ve bu maddeleri sentezleyemeyecek durumda olmaları nedeniyle aktif olarak kullanılan bir yöntemdir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin bitki doku kültüründe kullanımı hassas bir konudur. Uygulanan dozlara göre eksplantlar ya da bitki materyali için uyarıcı olmasının yanında baskın etkileri de olabilir. Bu etkiler doku kültüründe istenen amaçlar için olumlu ya da olumsuz olabilir. Bu sebeple bitki büyüme düzenleyicilerin kullanımının optimizasyonu bitki doku kültürü teknikleri için hayati önem taşır. Bitkilerin morfogenetik gelişimine etkilerinin yanında, doğru optimizasyon yapıldığında *in vitro* kültür koşullarında sekonder metabolit üretimini de etkilemektedir (Gaba, 2004).

Bitki büyüme düzenleyicileri oksinler, sitokininler, gibberellinler, absisik asit ve etilen olarak beş büyük grup altında tanımlanabilir. Bu grupların çoğu bitki büyümesi ve gelişiminde çok yönlü rollere sahip olması yanında, doku kültürü tekniklerinde bitkileri manipüle etmek için de kullanılmaktadır (Gaba, 2004).

Doğal oksinlere Indole-3-Acetic Acid (IAA); sentetik oksinlere Indole-3-Butyric Acid (IBA), 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4 D), a-Naphtalene Acetic Acid(NAA) ve Dicamba örnek verilebilir. Doğal sitokininlere Zeatin ve 2-iP; sentetik sitokininlere 6-Benzylaminopurine (6-BAP), Thidiazuron (TDZ), ve Kinetin (KIN) örnek verilebilir. Doğal gibberellinlere Gibberellic acid A3, sentetik gibberellinlere Gibberellic acid 4 +7 örnek verilebilir. Absisik asit ve etilen ayrı birer grup olsa da, her biri tek bir doğal maddeyi içeren bitki büyüme düzenleyicilerindendir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileri Tablo 4’de verilmiştir (<https://www.duchefa-biochemie.com/>).

Tablo 5: Bitki büyüme düzenleyicilerinin doku kültüründeki etkileri

BBD	Bitki Doku Kültüründeki Etkileri
Oksinler	• Meristemlerin adventif köklerinin oluşumu. • somatik embriyoların uyarılması (özellikle 2,4-D). • Hücre bölünmesi. • Kallus oluşumu ve büyümesi. • Kanat altı tomurcuk gelişiminin engellenmesi. • Kök büyümesinin engellenmesi.
Sitokininler	• Adventif sürgün oluşumu • Adventif kök oluşumunun engellenmesi • Hücre bölünmesi. • Kallus oluşumu ve büyümesi. • Kanat altı tomurcuk gelişiminin engellenmesi. • Sürgün uzamasının engellenmesi • Yaprak senesensinin engellenmesi.
Gibberellinler	• Sürgün uzamasının teşvik edilmesi ya da engellenmesi • Tohumlarda, somatik embriyolarda, apikal tomurcuklarda ve çiçek soğanlarında dormansiden çıkılması • Adventik kök oluşumunun engellenmesi • Kök gelişiminin desteklenmesi • Tüber ve bitki soğanı gelişiminin desteklenmesi • Ortama alıştırmanın kolaylaştırılması
Etilen	• Yaprakların senesensi • Meyve olgunlaşması • Adventif rejenerasyonun desteklenmesi veya engellenmesi
Absisik Asit	• Somatik embriyoların olgunlaşması • Ortama alıştırmanın kolaylaştırılması • Tüber ve bitki soğanı oluşumu • Dormansinin teşvik edilmesi

2.7. KALLUS KÜLTÜRÜ

Temel doku kültürü yöntemleri bitkinin yaprak, kök ya da gövdesinden alınan eksplantların steril ortamda uygun besiyerine yerleştirilmesi ve geliştirilmesidir. Farklı ortamlarda ve farklı bitki eksplantları ile yapılan kültürler çoğunlukla kallus kültürü ile başlar. Kalluslar ana bitkiden kesilen, bölünme özelliğini kaybetmemiş eksplantların bitki büyüme düzenleyicileri ve karbon kaynağı içeren uygun besiyerinde büyütülmesi sonucu oluşan özelleşmemiş hücrelere sahip yapılardır. Bu yöntemin birçok uygulama alanının mevcut olmasına ek olarak değerli sekonder metabolitlerin üretimin araştırılmasında etkin bir yöntem olduğu birçok araştırmacı tarafından ifade edilmiştir (Topçu ve Çölgeçen, 2015).

Bu çalışmalara örnek olarak Takeya ve Itokowa (1981) kallus kültüründe birçok flavonoid bileşik elde etmişlerdir. Fedoreyev ve diğ. (2000) *Maackia amurensis* türünün yaprak sapı, yaprak ve apikal meristemlerinden aldıkları eksplantlardan kallus geliştirmişler. Geliştirilen kallusların ekstraksiyonları elde edildikten sonra, ekstraktlara izoflavonoid analizi yapmıştır. Analizlere göre kallus kültüründe daidzein, retuzin, genistein, formononetin ve pterokarpanlardan maakianin ve medikarpine izoflavonoitlerine rastlamıştır. Kalluslarda toplam miktarı 20.8 mg/g olan izoflavonoit ve pterokarpinleri tespit edilmiş olup, bu bitkideki miktardan 4 kat fazladır.

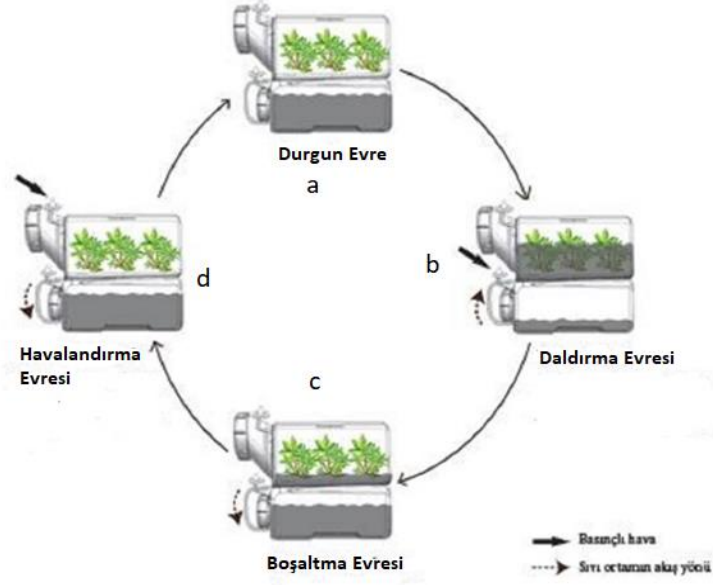
2.8. SIVI KÜLTÜRLER VE GEÇİCİ DALDIRMA SİSTEMİ (TİS) BİYOREAKTÖRLERİ

Geleneksel doku kültürü uygulamalarında genellikle katı besiyerleri kullanılmaktadır. Bu uygulamalarda besiyerlerine eklenen ve besiyerinin katılaşmasını sağlayan jelleştirici ajanlar dokularda kararmaya sebep olur. Bu sebeple katı kültürlerde bulunan eksplantlar periyodik olarak 2-4 haftadan sonra yeni besiyerlerine aktarılmaktadır. Bu aktarım, eksplantlarda kontaminasyon oluşma ihtimalini yükseltmekte ve örneklerin kaybedilmesine yol açabilmektedir (Etienne ve Berthouly, 2002). Ayrıca katı kültürlerde jelleştirici ajanlar olarak kullanılan agar, karajenan ve gellan sakızı maddeleri ticari olarak pahalı ürünler olup, üretim maliyetini ciddi bir şekilde arttırmaktadır. Bunun yanında sıvı ortamlar ise mikro çoğaltımda bitki üretim maliyetlerini azaltmak ve otomasyon için idealdir. Katı ortamlara göre, sıvı kültür sistemlerin çok daha üniform kültür koşulları sağlaması, kap değiştirmeden besiyerinin yenilenmesine olanak sağlaması, mikrofiltrasyon ile sterilizasyona olanak sağlaması ve kültür

sonrası kaplarının kolay temizlenmesi gibi yöntemsel üstünlükleri vardır. Sıvı kültürlerin olumsuzlukları arasında ise kültür ortamındaki oksijen yetersizliği, mevcut dokuların vitrifiye (cam haline gelmesi) ve hiperhidrisite olması gösterilebilir (Etienne ve Berthouly, 2005).

Sıvı kültürlerin kullanıldığı ve olumsuzlukların üstesinden gelindiği yöntemlerden biri de geçici daldırma sistemi (TIS) biyoreaktörleridir. Bu sistemlerin çalışma prensibi basitçe eksplant ve besiyerinin ayrı kaplarda olduğu, besiyerinin hava basıncı ile birlikte daldırma evresi sırasında bitki materyalinin bulunduğu kaba iletilmesi, besiyerinin evre sonunda hava basıncının kesilmesi ile kabına geri dönmesi olarak açıklanabilir. Daldırma evresinde sıvı besiyeri ve bitki materyali bir araya gelerek materyalin gerekli besini alması sağlanmaktadır. Bu biyoreaktör sistemi bitki materyalinin sürekli olarak besiyeri ile temas halinde olması yerine, düzenli aralıklar ile besiyerine maruz bırakılmasına imkan sağlamaktadır. Bu durumda sıvı kültürlerde karşılaşılan oksijen eksikliğinden kaynaklanan sorunları, dokuların vitrifiye ve hiperhidrisite olmasını en aza indirmektedir (Georgiev ve diğ., 2014).

Geçici daldırma sistemi biyoreaktörlerinin ticari formlarından biri olan SETIS biyoreaktör sistemi mevcut ticari sistemler arasında en büyük hacime sahip biyoreaktörlerdendir. Sistem besiyeri ve eksplantlar için ayrı olmak üzere 2 plastik kap, kapların her birine ayrı ayrı steril hava girişini sağlamak için filtreler, filtreler ve kaplar arasında bağlantıyı sağlamak için hortumlar gibi ana elemanlardan oluşmaktadır. Besiyeri kabı 4 litre, eksplant kabı 5,5 litre hacime sahiptir. Filtreler 0,22 µm por büyüklüğüne sahip membrandan oluşmaktadır. Sistem hava basıncını sağlamak için pompalara ihtiyaç duymaktadır. Sistemin bir döngülük çalışma prensibi durgun(a), daldırma(b), boşaltma(c) ve havalandırma(d) olarak 4 evrede Şekil 2’de gösterildiği gibi ifade edilmektedir (Georgiev ve diğ., 2014) (<https://setis-systems.be/home>).



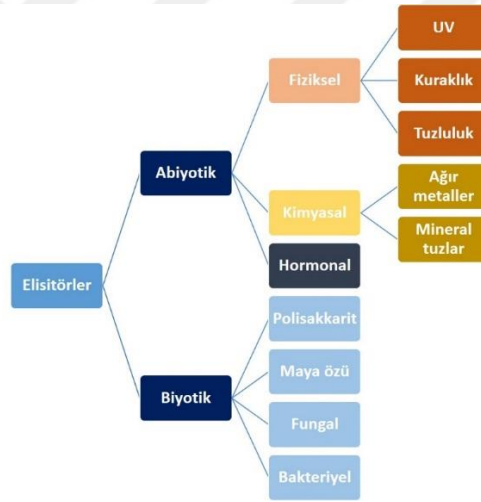
Şekil 2: SETIS biyoreaktör sisteminin evreleri.

Durgun evrede (a), sistemde hava basıncı veya bir akış yoktur; besiyeri materyal kabında kalıntı olarak mevcuttur, sistemin en uzun olarak kaldığı evrelerden biridir. Daldırma evresinde (b) besiyeri kabına hava verilir, hava basıncı ile besiyeri materyal kabına çıkar, sıvı besiyeri ile bitki materyalinin teması sağlanır. Boşaltma evresinde (c) sistemdeki hava akışı kesilir, takiben besiyeri yerçekimi etkisi ile besiyeri kabına döner. Havalandırma evresinde (d), materyal kabına hava akışı verilir, bitki materyalinin bulunduğu ortamın havasının kontrollü olarak yenilenmesini sağlar. Bu sistemde havalandırmanın sürekli olmaması ve kontrol edilebilmesine ek olarak mekanik çalkalama olmaması bitki materyalinin strese girmesini engellemekte olup daha kontrollü bir ortam sağlamaktadır (<https://setis-systems.be/home>).

Bitki üretiminde, geçici daldırma sistemi biyoreaktörlerinin çeşitli çalışmalar sonucunda saptanan diğer üstünlüklerine örnek olarak geliştirilmiş mikroçoğaltım kalitesi, düşük sarf malzemesi maliyetleri, düşük işçilik maliyetleri, daha hızlı eksplant gelişimi, azaltılmış hiperhidrisite ve dokuların yeterli oksijeni alması gösterilebilir (Alister ve diğ. 2005). Geçici daldırma sistemi biyoreaktörleri, bu üstünlükleri sayesinde bitkilerin mikroçoğaltımı ve çeşitli bitki biyoteknolojisi uygulamalarında gelecekte baskın bir rol oynayacağı öngörülmüştür (Preil, 2005).

2.9. ELİSİTÖRLER VE ELİSİTASYON

Bitkilerde, çeşitli etkenlerin, maddelerin ya da organizmaların ortama dahil edilmesi ile normal şartlarda mevcut olmayan spesifik bileşenlerin sentezlenmesi ya da az miktarda bulunan bileşiklerin biyosentezinin önemli seviyede artması elisitasyon; ortama dahil edilen bileşenler ise elisitör olarak tanımlanır (Radman ve diğ., 2003). Elisitörlerin ortamdaki varlığı bitkiler için stres faktörü oluşturmakta, bitkinin savunma amacıyla ürettiği sekonder metabolitlerin miktarında artışa sebep olmaktadır. Elisitörler bitkide sinyal oluşumunu tetikleyerek, savunma sistemi bileşikleri olan fitokimyasal bileşiklerin üretimine sebep olur. Bu uyarıcılar hücre içi ya da hücre dışı olabilir. Kökenlerine ve moleküler yapılarına göre biyotik ve abiyotik olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılabilir (Vuran ve Türker, 2021). Elisitörlerin sınıflandırılması Şekil 3'teki gibi gösterilmiştir (Naik ve Al-Khayri, 2016).



Şekil 3: Elisitörlerin sınıflandırılması (Naik ve Al-Khayri, 2016).

Biotik elisitörlere mikrobiyal ve fungal etkenler (*Agrobacterium rhizogenes*, *Phytophthora cinnamoni*), maya özütü, organik moleküller (pektin, selüloz, kitin, glukan), düşük moleküler ağırlığa sahip organik asitler (Jasmonik asit ve Salisilik asit); abiyotik elisitörlere UV-irritasyonu, ağır metal tuzları ve membran bütünlüğüne zarar veren kimyasallar (Alüminyum kloridin, gümüş iyonu) örnek verilebilir (Radman ve diğ. 2003).

Hastalık enfeksiyonu haricinde bazı doğal ve sentetik bileşikleri ile bitki dokularını elisite etmek mümkündür. Spesifik bileşenlerin sentezinin artırılması üzerine farklı gruplardan elisitörlerin etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma mevcut olup, ekonomik değeri yüksek

sekonder metabolitlerin *in vitro* kültür yöntemleri kullanılarak üretiminde elisitör kullanımı oldukça yaygınlaşmaktadır (Wang ve diğ., 2005).

2.10. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Gala ve diğ. (2005), *Arabidopsis thaliana* hücre kültüründe yaptıkları çalışmada, ortama eklenen jasmonik asit uygulanmasının başlangıç kültürüne oranla α -tokoferol miktarında %66 gibi yüksek bir oranda artışa yol açtığını bildirmişlerdir.

Gadzovska ve diğ. (2013) , *Hypericum perforatum* L. kallus, sürgün ve hücre süspansiyon kültürleri ile yaptıkları çalışmada, ortama eklenen salisilik asit ile yapılan elisitasyon uygulamasının bazı fenolik bileşiklerin miktarını arttırdığı ifade edilmiştir.

Gadzovska ve diğ. (2014), *Hypericum perforatum* L. sürgün kültürleri ile yapmış oldukları çalışmada, ortama eklenen bazı polisakkarit (pektin, kitin ve kitosan) elisitörlerin başlangıç kültürlerine göre fenolik madde miktarını 9 mg/g'dan 17 mg/g'a, flavonoid madde miktarını 1.6 mg/g'dan 2.8 mg/g'a arttırdığını tespit etmişlerdir.

Ali ve diğ. (2015) tarafından, *Artemisia absinthium* L. hücre süspansiyon kültürleri ile yapılan çalışmada, kültüre farklı dozlarda (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) eklenen metil jasmonat, jasmonik asit ve gibberellik asidin; fenolik ve flavonoid madde birikimini en çok arttıran konsantrasyonu 1.0 mg/l olarak belirlenmiştir.

Khan ve diğ. (2016) tarafından, *Fagonia indica* kallus kültürleri ile gerçekleştirilen çalışmada uygulanan Thidiazuran (TDZ) bitki büyüme düzenleyicisinin farklı dozlarında (0, 1, 2, 3, 4 ve 5 mg/l) fenolik madde ve flavonoid madde miktarını önemli ölçüde arttıran konsantrasyonun 1 mg/l TDZ olduğunu bildirilmiştir.

Wang ve diğ. (2016) tarafından, *Dendrobium candidum* kültüründe gerçekleştirilen çalışmada, ortama eklenen farklı dozlarda (25, 50, 75, 100 ve 125 μ M) metil jasmonat ve salisilik asitin sekonder metabolit üretimine etkisi araştırılmıştır. İki elisitörün de kontrol örneklerine göre toplam flavonoid, fenolik ve alkaloid miktarlarını arttırdıkları gözlenmiştir.

Papenfuss ve Carman (1987), *Triticum aestivum* L. türünün doku kültürü ile yapılan çalışmalarında Dicamba'nın farklı evrelerde kallus oluşumuna olumlu etkilerini tespit etmişlerdir.

Arencibia ve diğ. (2013), *Vaccinium corymbosum* L. türünün kültürlerinde katı kültüre göre, TIS biyoreaktöründe 26,2 kat çoğaltma katsayısı tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Alberto ve diğ. (1998), *in vitro* ortamda *Hypericum perforatum*'un kallus kültürlerinde flavonoid bileşikleri tespit ettiklerini, belirlenen bazı flavonoidlerin ana bitkide bulunmadığını rapor etmişlerdir.

Petrova ve diğ. (2014), *Arnica montana* L. türünün kök kültürlerinde geçici daldırma sistemi biyoreaktöründe, toplam lakton miktarının statik sıvı kültüre göre 1,11 kat, katı kültüre göre 2,01 kat arttığını bildirmişlerdir.

Skrzypczak-Pietraszek ve diğ. (2019), *Centella asiatica* L. türünün kök kültüründe TIS biyoreaktörü kullanılarak yapılan çalışmada kontrol örneğine göre, metil jasmonat uygulanmış örneklerde fenolik asit bileşiklerinde 1,8 kat artış, flavonoid bileşiklerde 1,7 kat artış olduğunu gözlemişlerdir.

Perez-Alonso ve diğ. (2011), *Digitalis lanata* türünün sürgün kültüründe TIS biyoreaktörü kullanarak çeşitli elisitör uygulamaları ile yaptıkları çalışmada; TIS biyoreaktöründe elisitör uygulanmadığı koşullarda bile sürgünlerde sekonder metabolit içeriğinin tespit edildiğini bildirmişlerdir. Çalışma kapsamında çok çeşitli elisitör uygulamaları sonucunda geçici daldırma sisteminde elisitör uygulamalarının biyokütle artışına olumlu etkileri tespit edilmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİSEL MATERYALİN ELDESİ

Zeytinburnu Tıbbi ve İtri Bitkiler bahçesinden alınan *Rosmarinus officinalis* L. ve *Salvia officinalis* L. fideleri canlı eksplant kaynağı sağlamak amacıyla İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı'na getirildi. Fidelerin saksı ve toprağı değiştirildi. Çalışma boyunca eksplant kaynağı olarak kullanılmak üzere Botanik Anabilim Dalı'nda muhafaza edildi.



Şekil 4: Zeytinburnu Tıbbi ve İtri Bitkiler Bahçesi'nden tedarik edilen *Salvia officinalis* L. ve *Rosmarinus officinalis* L. fideleri

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Çalışma Yapılan Laboratuvar ve Ortam

Tüm çalışmalar İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı Doku Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresince yapılan yapılan örneklerin sterilizasyonu, eksplantların kültürlere aktarılması, jasmonik asit uygulaması çalışmaları Heraeus markalı HS12 model Class II yatay akış kabininde gerçekleştirilmiştir. Besiyerlerinin, biyoreaktörlerin ve çalışma süresince kullanılan ekipmanların sterilizasyonu Alp markalı CLG-32L model otoklav cihazında 121°C'de, 1,5 atmosfer basınçta, 15 dakikalık programda gerçekleştirilmiştir. Dokuların kültüre alınması Vötsch markalı VB 0714 model bitki büyütme

kabininde 24 saat 2000 Lux ışıktaki, 25°C sıcaklıkta, %65 nem oranına sahip ortamda gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Örneklerin Sterilizasyonu

Rosmarinus officinalis L. ve *Salvia officinalis* L. fidelerinden kesilen yaprak ve gövde kısımları kültür öncesi sterilizasyona alınmıştır. Eksplantlar ilk olarak %50'lik sodyum hipoklorit solüsyonunda 3 dakika bekletilmiştir. Ardından içinde 1ml/L PPM (Plant Preservative Mixture) solüsyonunu bulanan ayrı kaplarda 3 defa yıkama gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Eksplantların Kültüre Alınması

3.2.3.1. Ön Denemeler

Ön denemelerde besiyeri için, ticari olarak hazır satılan Murashige & Skoog (1964) mikro ve makro element formülasyonu; Gamborg B5 vitamin formülasyonu ile birlikte kullanılmıştır (katalog no: M0231, Duchefa). İlgili formülasyon MS olarak isimlendirilmiştir. İlgili formülasyonun vitamin, makro ve mikro element içeriği Tablo 4'de detaylı olarak verilmiştir.

Tablo 6: Murashige & Skoog (1964) mikro ve makro element, Gamborg B5 vitamin formülasyonlarının içeriği.

Mikro Elementler	mg/l	µM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,11
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,10
FeNaEDTA	36,70	100,00
H ₃ BO ₃	180,54	100,27
KI	0,83	5,00
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	100,00
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	1,03
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	29,91
Makro Elementler	mg/l	mM
CaCl ₂	332,02	2,99
KH ₂ PO ₄	170,00	1,25
KNO ₃	1900,00	18,79
MgSO ₄	180,54	1,50
NH ₄ NO ₃	1650,00	20,61
Vitaminler	mg/l	µM
myo-Inositol	100,00	554,94
Nicotinic acid	1,00	8,12
Pyridoxine HCl	1,00	4,86
Thiamine HCl	10,00	29,65

MS besiyeri ile birlikte karbonhidrat kaynağı olarak Sukroz, katı besiyerleri için jelleştirici ajan olarak agar kullanılmıştır. Besiyerlerinde, örneklerden ortama salınan fenolik bileşikler tutması amacıyla ortalama moleküler ağırlığı 10.000 olan polyvinyll pyrolidone (PVP-10) eklenmiştir.

Besiyerlerinde oluşabilecek kontaminasyonu baskılaması ve yayılmasını engellemesi amacıyla ticari olarak satılan geniş spektrumlu bir Fungusit/Biyosit solüsyonu olan “Plant Preservative Mixture” (Plant Cell Technology) kullanılmıştır. “Plant Preservative Mixture”, PPM olarak isimlendirilmiştir. Besiyerlerinde deneme amaçlı bitki büyüme düzenleyicileri olarak 6-benzylaminopurine (6-BAP), α -naphtalene acetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), thidiazuron (TDZ), Kinetin ve Dicamba kullanılmıştır. En etkili kültür gelişiminin gözlenebileceği besiyerini seçmek amacıyla farklı içeriklerde besiyerleri (pH: 6,5-7) hazırlanmıştır. İlgili besiyerlerinin kısa kodları ve içeriklerinin detayları Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 7: Ödenemelerde kullanılan besiyerlerinin kısa kodları ve içerikleri.

İsim	Besiyeri	PVP	Agar	Sukroz	PPM	Bitki Büyüme Düzenleyicileri
F1	4,4 gr/L	1,5 gr/L	6 gr/L	30 gr/L	1 ml/L	1 mg/mL NAA + 1mg/mL 6-BAP
F2	4,4 gr/L	1,5 gr/L	6 gr/L	30 gr/L	1 ml/L	2 mg/mL 2,4-D
F3	4,4 gr/L	1,5 gr/L	6 gr/L	30 gr/L	1 ml/L	3 mg/mL NAA + 3 mg/mL 6-BAP
FB1	4,4 gr/L	1,5 gr/L	-	30 gr/L	1 ml/L	1 mg/L NAA + 1 mg/mL 6-BAP
K1	4,4 gr/L	1,5 gr/L	7 gr/L	15 gr/L	3 ml/L	3,3 mg/mL Dicamba
S1	4,4 gr/L	1,5 gr/L	7 gr/L	30 gr/L	3 ml/L	1 mg/mL Kinetin + 1 mg/mL TDZ
S2	4,4 gr/L	1,5 gr/L	7 gr/L	30 gr/L	3 ml/L	3 mg/mL Kinetin + 3 mg/mL TDZ
S3	4,4 gr/L	1,5 gr/L	7 gr/L	30 gr/L	3 ml/L	3 mg/mL 6-BAP

Rosmanirus officinalis L. türünün yaprak ve gövde kısımlarından kesilen eksplantlar; ilgili besiyeri formülasyonlarının her birinden 4 petri olmak üzere 8 hafta boyunca kültüre alındı. Kültür süresince eksplantlar düzenli olarak her 2 haftada bir yeni besiyerine aktarıldı. Çok fazla kallus gelişimi ve büyüklüğü gösteren eksplantlar, 2 haftalık taze/yeni besiyerine aktarma işlemleri sırasında daha küçük parçalara kesilerek alt kültüre alınmıştır.

3.2.3.2. *Salvia officinalis* L. Bitksininden Elde Edilen Eksplantların Kültüre Alınması

Salvia officinalis L. yaprak ve gövde parçaları steril edildikten sonra, küçük eksplantlar halinde kesilmiştir. Kesilen eksplantlar, ön denemelerde etkin kallus oluşumu gözlenen K1 besiyerinde kültüre alınmıştır.

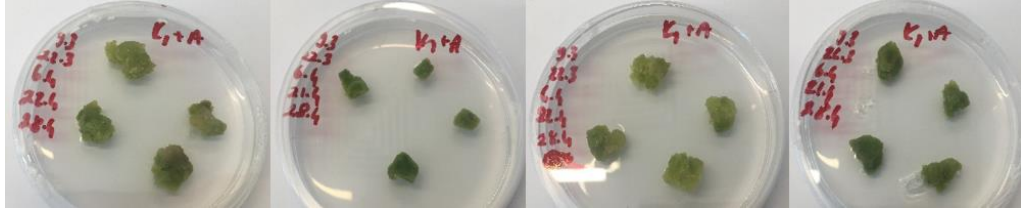


Şekil 5: K1 besiyerinde ilk kültüre alınan *Salvia officinalis* L. eksplantları görünümleri.



Şekil 6: K1 besiyerinde kültüre alınan *Salvia officinalis* L. eksplantlarının 3 hafta sonundaki görüntüleri.

Oluşan kalluslar 2 haftada bir taze besiyerine aktarma işlemleri sırasında düzenli olarak daha küçük parçalara kesilerek alt kültürlere alınmış, stok materyal olarak kullanılmak üzere kültürlerine devam edilmiştir.



Şekil 7: K1 besiyerinde alt kültüre alınmış *Salvia officinalis* L. kallusları.

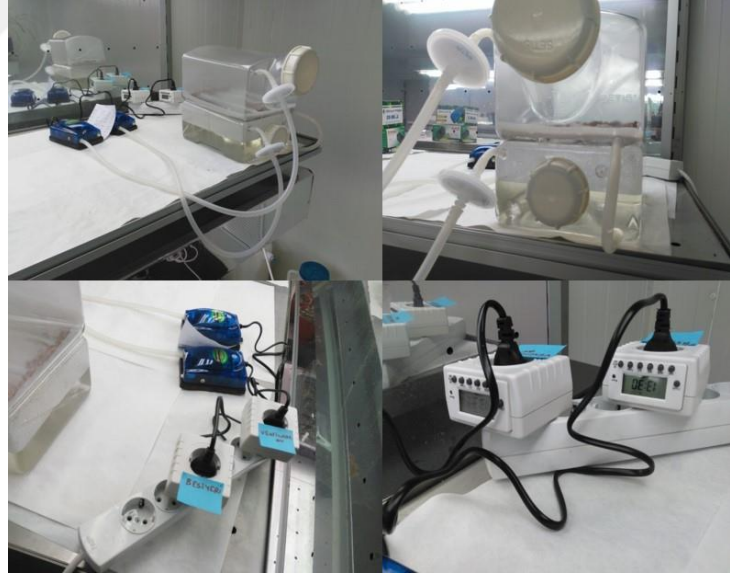
8-10 hafta süresince katı besiyerinde gelişen kallusların bir kısmının 4 hafta katı besiyerinde kültürüne devam edilmiş, 4 hafta sonunda kontrol örneği olmak üzere ekstraksiyon için tartılarak -20°C'de muhafaza edilmek üzere buzdolabına alınmıştır.

Kalluslar 8-10 hafta sonunda biyoreaktör sistemine uygun büyüklüğe ve yapıya geldiklerinde, K1 besiyerinin agar eklenmemiş sıvı formu ile birlikte biyoreaktör sistemine aktarılmıştır.



Şekil 8: Biyoreaktör sistemine aktarılabilecek ve çalışmalara devam edilebilecek kallus boyutlarının görseli.

Çalışmada SETIS™ (katalog no: SE01, Vervit) model ticari bir geçici daldırma sistem biyoreaktörü kullanılmıştır. Sistemde hava basıncını yaratabilmek için 0,1-0,3 bar çalışma aralığı olan basit bir elektromanyetik pompa kullanılmıştır. Sistemde daldırma döngüsünü kontrol edebilmek amacıyla dijital zaman saati kullanılmıştır. Döngü programı olarak 24 saatlik periyotta 5 dakikalık daldırma evresini takiben 4 dakikalık havalandırma evresi kullanılmıştır.



Şekil 9: SETIS model geçici daldırma sistemi (TIS) biyoreaktörünün genel görünümü.

Biyoreaktör içinde 4 hafta kültürün sonunda oluşan kalluslar alınarak, kontrol örneği olmak üzere ekstraksiyon için tartılmış, -20°C'de muhafaza edilmek üzere buzdolabına kaldırılmıştır.

Alt kültürde 8-10 hafta sonunda uygun büyüklüklere gelen kalluslar K1 besiyerine litrede 10µM konsantrasyona sahip olacak şekilde Jasmonik asit eklenerek; agarlı formülasyonu petride,

agarsız formülasyonu biyoreaktörde kültüre alınmıştır. 4 haftalık kültür sonunda oluşan kalluslar, ekstraksiyon için tartılarak -20°C’de muhafaza edilmek üzere buzdolabına alınmıştır.

4 tip (Kontrol Petri, Kontrol Biyoreaktör, JA Petri ve JA Biyoreaktör) kültürden alınan yaş kalluslar 2 biyolojik tekrarlı çalışılmak üzere 15 gr ($\pm 0,05$) tartılarak, ekstraksiyon için -20°C’de muhafaza edilmek üzere buzdolabına alınmıştır.

3.2.4. Ekstraksiyon

Farklı kültürlerden elde edilen yaş materyalden 2 biyolojik tekrarlı olmak üzere 15 gr ($\pm 0,05$) tartılan ve muhafaza edilen kalluslar Christ Alpha marka liyofilizatörde -55 °C’de 48 saat dondurularak kurutulmuştur. Kurutulan *Salvia officinalis* L. kallusları 1 gram tartılarak üzerlerine 5 mL %80 metil-alkol eklenmiştir. Kudos marka SK3310HP model ultrasonik su banyosunda 53 kHz frekans ve 160 watt parametreleri ile 30 dakika 40 °C’de tutulmuştur. Karışım +4 °C’de 20 dakika 10.000 rpm’de santrifüj edildikten sonra supernatantı alınarak, kalan süzüntüye 5 mL %80 metanol eklenmiş ve tekrar ultrasonik su banyosuna koyularak 30 dakika 40 °C’de ekstrakte edilmiştir. Karışım +4°C’de 20 dakika 10.000 rpm’de santrifüj edilerek süpernatantı alınmıştır. Birleştirilen süpernatantlar 0,22 µm membran filtresinden geçirildikten sonra 10 mL’ye %80 metanol ile tamamlanarak analize kadar -20 °C’de saklanmıştır.

3.2.5. Analiz

Ekstrakte edilen örneklerin analizleri İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü Çevre, Gıda ve Enstrümantal Analiz Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Analizler sırasında laboratuvarda bulunan ve Tablo 6’da gösterilen cihazlar kullanılmıştır.

Tablo 8: Çevre, Gıda ve Enstrümantal Analiz Laboratuvarında bulunan ve çalışmalarda kullanılan altyapı/ekipmanlar.

Laboratuvarda Bulunan Altyapı/Ekipman Türü (Laboratuvar, Araç, Makine-Teçhizat, vb.)	Çalışmalarda kullanım amacı
Multivapor	Solventlerin uzaklaştırılmasında kullanılacaktır.
Ultrasonik Su Banyosu	Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılacaktır.
pH metre	Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılacaktır.
Hassas Terazi	Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılacaktır.
Ultrasonik Ekstraksiyon (5-30 ml)	Biyoaktif madde ekstraksiyonunda kullanılacaktır.
Azot altında uçurma sistemi	Solventlerin uzaklaştırılmasında kullanılacaktır.
Elisa Microplate Reader	Biyoaktif madde analizlerinde kullanılacaktır.
Çeker Ocak	Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılacaktır.
Etüv	Ekstraksiyonlarda kullanılacaktır.

Tablo 8'in devamı

Santrifüj	Ekstraksiyonlarda kullanılacaktır.
Liyofilizatör	Ekstraksiyonlarda kullanılacaktır.
Distile Su Sistemi (Type I)	Ekstraksiyonlarda kullanılacaktır.
Soğutmalı Santrifüj	Ekstraksiyonlarda kullanılacaktır.
Vakum Filtrasyon Sistemi	Ekstrakt filtrelemesinde kullanılacaktır.

Bu tez çalışmasında elde edilen kallusların toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesi için Modifiye Folin-Ciocalteu yöntemi, toplam flavonoid miktarlarının belirlenmesi için $AlCl_3$ kolorimetrik yöntemi, toplam antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için CUPRAC ve CERAC yöntemleri kullanılmıştır. Analizler her bir yöntem ve ekstrakt için 5 teknik tekrarlı olmak üzere gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1. Toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesi

Folin ve Ciocalteu (1927) tarafından geliştirilen yöntem önceleri protein analizi için kullanılmaktaydı. Bu yöntem ilk olarak Singleton ve diğ. (1999) tarafından, günümüzde rutin olarak toplam fenolik maddelerinin miktarının tayin edilmesinde kullanılmaktadır. Yöntem fenolik bileşiklerden, molibdenyuma'a elektron transfer edilmesi temeline dayanmaktadır. Spektrofotometrik olarak 750-765 nm'de mavi renkli kompleksin oluşumu ile belirlenir. Gallik asit genellikle kullanılan standarttır, bu sebeple sonuçlar gallik asit eşdeğeri (mg/L) olarak ifade edilmektedir.

Modifiye Folin-Ciocalteu yöntemi çözeltilerinin hazırlanması;

Folin-Ciocalteu fenol reaktifi, distile su ile 1:5 (v/v) oranında seyreltilerek stok hazırlanmıştır. 40 gr Sodyum hidroksit (NaOH) 'den tartılarak bir miktar distile ultrasonik su banyosunda çözdürülmüş, stok olması amacıyla 1000 ml'ye distile su ile tamamlanmak üzere balon jøjeye aktarılmıştır.

Prosedür;

50 µl Folin-Ciocalteu fenol reaktifi, 50 µl örnek ekstraktı ve 100 µl NaOH çözeltisi karıştırılarak 3 oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 760 nm'de kör çözeltiliye karşı absorbansları ölçülmüştür. Ölçümlere göre hazırlanan ekstraktların mg / nmol gallik asit/g örnek eşdeğeri cinsinden toplam fenolik miktarı hesaplanmıştır.

3.2.5.2. Toplam Flavonoid Madde miktarlarının belirlenmesi

Toplam flavonoid madde miktarlarının belirlenmesinde Alüminyum Klorür Kolorimetrik Metodu kullanılmıştır. Metodun temeli “alüminyum klorürün, flavonoidlerin hidroksil grubları ile kararlı bir asit kompleksinin oluşturulmasına” dayanmaktadır. Oluşan bu komplekslerin dalga boyu Chang ve diğ. (2002) tarafından 415-440 nm olarak verilmiştir.

Alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi çözeltilerinin hazırlanması;

12,5 gr sodyum nitrit (NaNO_2) tartılarak, 100 ml saf suda çözündürülmüş, 250 ml'ye saf su ile tamamlanmak üzere balon jojeye aktarılmış, stok % 5'lik Sodyum Nitrit (NaNO_2) çözeltisi hazırlanmıştır. 25 gr alüminyum klorür ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) tartılarak, 150 ml saf suda çözündürülmüş, 250 ml'ye saf su ile tamamlanmak üzere balon jojeye aktarılmış, stok % 10'luk alüminyum klorür ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi hazırlanmıştır. 40 gr Sodyum hidroksit (NaOH) 'den tartılarak bir miktar distile/saf suda ultrasonik su banyosunda çözündürülmüş, stok olması amacıyla 1000 ml'ye distile su ile tamamlanmak üzere balon jojeye aktarılmıştır.

Prosedür:

4-x ml distile su, x ml örnek ve 0,3 ml NaNO_2 çözeltisi karıştırılarak, karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında karışıma 0,6 ml $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi eklenmiş ve karışım 6 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında karışıma 2 ml NaOH çözeltisi ve 3,1 ml distile su eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 510 nm'de kör çözeltiliye karşı absorbansları ölçülmüştür. Ölçülen değerlere göre, hazırlanan ekstraktların mmol kateşin/g örnek eşdeğeri cinsinden toplam flavonoid miktarı hesaplanmıştır.

3.2.5.3. Toplam Antioksidan Madde Miktarlarının belirlenmesi

Toplam antioksidan madde miktarlarının belirlenmesinde CUPRAC ve CERAC olmak üzere iki yöntem kullanılmıştır.

CUPRAC yönteminin prensibi, Apak ve diğ. (2004) tarafından, kromojenik yükseltgen olan Cu(II) - neokuproin (Nc) reaktifi antioksidanlar ile reaksiyona girerek indirgenmesi sonucunda oluşan Cu(I) -Nc kelat kompleksinin 450 nm'de absorbansının ölçülmesi olarak ifade edilmiştir.

CERAC yönteminin prensibi, Özyurt ve diğ. (2007) tarafından, sülfat asitli Ce (IV) iyonlarının antioksidanlar ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan Ce (III) iyonlarının absorbansının Ce (IV)

iyonlarının absorbanslarının farkına bakılarak toplam antioksidan miktarının hesaplanması olarak ifade edilmiştir.

CUPRAC yöntemi çözeltilerinin hazırlanması:

0,4262 gr $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartıldıktan sonra $1,0 \times 10^{-2}$ M Cu (II) klorür stok çözeltisi hazırlamak için 250 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır. 0,156 gr neocuproin (Nc) tartılarak bir miktar %97'lik etil alkolde çözdürüldükten sonra $7,5 \times 10^{-3}$ M neocuproin (Nc) stok çözeltisi hazırlamak için 100 ml'ye etil alkol ile tamamlanmıştır. 19,27 gr amonyum asetat (NH_4Ac) tartılarak bir miktar saf suda çözdürüldükten sonra 1,0 M amonyum asetat (NH_4Ac) stok çözeltisi hazırlamak amacıyla 250 ml'ye saf su ile tamamlanarak balon jojeye aktarılmıştır.

Prosedür:

1ml Cu (II) klorür çözeltisi, 1ml neocuproin (Nc) çözeltisi ve 1 ml NH_4Ac çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra, x ml örnek eklenerek (1,1-x ml) H_2O ile 4,1 ml'ye tamamlanmıştır. İlgili karışım 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 450 nm'de kör çözeltiliye karşı absorbansları ölçülmüştür. Hazırlanan ekstraktların mmol Troloks/g örnek eşdeğeri cinsinden toplam antioksidan miktarları hesaplanmıştır.

CERAC yöntemi çözeltilerinin hazırlanması:

0,0404 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tartılarak bir miktar saf su ile çözdürüldükten sonra $1,0 \times 10^{-3}$ M Ce(IV) stok çözeltisi hazırlamak amacıyla 100 ml'ye saf su ile tamamlanarak balon jojeye aktarılmıştır. 17,0 ml % 98'lik H_2SO_4 stok çözeltisi hazırlamak amacıyla 100 ml'ye saf su ile eklenerek tamamlanmıştır.

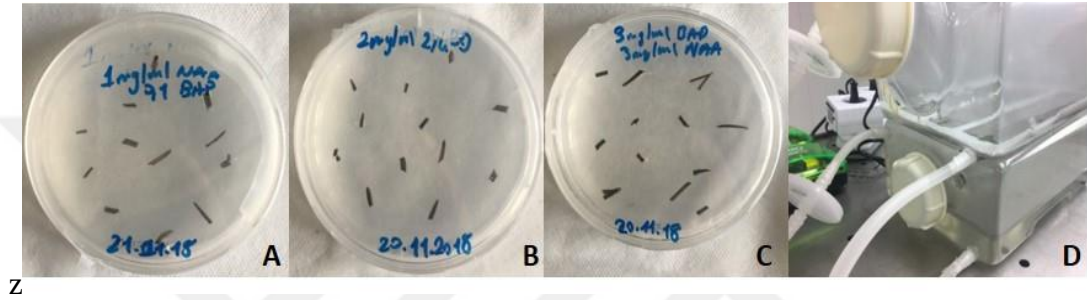
Prosedür:

1 ml Ce (IV) çözeltisi, x ml örnek eklenerek ve (9-x) ml H_2O karıştırılarak 10 ml'ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında 30 dakika beklendikten sonra 320 nm'de kör çözeltiliye karşı absorbansları ölçülmüştür. Hazırlanan ekstraktların mmol Troloks/g örnek eşdeğeri cinsinden toplam antioksidan miktarları hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

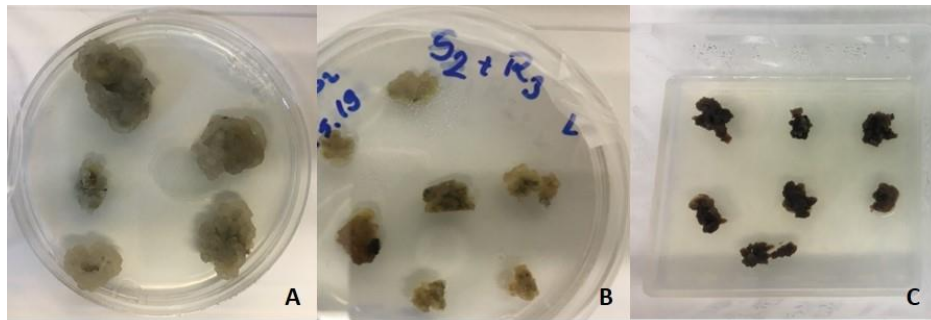
4.1. ÖN DENEMELER

Ön denemelerde *Rosmarinus officinalis* L. örneklerinden hazırlanan eksplantların F1, F2, F3 ve FB1 besiyerleri ile hazırlanan 8 haftalık deneme kültürleri sonucunda herhangi bir kallus oluşumu gözlemlenmemiştir (Şekil 10). Kültür gelişimi gözlenmeyen F1, F2, F3 ve FB1 besiyerleri ile çalışmalara devam edilmemiştir.



Şekil 10: F1 (A), F2 (B), F3 (C) ve FB1 (D) besiyerlerinde 8 hafta sonunda kallus gelişimi gözlenmeyen örnekler.

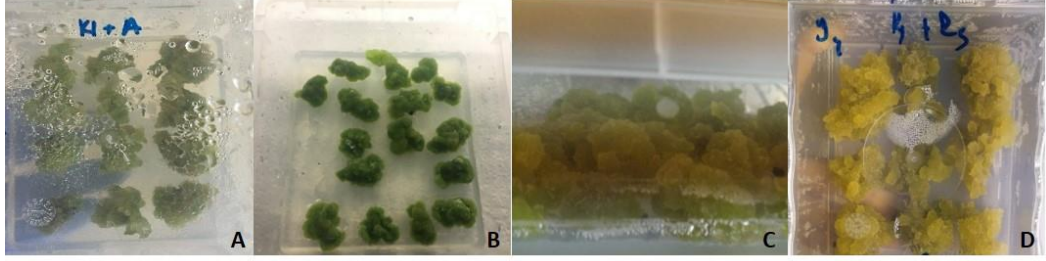
Ön denemelerde *Rosmarinus officinalis* L. örneklerinden hazırlanan eksplantların S1, S2 ve S3 besiyerleri ile hazırlanan 8 haftalık deneme kültürleri sonunda gözlemlenen kallus oluşumları ve büyüklükleri Şekil 11'deki gibi gözlemlenmiştir. S1 ve S2 besiyerlerinde oluşan kalluslar beyaz renkli ve kırılgan olmasından ötürü biyoreaktör çalışmaları için uygun görülmemiştir. S3 besiyerinde ise doku kararmaları gözlemlenmiştir. Kallus gelişimleri uygun görülmeyen S1, S2 ve S3 besiyerleri ile çalışmalara devam edilmemiştir.



Şekil 11: S1 (A), S2 (B), S3 (C) besiyerlerinde 8 hafta sonunda kallus gelişimi

Ön denemeler sırasında, K1 besiyerinde 8 haftalık kültür sonunda *Rosmarinus officinalis* L. ve *Salvia officinalis* L. örneklerinden alınan eksplantlarda uygun kallus oluşumu ve kallus

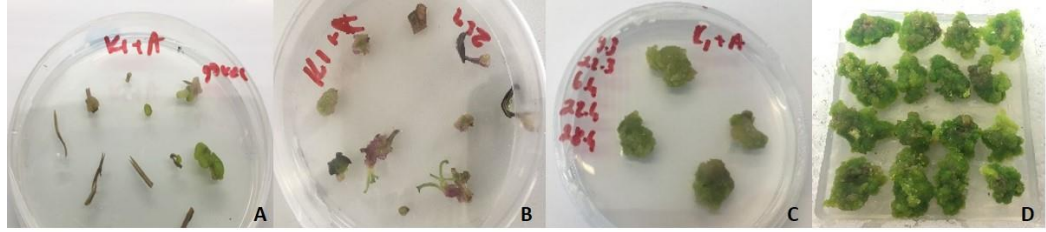
büyüklüğü Şekil 12'deki gibi gözlemlenmiştir. K1 besiyerinde mevcut olan Dicamba sentetik oksininin iki bitkide de etkili ve hızlı kallus gelişimine etki etmesinden ötürü, çalışmalara K1 besiyeri formülasyonu ile devam edilmiştir.



Şekil 12: K1 besiyerinde gelişimleri uygun görülen *Salvia officinalis* L. (A ve B) ve *Rosmarinus officinalis* L. (C ve D) kallusları

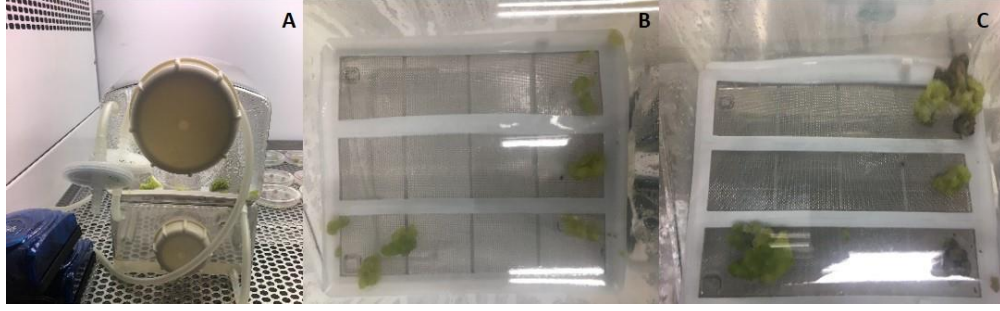
4.2. TIBBİ ADAÇAYI (*Salvia officinalis* L.) BİTKİSİNDEN KALLUS KÜLTÜRÜ ELDESİ

K1 besiyerinde *Salvia officinalis* L. türünün yaprak ve gövde parçalarından karışık olarak alınan eksplantların 8-10 haftalık gelişimi, çoğalması ve kültüre adaptasyonu Şekil 13'teki gibi gözlemlenmiştir.



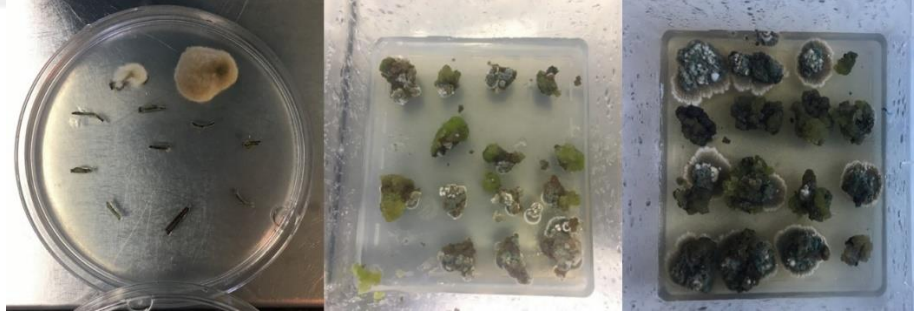
Şekil 13: K1 besiyerinde *Salvia officinalis* L. kalluslarının 3. (A), 4. (B), 7. ve 10. haftalardaki gelişimi.

Biyoreaktör ortamında K1 besiyerinde, *Salvia officinalis* L. eksplantlarından elde edilen kallusların 4 haftalık kültürde gelişimi ve çoğalması Şekil 14'teki gibi gözlemlenmiştir.



Şekil 14: Biyoreaktör uygulamalarında K1 besiyerinin sıvı formunda *Salvia officinalis* L. eksplantlarından elde edilen kalluslarının 2. (B) ve 4. (C) haftalardaki gelişimi ve biyoreaktörün genel görünümü (A).

Çalışmalar sırasında *Salvia officinalis* L. eksplantlarının stok kültür olarak muhafaza edilmesi ve tüm çalışmalar sırasındaki kültürlerinde, çeşitli aşamalarda katı kültürlerde kontaminasyon belirtileri gözlemlenmiştir (Şekil 15). Kontaminasyonun katı besiyerinde bulaşmadığı eksplantlar yeni kültürlerle aktarıl原因 olarak kültürlerine kontaminasyon belirtisi göstermeden devam edilebilmiştir. Bu durum besiyerine eklenen PPM solüsyonunun kontaminasyonun hızlı bir şekilde yayılmasını inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır. Kontaminasyon belirtisi gösteren kalluslar kaybedilmiştir.



Şekil 15: Çeşitli aşamalarda katı kültürlerde karşılaşılan kontaminasyonların görünümü

TIS biyoreaktöründe sıvı kültür ile gelişen kalluslarda kontaminasyon belirtisi gözlemlenmemiştir. Katı kültürde bu kadar kontaminasyon görülmesinin sebebi, 2 haftalık besiyeri değişimi sırasında kallusların bulundukları ortamın açılarak; yeni besiyerine fiziksel olarak aktarılmasından kaynaklanmaktadır. SETIS biyoreaktör sisteminde, besiyerinin ve bitki materyalinin bulundukları kapların farklı olması; bitki materyallerinin fiziksel olarak başka bir kaba aktarılmadan besiyeri değişiminin yapılabilmesi kontaminasyon sorununu en aza indirmektedir.

Çalışmalar sırasında *Salvia officinalis* L. eksplantlarının stok kültür olarak muhafaza edilmesi ve tüm çalışmalar sırasındaki kültürlerinde, çeşitli aşamalarda zaman zaman kalluslarda oksidasyona bağlı kararmalar gözlemlenmiştir. Bu kararmalar yeni besiyerine aktarım işlemleri sırasında temizlenerek kültürlere devam edilmiştir.

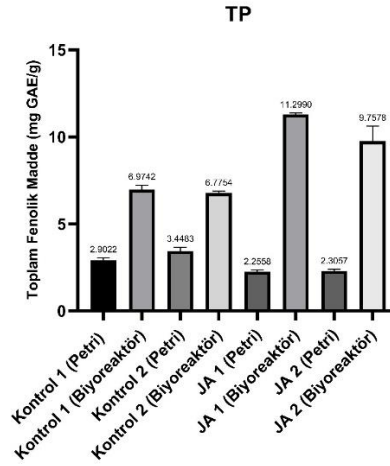


Şekil 16: Çalışmalar sırasında gözlemlenen doku kararması için örnek görüntüsü.

4.3. FİTOKİMYASAL ANALİZLER

Katı besiyerinde 4 hafta kültüre alınan kallusların 2 biyolojik tekrar yapılarak elde edilen ekstraktları Kontrol 1 (Petri) ve Kontrol 2 (Petri) olarak isimlendirilmiştir. Sıvı besiyerinde TIS biyoreaktörü içinde 4 hafta kültüre alınan kallusların 2 biyolojik tekrar yapılarak elde edilen ekstraktları Kontrol 1 (Biyoreaktör) ve Kontrol 2 (Biyoreaktör) olarak isimlendirilmiştir. Jasmonik asit uygulanmış katı besiyerinde 4 hafta kültüre alınan kallusların 2 biyolojik tekrar yapılarak elde edilen ekstraktları JA 1 (Petri) ve JA 2 (Petri) olarak isimlendirilmiştir. Jasmonik asit uygulanmış sıvı besiyerinde TIS biyoreaktörü içinde 4 hafta kültüre alınan kallusların 2 biyolojik tekrar yapılarak elde edilen ekstraktları JA 1 (Biyoreaktör) ve JA 2 (Biyoreaktör) olarak isimlendirilmiştir.

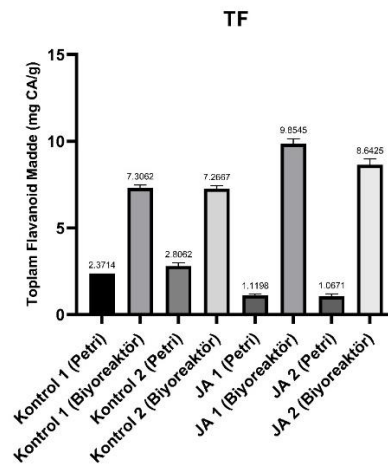
Elde edilen tüm ekstraktların analizi sonucunda tespit edilen toplam fenolik madde miktarlarının karşılaştırılması Şekil 17'deki gibidir.



Şekil 17: Ekstrakların analizi sonucunda toplam fenolik maddelerin karşılaştırılması.

Yapılan analiz sonucunda ortalama olarak toplam fenolik madde miktarında Kontrol Petri örneğine göre Kontrol Biyoreaktör örneğinde 2,17 kat, yani %117’lik bir artış tespit edilmiştir. JA Petri örneğine göre JA Biyoreaktör örneğinde 4,62 kat, yani %362’lik bir artış tespit edilmiştir. Kontrol Petri örneğine göre JA Petri örneğinde 0,72 kat, yani %28’lik bir düşüş tespit edilmiştir. Kontrol Biyoreaktör örneğine göre JA Biyoreaktör örneğinde 1,53 kat, yani %53’lük bir artış tespit edilmiştir.

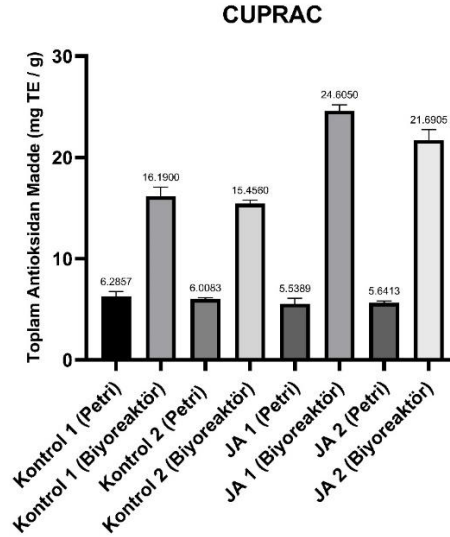
Elde edilen tüm ekstrakların analizi sonucunda tespit edilen toplam flavonoid madde miktarlarının karşılaştırılması Şekil 18’deki gibidir.



Şekil 18: Ekstrakların analizi sonucunda toplam flavonoid maddelerin karşılaştırılması.

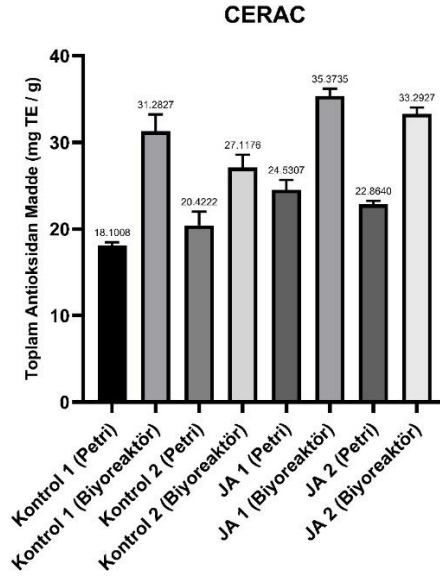
Yapılan analiz sonucunda ortalama toplam flavonoid madde miktarında Kontrol Petri örneğine göre Kontrol Biyoreaktör örneğinde 2,81 kat, yani %181’lik bir artış tespit edilmiştir. JA Petri örneğine göre JA Biyoreaktör örneğinde 7,46 kat, yani %746’lık bir artış tespit edilmiştir. Kontrol Petri örneğine göre JA Petri örneğinde 0,42 kat, %58’lik bir düşüş tespit edilmiştir. Kontrol Biyoreaktör örneğine göre JA Biyoreaktör örneğinde 1,27 kat, yani %27’lik bir artış tespit edilmiştir.

Elde edilen tüm ekstraktların CUPRAC ve CERAC yöntemleri ile yapılan analizi sonucunda tespit edilen toplam antioksidan madde miktarlarının karşılaştırılması Şekil 19 ve Şekil 20’deki gibidir.



Şekil 19: Ekstraktların CUPRAC yöntemi ile analizi sonucunda toplam antioksidan maddelerin karşılaştırılması.

Yapılan CUPRAC yöntemi analizi sonucunda ortalama olarak toplam antioksidan madde miktarında Kontrol Petri örneğine göre Kontrol Biyoreaktör örneğinde 2,57 kat, yani %157’lik bir artış tespit edilmiştir. JA Petri örneğine göre JA Biyoreaktör örneğinde 4,14 kat, yani %314’lük bir artış tespit edilmiştir. Kontrol Petri örneğine göre JA Petri örneğinde 0,91 kat, %9’luk bir düşüş tespit edilmiştir. Kontrol Biyoreaktör örneğine göre JA Biyoreaktör örneğinde 1,46 kat, yani %46’lık bir artış tespit edilmiştir.



Şekil 20: Ekstrakların CERAC yöntemi ile analizi sonucunda toplam antioksidan maddelerin karşılaştırılması.

Yapılan CERAC yöntemi analizi sonucunda ortalama olarak toplam antioksidan madde miktarında Kontrol Petri örneğine göre Kontrol Biyoreaktör örneğinde 1,52 kat yani %52'lik bir artış tespit edilmiştir. JA Petri örneğine göre JA Biyoreaktör örneğinde 1,45 kat, yani %45'lik bir artış tespit edilmiştir. Kontrol Petri örneğine göre JA Petri örneğinde 1,23 kat, %23'luk bir artış tespit edilmiştir. Kontrol Biyoreaktör örneğine göre JA Biyoreaktör örneğinde 1,18 kat, yani %18'lik bir artış tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasından elde edilen verilerin, yerli gen kaynaklarımızda bulunan bitkilerin ekonomik değeri yüksek sekonder metabolitlerinin üretiminde kullanılabilecek yüksek potansiyele sahip geçici daldırma sistemi biyoreaktörleri ve faydaları konusu araştırılarak literatüre katkı sağlaması hedeflenmiştir. Bitki doku kültürü teknikleri yoluyla, *Salvia officinalis* L. eksplantlarından kallus kültürü oluşturulmasını takiben, kallus kültürünün geçici daldırma sistemi (TIS) biyoreaktöründe alt kültüre alınarak, jasmonik asit uygulaması ile sekonder metabolit üretiminin artırılması hedeflenerek çalışma planlanmıştır. Farklı yöntemlerin birlikte kullanımının *in vitro* koşullarda sekonder metabolitlerin üretiminde etkilerinin gözlemlenmesi ve bu konuda öncü verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

Aynı familyaya ait *Rosmarinus officinalis* L. türünde ön denemeler ve geçici daldırma sistemi biyoreaktörü optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. 7 farklı formülasyona sahip besiyeri denenmiş ve çalışmalar için en uygun kallus gelişimi gösteren besiyeri belirlenmiştir.

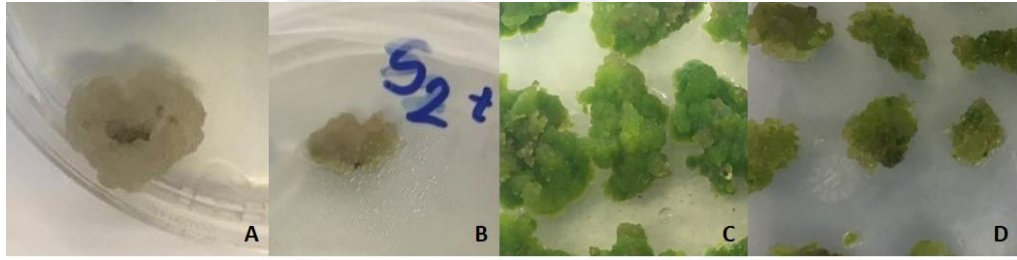
Tez çalışmasının amacı doğrultusunda *Salvia officinalis* L. türünden elde edilen eksplantların katı ortamda kallus kültürü ile kontrol grubu oluşturulmuş; kontrol kallusları, jasmonik asit uygulanmış katı ortamda ve biyoreaktörde ayrıca jasmonik asit uygulanmamış biyoreaktörde kültüre alınmıştır. Kültürler sonunda 4 kültür tipine ait kalluslardan elde edilen ekstraktlar toplam fenolik, flavanoid ve antioksidan bileşikleri tespit edilmiş, karşılaştırılmış ve sekonder metabolit üretimi için TIS biyoreaktöründe jasmonik asit uygulamasının etkili olduğu görülmüştür.

Salvia officinalis'in kallus kültürünün başarılı bir şekilde TIS Biyoreaktöründe devamlılığı sağlanmış, süreçte TIS biyoreaktöründe üretilen kalluslar yüksek biyokütle artışı, hızlı büyüme ve gelişme göstermiştir. Katı ortamda oluşan kalluslar ile karşılaştırıldığında, TIS biyoreaktöründe gelişen kalluslarda toplam fenolik, flavaonoid ve antioksidan madde miktarlarında anlamlı artışlar görülmüştür.

Ön denemelerde *Rosmarinus officinalis* L. eksplantlarının kültürde kallus oluşturulması amacıyla 1 mg/mL NAA + 1mg/mL 6-BAP, 2 mg/mL 2,4-D, 3 mg/mL NAA + 3 mg/mL 6-BAP, 3,3 mg/mL Dicamba, 3 mg/mL 6-BAP, 1 mg/mL Kinetin + 1 mg/mL TDZ, 3 mg/mL Kinetin + 3 mg/mL TDZ olmak üzere kullanılan 7 farklı hormon konsantrasyonundan; sadece

3,3 mg/mL Dicamba hormon konsantrasyonunda çalışma için istenen sıkı ve sert formatta, kompakt (Tip 1), yeşil veya koyu yeşil renkte ve stabil kallus oluşumu gözlenmiştir.

1 mg/mL Kinetin + 1 mg/mL TDZ, 3 mg/mL Kinetin + 3 mg/mL TDZ hormon konsantrasyonlarında oluşan kalluslar stabil olsa da kırılğan (Tip 2) formatta ve beyaz renkte olduklarından biyoreaktör çalışmaları için uygun görülmemiştir. Tip 1 ve Tip 2 kallus tipleri Armstrong ve ve Green (1985) tarafından embriyonik *Zea mays* L. bitkisinde tanımlanmıştır. Ayrıca kullanılan diğer bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarına göre 3,3 mg/mL Dicamba'nın doku çoğalma hızında gözle görülebilir olumlu etkileri tespit edilmiştir. İlgili konsantrasyon *Salvia officinalis* L. bitkisinde de kullanıldığında ikinci alt-kültür sonrasında çalışma için istenen sıkı, sert, yeşil veya koyu yeşil renkte kallus oluşumu Şekil 21'deki gibi gözlenmiştir.

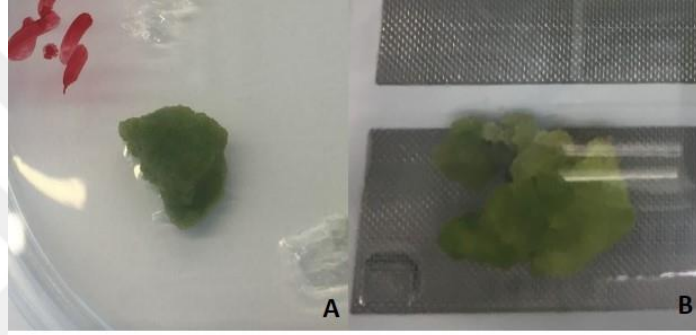


Şekil 21: Biyoreaktör çalışmalarına uygun görülmeyen kırılğan (Tip 2) formatta ve beyaz renkte kalluslar (A ve B), çalışmalara uygun görülen kompakt (Tip 1), yeşil veya koyu yeşil renkte kalluslar (C ve D).

Papenfuss ve Carman (1987) tarafından *Triticum aestivum* L. bitkisi ile yapılan çalışmalarda Dicamba'nın farklı evrelerde kallus oluşumuna olumlu etkileri tespit edilmiştir. Ayrıca Nyochembeng ve Garton (1996), *Xanthosoma sagittifolium* ile yaptıkları çalışmada gövde ve petiyolden elde edilen eksplantlar ile Dicamba, 2-iP ve Thidiazuron kullanılarak oluşturulan kültürlerinde kallus oluşumunu incelemişlerdir. 1,36-13,6 μ M aralığında Dicamba konsantrasyonuna sahip besiyerlerindedeki 3 hafta sonunda petiyolden elde edilen eksplantların %70'inde, gövdeden elde edilen eksplantların %50'sinde etkin kallus oluşumu rapor etmişlerdir. En yüksek kallus ağırlığının her iki eksplant tipi içinde 1,36 μ M Dicamba konsantrasyonuna sahip besiyerinde elde edildiğini bildirmişlerdir. Buna ek olarak Dicamba ile 0,045 μ M konsantrasyonda kullanılan Thidiazuron'un tüm Dicamba konsantrasyonlarında kallus ağırlığına olumlu etkilerini rapor etmişlerdir. Bu bilgiler ışığında sentetik bir oksin olan

Dicamba'nın *Rosmarinus officinalis* L. ve *Salvia officinalis* L. bitkilerine ek olarak, birçok başka bitkinin kallus kültürü elde edilmesi çalışmalarında olumlu etkileri olacağı ve benzer çalışmaları yapılabileceği sonucu çıkarılabilir. Dicamba'nın farklı bitkilerde ve farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile birlikte etkileri detaylı olarak bu veriler öncülüğünde araştırılabilir.

Salvia officinalis L. eksplanlarından elde edilen kallusların 4 haftalık kültürü sonunda K1 besiyerinin biyoreaktörde sıvı formunda, katı formuna göre daha yüksek biyokütle artışı ve doku çoğalması gözlenmiştir. 4 haftalık kültür sonunda katı besiyerinde ve biyoreaktörde sıvı formunda oluşan kallus büyüklükleri Şekil 22'deki gibi gözlemlenmiştir.



Şekil 22: *Salvia officinalis* L. kalluslarının katı besiyerinde (A) ve TIS biyoreaktöründe 4 haftalık kültür sonundaki görünümü.

Katı kültürlerle göre, geçici daldırma sistemi biyoreaktörlerinde tespit edilen bu durum, Arencibia ve diğ. (2013) tarafından *Vaccinium corymbosum* L.'de katı kültüre göre, TIS biyoreaktöründe 26,2 kat çoğaltma katsayısı tespit ettikleri sonuçları desteklemektedir. Mujib ve diğ. (2014), *Catharanthus roseus* ile yaptıkları çalışmada kallus oluşumunu katı besiyeri, kültür şişesinde sıvı besiyeri ve TIS biyoreaktöründe sıvı besiyeri olmak üzere 3 farklı kültür ortamında karşılaştırmışlardır. 45 günlük kültür sonunda kallus biyokütlesini katı besiyerinde 1,65 g, kültür şişesi içinde sıvı besiyerinde 1,95 g olarak bildirmiş, en yüksek kallus biyokütlesini TIS biyoreaktöründe 2,11 g olarak tespit etmişlerdir. McAlister ve diğ. (2005), 6 *Eucalyptus* klonu ile yaptıkları kültür çalışmalarında katı ortam ve TIS biyoreaktöründeki gelişimlerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda 100 sürgün ile başlayan kültürlerde 28 gün sonunda katı agarda oluşan sürgün adetlerinin farklı klonlarda 2 ya da 3 kat daha fazlasının 14 gün sonunda TIS biyoreaktöründe elde edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca McAlister ve diğ. (2005), TIS biyoreaktöründen elde edilen bitkiciklerin kalitesinin katı ortama göre çok daha

yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Alvarez ve diğ. (2021), *Colocasia esculenta* L. Schott ile farklı tip biyoreaktörler ve katı agar kullanarak yaptıkları çalışmada, en yüksek sürgün rejenerasyonu ve en yüksek çoğalma katsayılarını katı agara göre TIS biyoreaktöründe 6 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda kallus biyokütlesinin artırılmasında katı besiyerine göre TIS biyoreaktörünün çok daha etkili olduğu anlaşılmaktadır. Mevcut veriler, sıvı kültürlerde özellikle TIS biyoreaktörünün kallus kültüründe biyokütle artışında başarılı olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu sistemlerde farklı bitki kültürlerinin hızlı ve sağlıklı gelişiminin mümkün olduğu ifade edilebilir. Alvarez ve diğ. (2021) bu konuda SETIS™ sisteminin yarı otomasyona izin vererek, düşük maliyetle, canlılığı yüksek kaliteli bitki üretimine olanak sağlayacağını belirtmişlerdir.

Vendrame ve diğ. (2022), *Brassavola nodosa* L. ile yaptıkları çalışmada katı ortam ve TIS biyoreaktörünün in vitro sürgün çoğalma katsayılarına etkilerini karşılaştırmışlardır. Katı ortamda çoğalma katsayısı 2,8 sürgün/eksplant tespit edilirken, TIS biyoreaktöründe bu oran 4,6 sürgün/eksplant olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Vendrame ve diğ. (2022) TIS biyoreaktöründe farklı döngü frekanslarında çoğalma katsayılarının değiştiğini belirtmişlerdir. Bu durum TIS biyoreaktörlerinin kullanıldığı çalışmalarda döngü frekanslarının optimizasyonunun önemine işaret etmektedir. Bu sebeple TIS biyoreaktörlerinin kullanılacak bitkide farklı döngü frekanslarındaki etkilerinin de araştırılması önemlidir.

Salvia officinalis L.'in, özellikle kontrol olarak kullanılan katı besiyerinde elde edilen kalluslarına ek olarak, tüm örneklerde tespit edilen fenolik, flavanoid ve antioksidan bileşikler, Alberto ve diğ. (1998) in vitro ortamda *Hypericum perforatum*'un kallus kültürlerinde flavonoid bileşikleri tespit etmeleri ile tutarlıdır. Bitkilerin kallus kültürlerinin sekonder metabolit içerdiği sonucunu desteklemektedir. Bu konuda güncel olarak Perez-Alonso ve diğ. (2011), *Digitalis lanata* sürgün kültüründe TIS biyoreaktörü kullanarak çeşitli elisitör uygulamaları ile gerçekleştirdikleri çalışmada; TIS biyoreaktöründe elisitör uygulanmadan bile sürgünlerde sekonder metabolit içeriğinin tespit edildiğini bildirmişlerdir. Tez çalışması kapsamında elde edilen veriler, literatürde mevcut olan, bitkilerin katı besiyeri ya da TIS biyoreaktörlerindeki kallus kültürlerinin sekonder metabolit içerdiği sonuçları ile tutarlıdır.

Salvia officinalis L. kallus kültürlerinde katı besiyerine göre biyoreaktörde üretilen kalluslarda tespit edilen toplam fenolik madde miktarında 2,17 kat, toplam flavonoid madde miktarında 2,81 kat, toplam antioksidan madde miktarında CUPRAC analizine göre 2,57 kat, CERAC

analizine göre 1,52 kat artışlar; Petrova ve diğ. (2014) *Arnica montana* L. kök kültürlerinde toplam lakton miktarının geçici daldırma sistemi biyoreaktöründe, statik sıvı kültüre göre 1,11 kat, katı kültüre göre 2,01 kat artış tespit ettikleri sonuçlar ile tutarlıdır. Sıvı kültürlerin özellikle geçici daldırma sistemi biyoreaktörlerinin klasik yöntemlere göre daha yüksek sekonder metabolit üretimi gerçekleştirdiği sonucunu desteklemektedir.

Yadegari (2018), *Salvia officinalis* L.'in tohum kültürlerinde yaptığı çalışmada jasmonik asit ve salisilik asit uygulamalarının uçucu yağ bileşimleri üzerine etkilerini araştırmıştır. Jasmonik asit ve salisilik asit uygulamalarının kültürde uçucu yağlar üzerinde artan etkileri tespit edilmiş; en iyi elisitasyonun jasmonik asit için 0.1051 g/L ve 0.2102 g/L konsantrasyonlarının, salisilik asit için 0.138 g/L olduğunu belirtmiştir. Jasmonik asit gibi elisitör uygulamasının klasik kültür ortamında, çeşitli metabolitlerin miktarının artırılmasında olumlu etkileri ortadadır. Bu sebeple tez çalışmamızda TIS biyoreaktöründe de benzer etkileri olacağı düşünülerek Jasmonik asit uygulaması yapılmıştır. *Salvia officinalis* L. kallus kültürlerinde JA uygulanmamış biyoreaktöre göre, JA uygulanmış biyoreaktörde üretilen kalluslarda tespit edilen toplam fenolik madde miktarında 1,53 kat, toplam flavanoid madde miktarında 1,27 kat, toplam antioksidan madde miktarında, CUPRAC analizine göre 1,46 kat, CERAC analizine göre 1,18 kat artışlar; Skrzypczak-Pietraszek ve diğ. (2019) tarafından *Centella asiatica* L. kök kültüründe TIS biyoreaktörü kullanılarak yapılan çalışmada kontrol örneğine göre, elisitör (MeJa) uygulanmış örneklerde tespit edilen fenolik asit bileşiklerinde 1,8 kat artış, flavonoid bileşiklerde 1,7 kat artış sonuçlarını desteklemektedir. Ayrıca Gala ve diğ. (2005), *Arabidopsis thaliana* hücre kültüründe yaptıkları çalışmada, ortama eklenen jasmonik asit uygulanmasının başlangıç kültürüne oranla α -tokoferol miktarında %66 gibi yüksek bir oranda artışa yol açtığını bildirmişlerdir. Bu veriler ışığında, elisitör uygulamalarının TIS biyoreaktörlerinde sekonder metabolit üretimini arttırdığı sonucu çıkarılabilir. Tez çalışmamızda birlikte kullanılan bu yöntemlerin, elisitör tipinin ve konsantrasyonlarının detaylı araştırılabileceği çalışmalar için öncü ve destekleyici olacaktır.

Hamrouni –Sellami ve diğ.(2012), *Salvia officinalis* L. ile çeşitli kurutma yöntemlerinin total fenolik bileşik miktarına etkilerini araştırdıkları çalışmada; Folin–Ciocalteu yöntemi kullanılarak tespit edilen toplam fenolik madde miktarlarının kurutma yöntemine göre ana bitkide 0.399-2.337 mg GAE/g aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Tez çalışması kapsamında Kontrol Biyoreaktör örneğinde ortalama 6,874 mg GAE/g ve JA Biyoreaktör örneğinde

ortalama 10,528 mg GAE/g olarak tespit edilen değerlerle, ana bitkiye göre TIS biyoreaktörlerinin toplam fenolik madde miktarında artışa sebep olduğu sonucu çıkarılabilir. Jain ve diğ. (2012), *Sericostoma pauciflorum* ile kallus kültüründe yaptıkları çalışmada, farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin toplam fenolik madde miktarına etkilerini araştırmışlardır. Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak yapılan analizlerde kinetin, indole 3-acetic acid ve indole 3-butyric acid (IBA) bitki büyüme düzenleyicileri arasında en yüksek toplam fenolik madde miktarının 107.33 ± 1.76 mg GAE/g değeri ile IBA'da tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Bu durum ve tez çalışmamızda Dicamba ile edilen veriler, farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin toplam fenolik madde miktarı artışına etkilerinin çok çeşitli olabileceği ve daha detaylı araştırılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

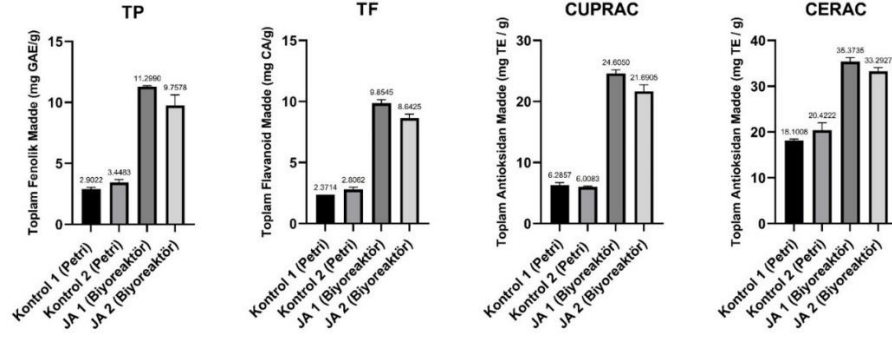
Erçetin (2013), *Arnebia densiflora* kallus kültüründe şikonin ve türevlerinin üretilmesi üzerine yaptıkları çalışmada kallus kültüründe, bitki kök kabuklarından daha düşük şikonin miktarı tespit etmişlerdir. Fakat tespit edilen değerlerin bitki kök kabuklarında doğal yollar ile 5-7 yılda üretildiği, *in vitro* kültürde ise bu süresinin 20-40 günlük olması düşünüldüğünde *in vitro* sıvı kültürlerin değerli metabolit üretimin nasıl süre avantajı sağlayabileceği anlaşılabılır.

Ticari üretimlerde biyokütle artışı ve çoğalma hızının önemi düşünüldüğünde katı ortamların yerine sıvı kültürlerin etkili bir yöntem olabileceği sonucu çıkarılabilir. Trentini ve diğ. (2021), *Arisotelia chilensis* kültürlerinde; optimize edilen TIS biyoreaktörlerinde elde edilen yüksek biyokütle değerleri ile, gıda endüstrisinde kullanılan sekonder metabolitlerinin *in vitro* üretiminde biyokütlenin önemine işaret etmişlerdir.

Tez çalışmamız geçici daldırma sistemi biyoreaktörlerinin mikroçoğaltım dışında farklı çalışmalarda da kullanılabileceği göstermektedir. Bitkilerdeki nadir metabolitlerin klasik yöntemlere göre daha çok üretilmesini sağlayarak tespit edilmesini ve takiben daha kolay izole edilmesini mümkün kılmaktadır. Bu sistemlerin az yer kaplaması, kapalı sistem olması sonucu kontaminasyonu en aza indirmesi ve her adımın kontrol edilebilmesine olanak sağlaması; üretim için kullanılmasında yüksek bir potansiyel göstermektedir.

Bu tez çalışmasında ilk kez birlikte kullanılan yöntemlerin toplam olarak etkileri incelendiğinde, JA Biyoreaktör örneğinde Kontrol Petri örneğine göre ortalama; toplam fenolik madde miktarında 3,3 kat, toplam flavanoid miktarında 3,6 kat, toplam antioksidan miktarında CUPRAC yönteminde 3,8 kat, CERAC yönteminde 1,78 kat artış tespit edilmiştir. *Salvia*

officinalis L. in vitro koşullarda kallus kültürü çalışmalarında, TIS biyoreaktörü kullanılması ve Jasmonik asit elisitörünün uygulanmasının sekonder metabolit üretimini önemli ölçüde arttırdığını göstermektedir. Yöntemin farklı bitkilerde de kullanılabileceği ve olumlu sonuçlar elde edilebileceğini söylemek mümkündür.



Şekil 23: Kontrol Petri ve JA Biyoreaktör örneklerinin toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan miktarlarının karşılaştırılması

Literatürde ayrı ayrı uygulamalarının başarılı olduğu birçok çalışma ile ifade edilmiş olan bu yöntemlerin, bir aradaki uyumunu ve etkisini gözlemek için yaptığımız bu çalışma gösteriyor ki; yöntemlerin birlikte kullanılması mümkün ve etkilidir. Elde edilen sonuçların farklı çalışmalarda, farklı yönleri dikkate alınarak optimize edildiği takdirde değerli ve nadir metabolitlerin gelecekte üretiminde vazgeçilmez olacağı düşünülebilir. Bu yöntemler kullanılarak metabolitlerin oluşum mekanizmalarının araştırılması, bitkilerde düşük miktarlarda bulunan tanımlanmamış metabolitlerin tespit edilmesi, farklı bitkilerde de bu ve benzer çalışmaların yapılması önemlidir. Bu konudaki araştırmaların, söz konusu yöntemler kullanılarak daha kontrollü ve kolay olacağı ifade edilebilir.

Lotfi ve Werbrouck (2020), SETIS gibi geçici daldırma sistemi biyoreaktörlerinin, ticari mikroçoğaltım ya da metabolit üretimi çalışmaları için heyecan verici yeni bir araç olduğunu belirtmişlerdir. Özellikle sistemin kontaminasyondan kaçınarak, özel ilgi gösterildiği takdirde örneklerin her türlü manipülasyonuna izin verdiğini belirtmişler, sistemin farklı çalışmalar için optimizasyonunun araştırılması gerektiğini ifade etmişlerdir.

Ülkemizde mevcut olan floristik zenginlik, endemik ve nadir takson çeşitliliği dikkate alındığında, değerli sekonder metabolitlerin üretimi bakımından bitkisel gen kaynaklarındaki potansiyelin çok yüksek olduğu ve aktif metabolitlerin, tez çalışmamızda kullandığımız yöntemler ile araştırılmasının bilimsel literatüre önemli katkılar sağlaması söz konusudur.

Bunun yanısıra, yerel gen kaynaklarının içerdği sekonder metabolitlerin analiz edilip aydınlatılması, ilaç ham maddeleri ve fonksiyonel gıda ingredientleri olarak ilgili sektörlere girdi yaratan yeni biyoaktif bileşiklerin ve üretim verimliliğinin kazandırılması ve yön verilmesi açısından etkili olacaktır.

Bu tez çalışması kapsamında yeni yöntemlerin ilk kez birlikte kullanılması, söz konusu yöntemlerin uyumlu ve verimli bir şekilde uygulanabileceği konusunda öncü niteliktedir.

Bitki doku kültürü metodolojik kombinasyonlarının test edildiği çalışmamızdan elde edilen veriler; *in vitro* kültür teknikleri içerisinde, konvansiyonel katı ortam kültürü yöntemlerinin yanında, sıvı ortam kültürlerinin ve sıvı ortam kültürlerinin kullanıldığı TIS biyoreaktörlerinin sekonder metabolit üretimine olumlu etkilerini ortaya koymaktadır. TIS biyoreaktörlerinin tespit edilen üstünlüklerine ek olarak, sistemlere jasmonik asit gibi elisitörlerin uygulanması ve kullanılan metodların optimizasyonu ile sekonder metabolit üretiminde belirgin artışlar gözlenmiştir. Bu veriler ışığında sekonder metabolit üretimi ya da tespiti çalışmalarında, söz konusu yöntemlerin birlikte kullanımı ile üretimin olabilecek en yüksek seviyeye çıkarılması mümkün görülmektedir. Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında elde edilen özgün bilimsel bulguların, aynı zamanda üniversite-sanayi iş birliği modeli ile, önemli biyoaktif komponentlerin biyoreaktör sistemleri kullanılarak verimli üretim modelleri oluşturulmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Alberto, D.C.P., Francisco, A., Barberan, T., Ferreria, F.M. & Ferreres, F. 1998. Unusual flavanoids produced by callus of *Hypericum perforatum* L., *Journal of Phytochemistry*, 48, 1165-1168.
- Ali, M., Abbasi, B.H. & Ali, G. S., 2015, Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120(3), 1099-1106.
- Alister, B.M., Finnie, J., Watt, M.P. & Blakeway, F., 2005, Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, 33, 425–442.
- Alp, H.A., Düzyaman, E. & Özzambak, E., 2010, In vitro’da kültüre alınan enginar sürgün uçlarında sağlıklı gelişim oranını artırma olanakları üzerinde bir araştırma, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 47(2), 113-122.
- Andrade, J., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, C.P., & Rijo, P., 2018, *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity, *Future Science OA*, 4(4).
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- Atti-Santos A.C., Rossato, M., Pauletti, G.F., Rota, L.D., Rech, J.C., Pansera, M.R., Agostini, F., Serafini, L.A. & Moyna, P., 2005, Physico-chemical Evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oils, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(6), 1035-1039.
- Begum, A., Sandhya, S., Ali, S.S., Vinod, K.R., Reddy, S. & Banji, D., 2013, An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae), *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 12(1), 61-73.
- Borges, R.S., Ortiz, B.L.S., Pereira, A.C.M., Keita, H. & Carvalho, J.C.T., 2019, *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, antiinflammatory activity, and mechanisms of action involved, *Journal of Ethnopharmacology*, 229, 29-45.
- Çetin, E.S. & Baydar N.G., 2016, Elicitor Applications to Cell Suspension Culture for Production of Phenolic Compounds in Grapevine, *Journal of Agricultural Sciences*, 22, 42-53.
- Chandran, H., Meena, M., Barupal, T. & Sharma, K., 2020, Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds, *Biotechnology Reports*, 26.

- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. & Chern, J.C., 2002, Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods, *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.
- Cosma, A.D. & Vancea, A.P., 2017, The effects of antibiotics and antifungals added to plant culture media of *Triticosecale wittmarck*, *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Biologia*, 62(2), 53-60.
- Davis, P. H., 1982, Flora of Turkey and the east Aegean islands, *Edinburgh University Press*, 7.
- Dönmez, M., Kargioğlu, M., & Temel, M., 2011, *Stachys palustris* L.'in Morfolojik, Anatomik ve Ekolojik Özellikleri, *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences*, 11, 1-9.
- Etienne H., & Berthouly, M., 2002, Temporary immersion systems in plant micropropagation, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 69, 215-231.
- Fu, Z., Wang, H., Hu, X., Sun, Z. & Han, C., 2013, The Pharmacological Properties of *Salvia* Essential Oils, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(07), 122-127.
- Gaba V.,P., 2004, Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture and Development, Plant Development and Biotechnology, Trigiano, R.N. & Gray, D.J. (ed.), Chapter 8, *CRC Press*, Boca Raton, USA, 87-97.
- Gadzovska S, S., Tusevski, O., Maury, S., Delaunay, A., Joseph, C. & Hagège, D., 2014, Effects of polysaccharide elicitors on secondary metabolite production and antioxidant response in *Hypericum perforatum* L. shoot cultures. *The Scientific World Journal*.
- Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Hagège, D., Courtois, D. & Joseph, C., 2013, The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphthodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 113(1), 25-39.
- Gala, R., Mita, G. & Caretto, S., 2005, Improving alpha-tocopherol production in plant cell cultures, *Journal of Plant Physiology*, 162, 782-784
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A. & Bley, T., 2014, Temporary immersion systems in plant biotechnology, *Engineering in Life Sciences*, 14, 607-621.
- Ghorbani, A. & Esmaeilizadeh, M., 2017, Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components, *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7, 443-440.
- Gönülşen, N., 1987, Bitki doku kültürleri yöntemleri ve uygulama alanları, T.O.K.B., Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 78, 140.
- Grdiša, M., Jug-Dujaković, M., , Lončarić, M., Carović-Stanko K., Ninčević, T., Liber, Z., Radosavljević, I., & Šatović Z., 2015, Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.): A Review of Biochemical Contents, Medical Properties and Genetic Diversity, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 80(2), 69-78.

- Hamrouni-Sellami, I., Fatma Zohra Rahali F.Z., Iness Bettaieb Rebey, I.B., Bourgou S., Limam F. & Marzouk, B., 2012, Total Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) Plants as Affected by Different Drying Methods, *Food Bioprocess Technology*, 6, 806-817.
- Hürkan, Y.K., 2021, Bitki Doku Kültürü Besiyerine Eklenen Bazı Önemli Organik Ekstraktlar Üzerine Derleme, *Journal of Environmental Toxicology and Ecology*, 1(1), 1-7.
- Jain, S.C., Pancholi, B. & Jain, R., 2012, In-vitro Callus Propagation and Secondary Metabolite Quantification in *Sericostoma pauciflorum*, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(4), 1103-1109.
- Karataş İ., Karataş, R. & Elmastaş, M., 2016, Antosiyaninlerin kallus ve hücre süspansiyon kültürleriyle üretimi, *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 12, 80-91.
- Khan, T., Abbasi, B.H., Khan, M.A., & Shinwari, Z.K., 2016, Differential effects of thidiazuron on production of anticancer phenolic compounds in callus cultures of *Fagonia indica*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(1), 46-58.
- Lotfi, M. & Werbrouck, S.P.O., 2020, SETIS™, a novel variant within the temporary immersion bioreactors, *Proc. II Int. Symp. on Micropropagation and In Vitro Techniques*, 1285, 37.
- Loyola-Vargas, V.M. & Ochoa-Alejo, N., 2018, An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives, *Methods in molecular biology*, 1815(1).
- Mancilla-Alvarez, E., Perez-Sato, J.A., Nunez-Pastrana, R., Spinoson-Castillo J.L., Bello-Bello, J.J., 2021, Comparison of Different Semi-Automated Bioreactors for In Vitro Propagation of Taro (*Colocasia esculenta* L. Schott), *Plants*, 10, 1010.
- McAlister, B., Finnie, J., Watt, M.P. & Blakeway, F., 2005, Use of the temporary immersion bioreactor system for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 347-358.
- Mujib, A., Ali, M. & Isah, T., 2014, Somatic embryo mediated mass production of *Catharanthus roseus* in culture vessel (bioreactor) – A comparative study, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(5), 442-449.
- Naik, P.M. & Al-Kyhayri J.M., 2016, Impact of Abiotic Elicitors on In vitro Production of Plant Secondary Metabolites: A Review, *Symbiosis*.
- Nyochembeng, L.,M. & Garton, S., 1996, Plant regeneration from cocoyam callus derived from shoot tips and petioles, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53, 127-134
- Oliveira, J.R., Camargo, S.E.A., & Oliveira, L.D., 2019, *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent, *Journal of Biomedical Science*, 26(5).

- Onay, A., Yıldırım, H., Pirinç, V., Tilkat, E., Çiftçi, Y.Ö., Akdemir, H., Süzerer, V., Çalar, N., Binici, M., Akdemir, F. & Kılınç, F.M., 2012, Bitkilerin biyoteknolojik yöntemlerle ticari çoğaltımı; mevcut ve gelecekteki durum, *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 1(2).
- Oseni, O.M., Pande, V. & Nailwal, T.K., 2018, A Review on Plant Tissue Culture, A Technique for Propagation and Conservation of Endangered Plant Species, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(7), 2319-7706.
- Oskay, D. & Oskay M., 2009, Bitki sekonder metabolitlerinin biyoteknolojik önemi, *e-Journal of New World Sciences Academy*, 5(2).
- Papenfuss J.M. & Carman, J.G., 1987, Enhanced Regeneration from Wheat Callus Cultures Using Dicamba and Kinetin, *Crop Science*, 27, 588-593.
- Perez-Alonso N., Capote, A., Gerth, A. & Jimenez, E., 2012, Increased cardenolides production by elicitation of *Digitalis lanata* shoots cultured in temporary immersion systems, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110, 153-162.
- Petrova M., Zayova, E., Todorova, M. & Stanilova M., 2014, Enhancement of *Arnica montana* in-vitro shoot multiplication and sesquiterpene lactones production using temporary immersion system, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(12), 5170-5176.
- Phillips, G.C., & Garda, M., 2019, Plant tissue culture media and practices: an overview, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 55, 242-257.
- Preil, W., 2005, General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for in vitro culture, *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, 1, 1-18.
- Radman, R., Saez, T., Bucke, C., & Keshavarz, T., 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 3, 91-102.
- Ramachandra, S.R. & Ravishankar G.A., 2002, Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnology Advances*, 20, 101-153.
- Singh, C.R., 2018, Review on problems and its remedy in plant tissue culture, *Asian Journal of Biological Sciences*, ISSN: 1996-3351.
- Tiring, G., Satar, S. & Özkaya, O., 2021, Sekonder Metabolitler, *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(1), 203-215.
- Topçu, Ş. & Çölgeçen, H., 2015, Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8(2), 09-29.
- Trentini G.E., Rojas, M., Gajardo, D., Alburquenque, D., Villagra, E., Gomez, A., Arru, L. & Arencibia, A.D., 2021, Elicitation of Phenylpropanoids in Maqui (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) Plants Micropropagated in Photomixotrophic Temporary Immersion Bioreactors (TIBs), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 146, 607-619.

- Türkmenoğlu, G., Sarıkaya, A., & Fakir H., 2019, *Phlomis grandiflora* H. S. Thompson var. *grandiflora* ve *Phlomis leucophracta* P. H. Davis & Hub.-Mor. Taksonlarının Farklı Toplama Zamanlarına Ait Uçucu Bileşenleri, *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 17, 145-151.
- Vuran, N.E. & Türker, M., 2021, Bitki doku kültürlerinde sekonder metabolit miktarını arttırmaya yönelik uygulamalar, *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 33(3), 487-498.
- Vendrame, W., JianJian, X. & Beleski, D. G., 2022, Micropropagation of *Brassavola nodosa* (L.) Lindl. using SETIS™ bioreactor, Research Square.
- Yadegari, M., 2018, Foliar application effects of salicylic acid and jasmonic acid on the essential oil composition of *Salvia officinalis*, *Turkish Journal of Biochemistry*, 43(4), 417-424
- Wang W., Zhao Z., Xu, Y., Qian, X. & Zhong, J., 2005, Efficient elicitation of ginsenoside biosynthesis in cultures of *Panax notoginseng* by using self-chem synthesized jasmonates, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10, 162-165.
- Wang, H.Q., Jin, M.Y., Paek, K.Y., Piao, X.C. & Lian, M.L., 2016, An efficient strategy for enhancement of bioactive compounds by protocorm-like body culture of *Dendrobium candidum*, *Industrial Crops and Products*, 84, 121-130.

EKLER

Ek Tablo 1: Örneklerdeki toplam fenolik madde miktarı.

Örnek Adı	Toplam Fenolik Madde (mg GAE /g)	
	ORT	STD
Kontrol 1 (Petri)	2,902204	0,1409061
Kontrol 2 (Petri)	3,448318	0,2173395
Kontrol 1 (Biyoreaktör)	6,974207	0,2454645
Kontrol 2 (Biyoreaktör)	6,775377	0,1152668
JA 1 (Petri)	2,255784	0,0939374
JA 2 (Petri)	2,305714	0,0883913
JA 1 (Biyoreaktör)	11,29898	0,0669824
JA 2 (Biyoreaktör)	9,757826	0,8563341

Ek Tablo 2: Örneklerdeki toplam flavonoid madde miktarı

Örnek Adı	Toplam Flavonoid Madde (mg CA/g)	
	ORT	STD
Kontrol 1 (Petri)	2,371405	0,1409061
Kontrol 2 (Petri)	2,806163	0,1811191
Kontrol 1 (Biyoreaktör)	7,306187	0,1738444
Kontrol 2 (Biyoreaktör)	7,266663	0,1719081
JA 1 (Petri)	1,11983	0,060373
JA 2 (Petri)	1,067132	0,1185703
JA 1 (Biyoreaktör)	9,854506	0,2992665
JA 2 (Biyoreaktör)	8,642455	0,3290982

Ek Tablo 3: CUPRAC yöntemine göre örneklerdeli toplam antioksidan madde miktarı

Örnek Adı	Toplam Antioksidan Madde (mg CA/g)	
	ORT	STD
Kontrol 1 (Petri)	6,285664	0,4581885
Kontrol 2 (Petri)	6,008292	0,1288682
Kontrol 1 (Biyoreaktör)	16,18996	0,8661157
Kontrol 2 (Biyoreaktör)	15,45599	0,318075
JA 1 (Petri)	5,538894	0,5323644
JA 2 (Petri)	5,641308	0,1816467
JA 1 (Biyoreaktör)	24,60498	0,5966224
JA 2 (Biyoreaktör)	21,69045	1,0460168

Ek Tablo 4: CERAC yöntemine göre örneklerdeli toplam antioksidan madde miktarı.

Örnek Adı	Toplam Antioksidan Madde (mg CA/g)	
	ORT	STD
Kontrol 1 (Petri)	18,1008	0,36173413a

Kontrol 2 (Petri)	20,42223	1,5818769
Kontrol 1 (Biyoreaktör)	31,28271	1,93605231
Kontrol 2 (Biyoreaktör)	27,11758	1,45060581
JA 1 (Petri)	24,53074	1,13198553
JA 2 (Petri)	22,86398	0,38135051
JA 1 (Biyoreaktör)	35,37353	0,83747775
JA 2 (Biyoreaktör)	33,29273	0,74314133

Ek Tablo 5: Toplam fenolik madde miktarı sonuçlarının Tukey metodu kullanılarak %95 güvenirlilik ile ANOVA testi grupları

Faktör	N	Ort	Gruplama			
JA Biyoreaktör	6	10,528	A			
Kontrol Biyoreaktör	6	6,8748		B		
Kontrol Petri	6	3,175			C	
JA Petri	6	2,2807				D

Ek Tablo 6: Toplam flavonoid madde miktarı sonuçlarının Tukey metodu kullanılarak %95 güvenirlilik ile ANOVA testi grupları

Faktör	N	Ort	Gruplama			
JA Biyoreaktör	6	9,248	A			
Kontrol Biyoreaktör	6	7,2864		B		
Kontrol Petri	6	2,589			C	
JA Petri	6	1,0935				D

Ek Tablo 7: Toplam antioksidan madde miktarı CUPRAC sonuçlarının Tukey metodu kullanılarak %95 güvenirlilik ile ANOVA testi grupları

Faktör	N	Ort	Gruplama			
JA Biyoreaktör	6	23,1	A			
Kontrol Biyoreaktör	6	15,8		B		
Kontrol Petri	6	6,15			C	
JA Petri	6	5,59				C

Ek Tablo 8: Toplam antioksidan madde miktarı CERAC sonuçlarının Tukey metodu kullanılarak %95 güvenirlilik ile ANOVA testi grupları

Faktör	N	Ort	Gruplama			
JA Biyoreaktör	6	34,3	A			
Kontrol Biyoreaktör	6	29,2		B		
JA Petri	6	23,7			C	
Kontrol Petri	6	19,3				D

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Berk Baştuğ
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	21.12.2022

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Botanik Programı

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Botanik Programı

Makale ve Bildiriler	
Türktaş, M., Karakaş Metin Ö., Baştuğ, B., Ertuğrul, F., Saraç, Y. İ. & Kaya, E., 2013, Molecular phylogenetic analysis of Tulipa (Liliaceae) based on noncoding plastid and nuclear DNA sequences with an emphasis on Turkey, <i>Botanical Journal of the Linnean Society</i> , 172(3), 270-279.	