

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KİTOSAN VE BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN
Origanum vulgare L. subsp. *vulgare*'NİN *IN VITRO* ÇOĞALTIMI
VE ESANSİYEL YAĞLARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

NOOR PREMI

KOCAELİ 2018

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİTOSAN VE BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN
***Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*'NİN *IN VITRO* ÇOĞALTIMI VE**
ESANSİYEL YAĞLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Noor PREMI

Prof. Dr. Fazıl ÖZEN
Danışman, Kocaeli Üniv.



.....

Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ
Jüri Üyesi, Balıkesir Üniv.



.....

Dr. Öğretim Üyesi Sevgi TÜRKER KAYA
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.



.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 21.06.2018

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın hazırlanmasında ve tamamlanmasında katkıda bulunan ve yardım eden birkaç kişinin değerli rehberliği ve desteği olmadan mümkün olmazdı.

İlk olarak, Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü Başkanı, sevgili danışmanım Prof. Dr. Fazıl Özen'e çok teşekkür ederim. Onun samimi rehberliği ve her zaman beni desteklediğini asla unutmayacağım.

Sevgili hocam, Dr. Sevgi Türker Kaya'ya değerli önerileri ve FT-IR çalışmaları ile ilgili bana öğrettiği ve yardım ettiği için teşekkür ederim.

Benim tez çalışması boyunca bana çok şey öğrettiği, beni desteklediği ve her zaman motive ettiği için sevgili Dr. Arda Acemi'ye çok minnettarım ve bu tez çalışması için onun tarafından kitosanın temin edildiği için teşekkür eder ve başarılar dilerim.

En çok ihtiyaç duyduğumda destek ve sıcak aile ortamı sağlaması için Kocaeli Büyükşehir Belediyesi Uluslararası Öğrenci Birimi'ne, Kocaeli Uluslararası Öğrenci Derneği (KİSA)'ya ve Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na çok teşekkür ederim.

Kitosanların karakterize edilmesinde yardımcı olan ve üzücü bir şekilde 08.02.2018 tarihinde aramızdan ayrılan Doç. Dr. Nour Eddine El Gueddari'ye teşekkür ederim.

Sevgili dostlarıma, özellikle Muhammed Abdulfattah'a, Sabir Nikfal'a, Hekma Wali'ye, Umar Khan'a, Hammam Sawalma'ya ve değerli A.F.N.D.M'e nazik yardımları ve destekleri için çok teşekkür ederim.

Hayatımın her zaman en büyük destek ve ilham kaynağı olan sevgili aileme, ve herkesden önce, dualarıma cevap verip hedeflerime ulaşmak için bana güç veren Rabbime sonsuz teşekkürlerim var.

Mayıs-2018

Noor PREMI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLOLAR DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	x
GİRİŞ.....	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Bitki Doku Kültürü	3
1.1.1. Besi ortamları	5
1.1.1.1. Besi ortamların bileşikleri.....	5
1.1.2. Bitki büyüme düzenleyicileri	9
1.2. Kitosanın Genel Özellikleri	11
1.2.1. Bitkiler üzerinde kitosanın etkileri	14
1.2.1.1. Kitosanın fizyolojik, biyokimyasal ve büyüme etkileri.....	14
1.2.1.2. Kitosanın sinyal transdüksiyonu ve hücrel etkileri	15
1.3. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler.....	16
1.4. Oregano (<i>Origanum</i>) Türleri.....	16
1.4.1. <i>Origanum</i> 'un taksonomisi.....	17
1.4.2. Türkiye'deki <i>Origanum</i> türleri.....	19
1.4.3. Oregano'nun yapısal ve morfolojik özellikleri	21
1.4.4. <i>Origanum</i> 'un tıbbi önemi.....	24
1.4.5. <i>Origanum vulgare</i> hakkında bilgiler	25
1.4.5.1. <i>Origanum vulgare</i> 'nin esansiyel yağları.....	28
1.4.5.2. <i>Origanum vulgare</i> 'ye ait bazı çalışmalar.....	31
1.4.5.3. Kitosan kullanarak <i>Origanum vulgare</i> üzerinde yapılan bazı çalışmalar	32
1.5. Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi	35
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	37
2.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	37
2.2. Deneylerde Kullanılan Diğer Ekipmanlar.....	37
2.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar	38
2.4. Besi Ortamlarının Hazırlanması.....	38
2.4.1. Besi ortamlarının sterilizasyonu ve kültür kaplarına aktarımı	39
2.5. Deneylerde Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu	40
2.6. Tohumların Sterilizasyonu	41
2.7. Tohumların Ekimi ve İnkübasyonu.....	42
2.8. Eksplantların Yeni Besi Ortamlarına Aktarılması ve Çoğaltımı.....	42
2.8.1. Sürgün, yaprak ve kök sayılarının belirlenmesi	43
2.8.2. Sürgün ve kök uzunluklarının ölçümü	44
2.9. FT-IR Spektroskopisi İçin Örneklerin Hazırlanması	44

2.9.1. KBr peletlerinin hazırlanması ve FT-IR spektrumlarının elde edilmesi	45
2.10. Nicel, Nitel ve İstatistiksel Yöntemler	46
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	47
3.1. Tohumların Sterilizasyonunun Optimizasyonu.....	47
3.2. Tohumların Çimlenmesi	47
3.2.1. Farklı kinetin, BAP ve kitosan konsantrasyonlarının tohum çimlenmesi üzerine etkileri	48
3.2.1.1. Farklı kinetin konsantrasyonlarının etkileri.....	50
3.2.1.2. Farklı BAP konsantrasyonlarının etkileri	50
3.2.1.3. Farklı kitosan konsantrasyonlarının etkileri	51
3.3. Farklı Kinetin, BAP ve Kitosan Konsantrasyonlarının Sürgün Sayıları ve Uzunlukları Üzerine Etkileri	53
3.3.1. Farklı kinetin konsantrasyonlarının etkileri	55
3.3.2. Farklı BAP konsantrasyonlarının etkileri.....	57
3.3.3. Farklı kitosan konsantrasyonlarının etkileri	59
3.4. Farklı Kinetin, BAP ve Kitosan Konsantrasyonlarının Kök Sayıları ve Uzunlukları Üzerine Etkileri	61
3.4.1. Farklı kinetin konsantrasyonlarının etkileri	63
3.4.2. Farklı BAP konsantrasyonlarının etkileri.....	63
3.4.3. Farklı kitosan konsantrasyonlarının etkileri	64
3.5. Farklı Kinetin, BAP ve Kitosan Konsantrasyonlarının Yaprak Sayıları Üzerine Etkileri	65
3.5.1. Farklı kinetin konsantrasyonlarının etkileri	67
3.5.2. Farklı BAP konsantrasyonlarının etkileri.....	67
3.5.3. Farklı kitosan konsantrasyonlarının etkileri	68
3.6. FT-IR Spektroskopisine Ait Bulgular	69
3.7. Tartışma.....	76
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	80
4.1. Kinetin, BAP ve Kitosanın Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması	80
4.2. Kinetin, BAP ve Kitosanın Sürgün Sayıları ve Uzunlukları Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması	81
4.3. Kinetin, BAP ve Kitosanın Kök Sayıları ve Uzunlukları Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması	83
4.4. Kinetin, BAP ve Kitosanın Yaprak Sayıları Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması	84
KAYNAKLAR	88
KİŞİSEL YAYINLAR	99
ÖZGEÇMİŞ.....	100

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları	12
Şekil 1.2.	Deniz hayvanlarının kabukları ve mantarlardan kitinin eldesi	12
Şekil 1.3.	<i>Origanum</i> yapraklarının görünümü	21
Şekil 1.4.	<i>Origanum</i> çiçeklerinin görünümü.....	22
Şekil 1.5.	Optik yansıma mikroskopi ile gözlemlenen <i>Origanum</i> taze yaprak.....	23
Şekil 1.6.	Optik transmisyon mikroskopi ile gözlenen <i>Origanum</i> glandüler olmayan tüyler: (a) taze yaprak; (b) kurutulmuş yaprak	23
Şekil 1.7.	<i>Origanum vulgare</i> L.'nin alt türlerinin Türkiye'deki coğrafi dağılımı	26
Şekil 1.8.	<i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>vulgare</i> L.....	26
Şekil 1.9.	<i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>vulgare</i> 'nin Türkiye'deki coğrafi dağılımı	26
Şekil 1.10.	<i>Origanum vulgare</i> 'nin uçucu yağların temel bileşenlerinin kimyasal yapıları.....	29
Şekil 1.11.	FTIR spektrometresinin çalışma prensibi	36
Şekil 2.1.	FT-IR spektroskopisi için kurutulmuş bitki katı örneklerin hazırlaması sırasında havan içinde toz haline getirilmesi.....	44
Şekil 2.2.	FT-IR spektroskopisi için toz haline getirilen bitki katı örneklerin havan içinde potasyum bromür (KBr) ile karıştırılması	45
Şekil 2.3.	FT-IR katı örnekleri ince bir disk haline getirildikten sonra bir disk tutucuya aktarılması ve yerleştirilmesi.....	45
Şekil 3.1.	(A) Işıktaki inkübe edilen fidelerin görünümü, (B) karanlıkta inkübe edilen fidelerin görünümü.....	48
Şekil 3.2.	Kontrol ile farklı kinetin konsantrasyonlarında ekilen tohumların ortalama çimlenen tohum sayılarının çizgi grafiği	50
Şekil 3.3.	Kontrol ile farklı BAP konsantrasyonlarında ekilen tohumların ortalama çimlenen tohum sayılarının çizgi grafiği	51
Şekil 3.4.	Kontrol ile farklı kitosan konsantrasyonlarında ekilen tohumların ortalama çimlenen tohum sayılarının çizgi grafiği	51
Şekil 3.5.	A: 0,5 mg/L kitosan içeren besi ortamında büyüyen fidelerin görünümü B: 4,0 mg/L kitosan içeren besi ortamında büyüyen fidelerin görünümü	52
Şekil 3.6.	Kontrol ile farklı konsantrasyonlarda kinetin içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün sayıları (A) ve uzunluklarının (B) çizgi grafikleri.....	55
Şekil 3.7.	Farklı konsantrasyonlarda kinetin içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların genel görünümü, A: 0,5 mg/L kinetin, B: 1,0 mg/L kinetin, C: 2,0 mg/L kinetin, D: 4,0 mg/L kinetin	56
Şekil 3.8.	Kontrol ile farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün sayıları (A) ve uzunluklarının (B) çizgi grafikleri.....	57

Şekil 3.9. Farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların genel görünümü, A: 0,5 mg/L BAP, B: 1,0 mg/L BAP, C: 2,0 mg/L BAP, D: 4,0 mg/L BAP	58
Şekil 3.10. Kontrol ile farklı konsantrasyonlarda kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün sayıları (A) ve uzunluklarının (B) çizgi grafikleri.....	59
Şekil 3.11. Farklı konsantrasyonlarda kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların genel görünümü, A: 0,5 mg/L kitosan, B: 1,0 mg/L kitosan, C: 2,0 mg/L kitosan, D: 4,0 mg/L kitosan	60
Şekil 3.12. Kontrol ile farklı kinetin konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların ortalama kök sayıları (A) ve uzunluklarının (B) çizgi grafikleri.....	63
Şekil 3.13. Kontrol ile farklı BAP konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların ortalama kök sayıları (A) ve uzunluklarının (B) çizgi grafikleri.....	64
Şekil 3.14. Kontrol ile farklı kitosan konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların ortalama kök sayıları (A) ve uzunluklarının (B) çizgi grafikleri.....	65
Şekil 3.15. Kontrol ile farklı kinetin konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların eksplant başına (A) ve sürgün başına (B) ortalama yaprak sayılarının çizgi grafikleri	67
Şekil 3.16. Kontrol ile farklı BAP konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların eksplant başına (A) ve sürgün başına (B) ortalama yaprak sayılarının çizgi grafikleri	68
Şekil 3.17. Kontrol ile farklı kitosan konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların eksplant başına (A) ve sürgün başına (B) ortalama yaprak sayılarının çizgi grafikleri	69
Şekil 3.18. <i>Origanum vulgare</i> 'nin esansiyal yağının ana bileşenleri; (A) karvakrol, (B) timol ve (C) γ -terpinen'in FT-IR spektrumları.....	71
Şekil 3.19. Farklı (A) kinetin, (B) BAP ve (C) kitosan konsantrasyonlarıyla muamele edilen bitkilerin sürgün örneklerinin FT-IR spektrumları.....	72
Şekil 3.20. Farklı (A) kinetin, (B) BAP ve (C) kitosan konsantrasyonlarıyla muamele edilen bitkilerin kök örneklerinin FT-IR spektrumları	73
Şekil 3.21. Farklı (A) kinetin, (B) BAP ve (C) kitosan konsantrasyonlarıyla muamele edilen bitkilerin yaprak örneklerinin FT-IR spektrumları.....	74
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamlarında çimlenen tohumların ortalama sayılarının grafiği.....	80
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamlarındaki tohumların çimlenme yüzdesinin sütun grafiği.....	81
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamlarında eksplantların ortalama sürgün sayısının sütun grafiği.....	82
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamlarındaki eksplantların ortalama sürgün uzunluğunun grafiği.....	82
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama kök sayısının grafiği.....	83
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamlarındaki eksplantların ortalama kök uzunluğunun grafiği.....	84

Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların eksplant başına ortalama yaprak sayısının sütun grafiği.....	85
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların sürgün başına ortalama yaprak sayısının sütun grafiği.....	85
Şekil 4.9. (A) Kinetin, (B) BAP ve (C) kitosan içeren ortamlarda iki aylık inkübasyonun sonunda bitkilerin görünümü	86



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Türkiye'deki <i>Origanum vulgare</i> L.'nin alt türlerinin ekolojik ve biyocoğrafik özelliklerinin karşılaştırılması	27
Tablo 1.2. <i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>vulgare</i> esansiyel yağlarının MİK, ve MBK* ($\mu\text{g} / \text{mL}$) ve referans antibiyotik MİK değerleri	30
Tablo 2.1. Sıvı hacmine göre otoklav süreleri	40
Tablo 3.1. Dört farklı sterilizasyon çözeltisi ile muamele edilen tohumların çimlenme yüzdesi	47
Tablo 3.2. Kontrol ile karşılaştırılarak, farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamların tohum çimlenmesi üzerine olan etkilerine ait bulgular	49
Tablo 3.3. Kontrol ile karşılaştırılarak, farklı kinetin, BAP ve kitosan konsantrasyonların sürgün sayıları ve uzunlukları üzerine olan etkilerine ait bulgular	54
Tablo 3.4. Kontrol ile karşılaştırılarak, farklı kinetin, BAP ve kitosan konsantrasyonların kök sayıları ve uzunlukları üzerine olan etkilerine ait bulgular	62
Tablo 3.5. Kontrol ile karşılaştırılarak, farklı kinetin, BAP ve kitosan konsantrasyonların yaprak sayıları üzerine olan etkilerine ait bulgular	66
Tablo 3.6. Bitki FT-IR spektrumunun genel bant tanımları.....	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

C	: Santigrat derece (°)
cm	: Sentimetre
g	: Gram
kD	: Kilodalton
L	: Litre
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
γ	: Dalga boyu (cm ⁻¹)

Kısaltmalar

2,4-D	: Diklorofenoksi asetik asit
2iP	: N-İzopentenilaminopurin
ABA	: Absisik Asit
BAP	: 6-benzylaminopurin
BBD	: Bitki büyüme düzenleyici
FT-IR	: Fourier Kızılötesi Spektroskopisi
GA3	: Giberellik asit
IAA	: İndol-3-asetik asit
IBA	: İndol-3-bütirik asit
Kit	: Kitosan
Kn	: Kinetin (6-Furfurilaminopurin)
MS	: Murashige ve Skoog besi ortamı
pCPA NAA	: p-Klorofenoksiasetik asit 1-Naftalin asetik asit
pH	: Potansiyel hidrojen derecesi
ROS	: Reactive oxygen species (reaktif oksijen türleri)
Zea	: Zeatin

KİTOSAN VE BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*'NİN *IN VITRO* ÇOĞALTIMI VE ESANSİYEL YAĞLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

ÖZET

Lamiaceae familyasına ait olan hem medikal hem gıda endüstrisi alanlarında çok kullanılan *Origanum vulgare* bitkisinin sekonder metabolitleri ve esansiyel yağlarının üretimi zor (düşük verim) bir işlem olduğu için, bu bileşiklerin birikmesini sağlayan doğal ve kötü yan etkileri olmayan bir uyarıcı aranmaktadır. Bunu sağlamak amacıyla bu çalışmada, *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* bitkisinin *in vitro* çoğaltımı üzerindeki kitosanın etkileri araştırıldı.

Kitosan, kitinin deasetillenmiş şekli olup mükemmel biyoumluluk ve biyobozunurluk özellikleri, ekolojik güvenilirliği ve düşük toksisitesi, bol yenilenebilir doğal kaynaklardan yapılması gibi birçok çeşitli özelliklere sahip olan ve çok çalışma alanında uygulanan bir biyopolimerdir. Kitosanın bitki büyümesini ve üretkenliğini uyardığı, savunma genlerini tetiklediği ve birçok bitkide mikrobiyal büyümeyi engellediği düşünülmektedir. Bazı bitkilerde sekonder metabolit sentezini arttırmakta da rol oynadığı gösterilmiştir.

Bu çalışmada, *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*'nin *in vitro* çoğalması sırasında kitosanın büyüme uyarıcı etkisini test etmek için farklı konsantrasyonları kullanıldı. Ayrıca, iki bitki büyüme düzenleyicisi; kinetin ve 6-Benzilaminopurin, bitkinin büyümesi üzerindeki etkilerini kitosanınki ile karşılaştırmak için kullanıldı. Kullanılan kitosan ve kinetin konsantrasyonları, kültür ortamına eklendiğinde *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* tohumlarının çimlenme yüzdesini arttırdığı gözlemlendi. Buna ek olarak, kitosanın bazı konsantrasyonlarını içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların sürgünlerinin uzunluğunda, köklerinin sayısı ve uzunluğunda ve yaprak sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Ayrıca FT-IR spektroskopisi sonuçlarına bağlı olarak bu eksplantlarda bazı esansiyel yağ bileşenlerinin konsantrasyonlarında bir artış tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Bitki Büyüme Düzenleyicileri, Bitki Doku Kültürü, *In vitro* Çoğaltım, Kitosan, *Origanum vulgare*.

THE EFFECTS OF CHITOSAN AND SOME PLANT GROWTH REGULATORS ON *IN VITRO* PROPAGATION AND ESSENTIAL OILS OF *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*

ABSTRACT

Origanum vulgare is a flowering plant from the *Lamiaceae* family. It is widely used in medical and food industry fields. Since it is a difficult process to produce the secondary metabolites and essential oils of *Origanum vulgare* in high yields, there is a need for a natural elicitor that makes it possible to accumulate these compounds in the plant. In order to ensure this, the effects of chitosan on the *in vitro* propagation of *Origanum vulgare* are being investigated in this study.

Chitosan is the deacetylated form of chitin. It has excellent biocompatibility and biodegradability, ecological safety and low toxicity, abundant renewable and natural resources, and many other properties that make it suitable for using in many fields. It is thought that chitosan stimulates growth, productivity and defense genes, and inhibits microbial growth in many plants. It has also been shown to play a role in increasing secondary metabolite synthesis in some plants.

In this study, *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* was treated with different concentrations of chitosan to test its growth stimulating effect on the plant. In addition, two plant growth regulators; kinetin and 6-benzylaminopurine were also used to compare their effects with that of chitosan. All chitosan concentrations used were observed to increase the germination percentage of *Origanum vulgare* seeds when added to the culture medium. In addition, a statistically significant increase was also observed in the length of shoots, number and length of roots, and number of leaves of the explants growing in the media containing certain concentrations of chitosan. Furthermore, depending on the results of FT-IR spectroscopy, an increase in the concentrations of some essential oil components in these explants was observed.

Keywords: Plant Growth Regulators, Plant Tissue Culture, *In vitro* Propagation, Chitosan, *Origanum vulgare*.

GİRİŞ

Bitki doku kültürü, steril koşullar altında protoplast, hücre, doku, organ veya bütün bitki kültürü için bir genel terimi olarak kullanılır. Doku kültürü metodolojisi, "eksplantlar" adı verilen bir bitkinin hücreleri, dokuları ve organlarının ayrılması ve kontrollü sıcaklık ve ışık koşulları altında besleyici bir ortamda aseptik olarak büyütülmesini içerir. Eksplantlar, daha sonra sürgünleri üreten, kallus adlı, düzensiz, proliferatif, farklılaşmış hücrelerin kütesine yol açar. Bitki doku kültürü yöntemiyle mevsim ve havaya bağımsız olarak seçilen bitkilerin yüksek oranda çoğaltması, nadir veya çeşitli stres faktörleri tarafından tehdit edilen bitki türleri korunması, transgenik bitkilerin üretimi, sekonder metabolit elde edilmesi, gelişimsel aşamaları ve alıştırma sırasında bitkilerin kaybı azaltarak bitkilerin büyütme zamanı ve maliyeti azaltılması dahil olmak üzere birçok imkân sağlanmaktadır.

Bu tez çalışması Kocaeli Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'ndeki Bitki Doku Kültürü Laboratuvarında *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* bitkisi üzerine yapıldı.

Lamiaceae familyasına ait olan *Origanum vulgare*, dünyanın her tarafında hem tıbbi bir bitki ve hem de baharat olarak çok kullanılmaktadır. Türkiye, dünyada *Origanum* türlerinin en büyük üreticisi ve ihracatçılardan biridir. İhracat, ağırlıklı olarak toplanan yabani bitkilere dayanmakta ancak birçok çiftçi *Origanum onites*'i Ege bölgesinde yetiştirmektedir (Başer, 2002). Dünyadaki *Origanum* taksonlarının yüzde 60'ından fazlasının Türkiye'de doğal olarak yetiştiği kaydedilmiştir. Bu yüksek oran, *Origanum* 'un gen merkezinin Türkiye olduğunu öne sürmektedir (Ietswaart, 1980; Kokkini, 1997).

Karvakrol ve timol *Origanum vulgare*'nin esansiyel yağının yapısında bulunan en yaygın bileşenlerdir. Her iki bileşiğin antifungal, antimikrobiyal, insektisidal ve antioksidan aktiviteleri vardır. Buna ek olarak, tümöral hücrelerin üremelerini engelleyici etkileri bulunmaktadır. Bu bitkideki diğer esansiyel yağ bileşenlerinin timol ve karvakrol ile benzer etkileri bulunmaktadır (Lambert ve diğ., 2001).

Bu bileşiklerin çoğu, kalp hastalıkları, kanser ve yüksek kan basıncıyla seyreden olgularda etkilidir. Güçlü hipoglisemik etkileri dolayısıyla diyabette de kullanılır. *Origanum vulgare* kafeik asit ve neoklorogenik asit bakımından da zengindir. *Origanum vulgare*'nin sadece tedavi amaçlı değil aynı zamanda gıda, parfümeri-kozmetik endüstrilerinde kullanıldığı bilinmektedir (Akıllı, 2014).

Origanum vulgare'nin sekonder metabolitleri ve esansiyel yağları çok faydalı olmasına rağmen, bu bileşiklerin yüksek verimde üretilmesi zor ve pahalı bir süreçtir. Bu bileşiklerin birikmesini sağlayan doğal ve kötü yan etkileri olmayan bir elisitör aranmaktadır. Bunu sağlamak amacıyla, bu çalışmada kitosanın bitki büyüme ve üretim uyarıcı etkisini test etmek için, *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* bitkisi doku kültürü laboratuvarında *in vitro* çoğaltımı sırasında kitosanın farklı konsantrasyonları ile muamele edildi. Ayrıca, iki bitki büyüme düzenleyicisi olan kinetin ve 6-Benzylaminopurin, bitkinin büyümesi üzerindeki etkilerini kitosanınki ile karşılaştırmak için kullanıldı. Bitki çoğaltımı üzerine bu üç maddenin etkileri, bulgular bölümünde ayrı ayrı açıklanmakta ve sonuçlar bölümünde karşılaştırılmaktadır.

Muhtemelen dünyanın ticari olarak en değerli baharatı olmasına rağmen *Origanum* bitkileri biyoteknoloji için henüz yeni bir hedeftir. Esansiyel yağ bileşenlerinin üretimi için doku kültürü kullanımı ticari açıdan henüz yaygın değildir. Ancak bu alanda elde edilecek daha fazla başarılar potansiyel olarak bu hedefe doğru katkıda bulunabilir ve yüksek kaliteli aroma hazırlama, parfümeri, kozmetik ve içki gibi endüstrilerde yeni perspektifler açabilir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Bitki Doku Kültürü

Teknik olarak bitki doku kültürü mikroçoğaltım olarak bilinir, geniş çapta, aseptik ve yakından kontrol edilen bir ortamda çok sayıda bitki hücrelerini *in vitro* yetiştirmek için kullanılan yöntemlerin toplanması olarak tanımlanabilir. Bu teknik etkili olmaktadır, çünkü birçok bitki hücreleri totipotenttir; yani her hücre, tüm bir organizmayı üretmek için gerekli olan genetik bilgiye sahiptir. Dolayısıyla, mikroçoğaltım, genetik olarak bir ana bitki ile ve aynı zamanda birbiriyle aynı özelliklere sahip bitkileri yüksek miktarda üretmek için kullanılabilir (Yang Yen, 2018).

Mikroçoğaltım, pek çok açıdan geleneksel bitki yetiştirme yöntemlerinden daha uygundur. Bunun temel sebebi, çok kısa sürede çok sayıda bitki üretilmesine olanak sağlamasıdır. Bitki doku kültürü yetiştiricileri için de avantajlıdır, çünkü doku hasat işleminde yaralanmayan tek bir ana bitkiden toplanan dokuyu kullanarak çok sayıda bitki üretilebilir. Ayrıca mikroçoğaltım yoluyla ürün üretimi, bir seranın dikkatle düzenlenmiş ortamında yapılabileceği için büyüme mevsiminde herhangi bir kesinti olasılığını da ortadan kaldırır. Bir sera içindeki kimyasal ve fiziksel çevre yakından izlenebildiğinden dolayı, mevsimsel değişimin bir sonucu olarak ortaya çıkabilecek üretimdeki herhangi bir durgunluktan kaçınılabilir (Harisha, 2007).

Bitki doku kültürü tarihçesi, Gottlieb Haberland'ın yaprak, mezofil doku ve tüy hücrelerinin kültürünü bildirdiği 20. yüzyılın başlangıcına kadar geriye doğru götürülebilir fakat Haberland'ın kültürde kullandığı hücreler bölünmemiştir. 1922'de Haberland'ın öğrencisi Kotte, izole edilen kök ipuçlarının *in vitro* büyümesini bildirmiştir. 1934'te White, defalarca kök ucudan türevli domates dokularının alt kültürlerini bildirmiştir. Bitki doku kültürü teknikleri, 1930'larda, izole edilmiş meristem dokuların büyümesi için B vitaminleri ve oksinin gerekliliğinin keşfedilmesi nedeniyle hızla ilerledi. Skoog ve arkadaşlarının tütün doku kültürünün beslenme gereksinimleri üzerine çalışmaları, bitki büyüme hormonların

keşfedilmesinin yanı sıra önemli bir bitki doku kültürü ortamı, MS besiyeri oluşmasına yol açmış.

1960'lardan beri doku kültürü, bitki biyoteknologlar tarafından bir araç olarak gittikçe yaygınlaştırılmıştır. Ancak, metodoloji bakımından çok şey hala araştırılmaktadır (Murashige ve Skoog, 1962; Yang Yen, 2018).

Bitki doku kültürü teknolojisi, kullanılan materyallerin türüne göre 5 sınıfa ayrılabilir (Harisha, 2007):

- Kallus kültürü: Agar besiyerinde eksplantlardan üretilen kallus kültürü.
- Hücre kültürü: Genellikle sıvı ortamda hücre kültürü.
- Organ kültürü: Embriyolar, anterler, kökler, sürgünler, yumurtalıkların vb. kültürü.
- Meristem kültürü: Besleyici ortam içinde sürgünler, meristem veya eksplant dokusunun aseptik kültürü.
- Protoplast kültürü: Kültürlenmiş hücre ya da bitki dokusundan bitki protoplastının aseptik izolasyonu ve kültürü

Bitki doku kültürü teknikleri artık sadece bitki fizyolojisi, hücre biyolojisi, genetik ve biyokimya alanlarında değil, aynı zamanda tarım, ormancılık, bahçecilik ve endüstri alanlarında çeşitli sorunların incelenmesi için güçlü araçlar olarak kullanılmaktadır. Hücre, anter, ovül, meristem, tomurcuk ve embriyo kültürleri, hücre seçimi, protoplast izolasyonu ve füzyonu gibi bitki doku kültür teknikleri birçok deneysel ve endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu uygulamalar aşağıdaki alanlar gibi içermektedir (Harisha, 2007);

- Meristem ve sürgün kültürü kullanarak mikroçoğaltımı yoluyla genetik olarak bir ana bitki ile ve birbiriyle aynı olan bitkiler çok sayıda üretilmesi.
- Oldukça avantajlı karakterleri bulmak için bitki yerine hücrelerin tarama programları sıvı kültür ortamlarında, sekonder ürün kaynağı olarak bitki hücrelerin çok miktarda çoğaltımı.
- Protoplast füzyonu ile uzaktan ilişkili bitki türlerin yeni melezlerinin üretilmesi
- Yetiştirme programlarında homozigot hatları daha hızlı elde etmek için haploid kültürlerden dihaploid bitkilerin üretilmesi.

1.1.1. Besi ortamları

Besi ortamı, bitki doku kültürünün en önemli parçasıdır. Başarılı bir bitki doku kültürü sistemi büyük oranda doğru kültür besiyeri formülüne dayanır. Bitki doku kültürü besi ortamları genellikle inorganik elementler, organik bileşikler ve bir destek matrisi içerir. Kültür besi ortamları, kültürlere, genellikle topraktan temin edilebilen gerekli inorganik besin maddelerini sağlar. Buna ek olarak, kültürlere genellikle bitkilerde üretilen vitaminler ve karbon kaynağı gibi gerekli organik bileşikler sağlar. Bazen, hücre bölünmesini ve / veya farklılaşmasını uyarmak için bitkiye büyüme düzenleyicileri eklenir. Besi ortamının bir diğer önemli fonksiyonu, bitkilerin büyümesi için gerekli bir ortam yaratmaktır. Örneğin, toprak gibi işlev gören katı ortamlar, kültürlerin solunum için hava ile temas etmesini ve yenilenmiş küçük bitkiler için kök salması için fiziksel bir destek sağlar. Sıvı bir ortam ise, ekşplantların besin maddeleri ile sabit, maksimum teması tutmasını sağlar. Seçici bir reaktif madde de belirli kültürlerin büyümesini kısıtlamak için bir kültür ortamı içinde dahil edilebilir. Bu nedenle, besi ortamının formülleri bitki doku kültürü amacına bağlı olarak değişir. Bir bitki doku kültürünün işlemi sırasında farklı ortamlar da kullanılabilir (Yang Yen, 2018).

1.1.1.1. Besi ortamların bileşikleri

Besi ortamları aşağıdaki bileşiklerden oluşur (Yang Yen, 2018):

Makro elementler

Gerekli miktara bağlı olarak, mineral elementler genellikle iki gruba ayrılır: makroelementler ve mikro elementler. Mikroelementler genellikle sadece az miktarda ihtiyaç duyulmasına karşın, makroelementler fazla miktarda ihtiyaç duyulan elementlerden oluşur.

Kültür ortamına dahil edilen makro elementler ve bunların metabolik rolü aşağıdakileri içerir:

- Kalsiyum (Ca): Kalsiyum birçok enzimle birlikte bir kofaktör görevi görür ve hücre duvarı sentezinde özellikle önemlidir. Kalsiyum eksikliği, sürgün ucunda nekroza neden olabilir. Bitki doku kültüründe kullanılan kalsiyum çoğunlukla 1-3 mM'lik bir konsantrasyonda kalsiyum klorür ve kalsiyum nitrat formundadır.

- Magnezyum (Mg): Magnezyum, enzim işleyişi için kritiktir ve klorofil molekülünün ayrılmaz bir bileşenidir. Magnezyum da negatif iyonları dengelemek için bitkide bulunan bir katyondur. Bitki doku kültüründe magnezyumun en çok kullanılan şekli 1-3 mM'lik bir konsantrasyonda magnezyum sülfattır.
- Azot (N): Azot, bitki ömrü için önemlidir. Bu, amino asitler, proteinler, nükleik asitler, belirli hormonlar ve klorofil gibi birçok önemli molekülün bir unsurudur. Nitrat iyonu (NO_3^- oksitlenmiş) ve amonyum iyonu (NH_4^+ indirgenmiş) çoğunlukla bitki doku kültüründe kullanılan iki azot formudur. Nitrat genelde 25-40 mM'de eklenir ve amonyum 2-20 mM'de 25-60 mM'de toplam inorganik azot miktarı ile eklenir. Her iki form da verilirse birçok bitki daha iyi yetişir. Azot, amino asitler, hidrolizatlar ve organik asitler olarak organik formlarda da verilebilir. Azot organik biçimleri inorganik formların yerini tamamen alamaz.
- Fosfor (P): Fosfor, bitkilerdeki nükleik asitlerin ve diğer yapısal bileşiklerin ayrılmaz bir parçasıdır. Fosfor, 1-3 mM'de sodyum veya potasyum hidrojen fosfat formunda fosfat (PO_4^-) olarak kültür ortamında sağlanır.
- Potasyum (K): Potasyum negatif iyonları dengelemek için bitkilerde büyük pozitif iyonlardır. Bir bitki doku kültürü ortamında gerekli potasyum miktarı, bitki türüne bağlı olarak değişir. Genellikle, nitratınla bağıntılı olarak 20-30 mM'de verilir.
- Kükürt (S): Kükürt, komşu sistein ve metiyonin artıkları arasındaki disülfür bağlarının üçüncül yapıyı oluşturduğu protein yapısında önemlidir. Kükürt, aynı zamanda, tiamin ve biyotin vitaminlerinin ve A koenzimin bir unsurudur, solunum ve yağ asidi metabolizmasında önemli bir bileşendir. Demir-kükürt proteinleri formunda fotosentezin elektron transfer reaksiyonlarında önemlidir. Kükürt, SO_4 iyonu olarak genellikle 1-3 mM'de katyon olarak magnezyum ile verilir.
- Demir (Fe): Birçok oksidasyon / indirgeme reaksiyonunda olduğu gibi klorofil sentezi için de demir gereklidir. Demir genellikle ortamda 1 μM bulunur. Demir alkalın pH'ta çözünmeyen bileşikler oluşturduğundan, ortam pH'ının demir kaynağı için kritiktir. Fe-EDTA genellikle kültür ortamında kullanılır ve üremenin diğer etkenlerden daha geniş bir pH aralığında kültürlerle sunulmasını sağlar.

Mikro elementler

Kültür ortamına dahil edilen mikro elementler ve bunların metabolik rolü aşağıdakileri içerir:

- Bor (B): Bor, fenolik asitlerin lignin biyosentezi ve metabolizmasında enzim aktivitesinde önemlidir. Bor eksikliği hem kök ucunda hem de sürgün ucu meristemlerinde hücre bölünmesini ve uzamasını engeller. Kültür ortamında bor borik asit olarak verilir.
- Kobalt (CO): Kobalt, bitki fizyologlarına göre önemli bir element olarak sayılmaz. Ancak, bitki kültür ortamında yaklaşık 0,1 µM kobalt yaygın olarak kullanılır. Yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilir.
- Bakır (Cu): Bir bitki besin maddesi olarak, bakır öncelikle çeşitli oksidatif enzimler için bir kofaktör görevi görmektedir. Bakır, kültür ortamında 0,1 µM'de bakır sülfat formunda kullanılır. Yüksek konsantrasyon toksik olabilir.
- İyot (I): İyotun etkisi bitki türlerine göre değişir. İyot kültür ortamında temel bir unsur değildir, kültürdeki kök ve kallus büyümesini artırmak için ortama eklenir.
- Manganez (Mn): Bir kofaktör olarak manganez, özellikle solunum ve fotosentez işlemlerinde bazı enzim reaksiyonları için gereklidir. Genellikle, 5-30 µM'de manganez sülfat şeklinde ortama eklenir.
- Molibden (Mo): Molibden, nitratin amonyuma dönüşmesine katılan iki enzimle birlikte bir kofaktördür. Besi ortamında 1 µM'de sodyum molibdat olarak verilir.
- Çinko (Zn): Çinko, çift değerli Zn⁺² katyonu olarak bitkilerin tarafından emilir. Çinko sülfat, 5-30 µM'de kültür ortamına eklenen en yaygın formdur.

Organik bileşikler

Organik bileşikler kültür ortamına büyük miktarlarda eklenir. Kültür ortamına dahil edilen organik bileşikler aşağıdakileri içerir:

- Şeker: Bitki kültürü için enerji kaynağı olarak kullanılır. Sakkaroz, bitki kültür ortamında en çok kullanılan şekerdir, ancak bazı ortam formüllerinde glikoz, fruktoz ve sorbitol de kullanılır. Sükroz otoklav süresince kısmen fruktoz ve glukozu ayrılır. Sükroz, ortamda bir ozmoz düzenleyici olarak davranır. Genellikle, her sıvı ortam litresine 20-40 gram sükroz eklenir. Nişastalar ayrıca bazı ortam formüllerinde destek maddesi ve enerji kaynağı olarak da kullanılır.
- Vitaminler: Besin desteği olarak ortama eklenirler. Tüm vitaminlerin içinde yalnızca tiamin (B1), kültürdeki birçok bitki türü için gerekli olduğu düşünülmektedir. Karbonhidrat metabolizması ve bazı amino asitlerin biyosentezi

için gereklidir. Bazı ortamlarda nikotik asit (niasin) ve piridoksin (B6), biyotin, folik asit, askorbik asit (C vitamini) ve tokoferol (vitamin E) de kullanılır.

- Miyo-inositol: Bir şeker alkolüdür. Membran ve hücre duvarı gelişiminde önemli olduğu düşünülmektedir. Genellikle monokotların yanı sıra bazı dikotlar ve gymnospermler için ortama eklenir.
- Karmaşık organik bileşikler: Hindistan cevizi sütü veya meyve suyu, maya özütü, meyve suları ve meyve pulpaları gibi organik bileşikler bazı ortam formüllerde kullanılır. Bu organik maddelerdeki bileşenlerin kültürün gelişmesinden hangisi sorumlu olduğu tam olarak bilinmemektedir.

Bitki büyüme düzenleyicileri

Bitki büyüme düzenleyicilerinin tanımlanmış beş grubu aşağıdaki gibi isimlendirilmiştir:

- Oksinler
- Sitokininler
- Giberellinler
- Etilen
- Absisik Asit

Bitki büyüme düzenleyicilerinin hakkında daha fazla bilgi bir sonraki bölümde detaylı olarak açıklanmaktadır.

Katılaştırıcı maddeler

Kültür ortamları katılaştırmak için agar, agaroz ve jelatin gibi bir jelleştirici madde veya filtre kâğıdı veya bir polipropilen zar gibi mekanik destek malzemeleri kullanılır.

- Agar: Agar, bitki doku kültüründe en yaygın kullanılan jelleştirici maddedir. Kırmızı alglerden türetilen polisakkaridlerin bir karışımıdır. Agar 100 oC'de erir ve yaklaşık 45 °C'de katılaşır. Agar ortam bileşenlerle reaksiyona girmez ve bitki enzimleri tarafından sindirilmez. Agar, asidik koşullar altında iyi jelasyon yapmaz (pH <4,5).
- Agar tümüyle, miktarı ve saflığı farklı olan yabancı maddeler içerir ama bu maddeler genellikle kültürü etkilemez.

- Agaroz: Agaroz agardan ekstrakte edilir. Agaropektin ve sülfat grupları içermez. Agaroz agardan daha yüksek jel dayanıklılığına sahiptir. Agaroz, protoplast ve başka bir kültürde olduğu gibi agardaki kirlilikler istenmediğinde sıklıkla kullanılır.
- Jelatin: Jellan sakızları gelrite ve phytigel gibi, Pseudomonas elodea bakterisi tarafından üretilen bir polisakkaritten oluşur. Açık ve renksel berrak oldukları için kontaminasyonun agardan daha kolay tespit edilmesini sağlar. Kalsiyum ve magnezyum gibi divalent katyonların konsantrasyonu 4 mM'den düşük veya 8 mM'den yüksekse, iyi jelleşmez.

Tamponlar

Bitki doku kültürünün besi ortamlarında tamponlar nadiren kullanılırlar.

1.1.2. Bitki büyüme düzenleyicileri

Bitki büyüme düzenleyicileri (bitki hormonları olarak da adlandırılır), bitki hücrelerinin, dokularının ve organların çoğalmasını ve farklılaşmasını önemli derecede etkileyen birçok kimyasal maddedir. Bitki büyüme düzenleyicileri, hücrelerarası iletişim için kimyasal haberciler olarak işlev görür. Bitki hormonlarının tanımlanmış beş grubu vardır: oksinler, gibberellinler, sitokininler, absisik asit ve etilen. Hücrelerin büyüme ve gelişmesini koordine ederek birlikte çalışırlar. Beş bilinen büyüme düzenleyicilerine ek olarak, diğer iki grup; brasinosteroidler ve poliaminler, bazen bitki büyümesinin düzenlenmesinde etkin oldukları görülmektedir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin tanımlanmış beş grubunun hakkında daha detaylı bilgiler sonraki paragraflarda açıklanmaktadır (Harisha, 2007; Yang Yen).

Oksinler

Bitki hücresi uzamasını uyarır ve kök başlangıç, vasküler farklılaşma, tropik tepkiler, apikal baskınlık ve tomurcukların, çiçeklerin ve meyvelerin gelişimi gibi bir dizi gelişimsel tepkisini etkiler. Oksinler gövde ve kök apekslerinde üretilir ve bitki eksenini boyunca taşınır. Bitki doku kültüründeki oksinler, eksplantlardan kallus oluşturmak için kullanılırlar ve kök ve sürgün morfogenezine neden olurlar. Oksinler genellikle sitokininlerle kombine edildiğinde daha etkili olurlar. Aşağıda

IAA'nın öncüsü olarak, oksin aktivitesine sahip olan bazı indol türevleri ve diğer oksinler yazılmaktadır:

- İndol-3-asetik asit (IAA): 10-30 mM'de kallus indüksiyonu için kullanılır. 1-10 mM'ye kadar düşürülmesi, organogenezini uyarabilir. Işık tarafından inaktive edilir ve bitki hücreleri tarafından kolaylıkla oksitlenir.
- İndol-3-bütirik asit (IBA): Organogenez yoluyla yenilenmiş sürgünlerin in vitro veya ex vitro köklendirilmesi için kullanılır.
- 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D): kallus oluşumu ve kallus ve süspansiyon hücrelerinin farklılaşmamış halde tutulması için en sık kullanılan sentetik oksin. Genellikle tek oksin kaynağı (1-50 mM) olarak veya NAA ile kullanılır.
- p-Klorofenoksiasetik asit 1-Naftalin asetik asit (pCPA NAA): 2,4-D'ye benzer, ancak daha az kullanılır. Genellikle kallus indüksiyonu ve kallus ve süspansiyon kültürlerinin büyümesi için tek oksin kaynağı olarak veya 2,4-D ile kombinasyon halinde kullanılır.

Sitokininler

Doku kültüründe hücre bölünmesini ve sürgün tomurcuğunun oluşumunu uyarabilir. Genellikle embriyogenezini ve kök indüksiyonunu inhibe eder. Doku kültüründe en çok kullanılan sitokininler şunları içerir:

- 6-Furfurilaminopurin (kinetin): Genellikle kallus indüksiyonu, kallus ve hücre süspansiyonlarının büyümesi ve morfogenezini indüksiyonu (1-20 mM) için kültür ortamına dahil edilir. Sürgünlerin, aksiller tomurcukların veya meristemlerin hızlı çoğalmasını sağlamak için daha yüksek konsantrasyonlarda (20-50 mM) kullanılabilir.
- 6-Benzilaminopurin (BAP, BA): Kallus indüksiyonu, kallus ve hücre süspansiyonlarının büyümesi (0,5-5,0 mM) ve morfogenezini indüksiyonu (1-10 mM) için kullanılır.
- N-İzopentenilaminopurin (2iP): Kallus indüksiyonu ve büyümesi (2-10 mM), morfogenezini indüksiyonu (10-15 mM) veya sürgünlerin, tomurcukların veya meristemlerin çoğalması (30-50 mM) için kinetin ve BAP'dan daha az sıklıkla kullanılır.

- Zeatin (Zea): Kallus veya süspansiyon ortamında kullanılır. Morfogenezin indüksiyonu için (0,05-10 mM) kullanılabilir. Zeatin termolabildir ve otoklav içine konmamalıdır.

Giberellinler

Giberellinlerin bitkilerdeki temel etkisi sürgün uzama ve çiçeklenmeyi uyarmaktır. Ayrıca erken embriyo büyümesi ve tohum çimlenmesi sırasında endosperm rezervlerinin harekete geçirilmesi konusunda belirgin bir şekilde yer almaktadırlar. Bitkilerde 80'den fazla farklı giberellin bileşiği bulunur. Ancak, bitki doku kültüründe sadece giberellik asit (GA3) ve (GA4 + 7) kullanılmaktadır. Giberellik asit (GA3), kallus veya süspansiyon ortamında kullanılır (patates bir istisnadır). Sürgün indüksiyonu kültürlerine eklendiğinde (0,03–14 mM), sürgün büyümesini uyarır. Embriyo / yumurta kültürlerinde (0,3-48 mM) gelişimin artırılması için de kullanılır. GA3 ısıya karşı hassastır (termolabil) ve otoklav içine konmamalıdır.

Absisik asit (ABA)

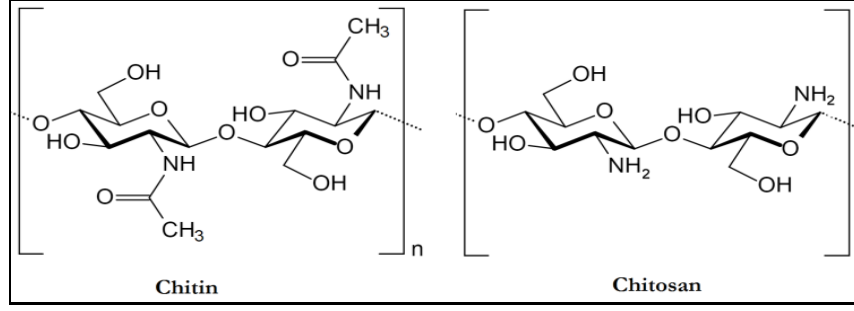
Bitkilerdeki Absisik Asit (ABA), öncelikle tohum çimlenmesini düzenleyen, depolama proteini sentezini indükleyen ve su stresini modüle eden bir terpenoiddir. Bitki doku kültüründe, özellikle olgunlaşma ve çimlenme sırasında somatik embriyogenezise yardımcı olmak için kullanılır.

Etilen

Etilen, $H_2C = CH_2$ kimyasal yapıya sahip basit bir gaz halindeki hidrokarbondur. Normal vejetatif büyüme için gerekli değildir. Ancak, kök ve sürgünlerin gelişiminde önemli bir etkisi olabilir. Etilen bitki doku kültüründe nadiren kullanılır.

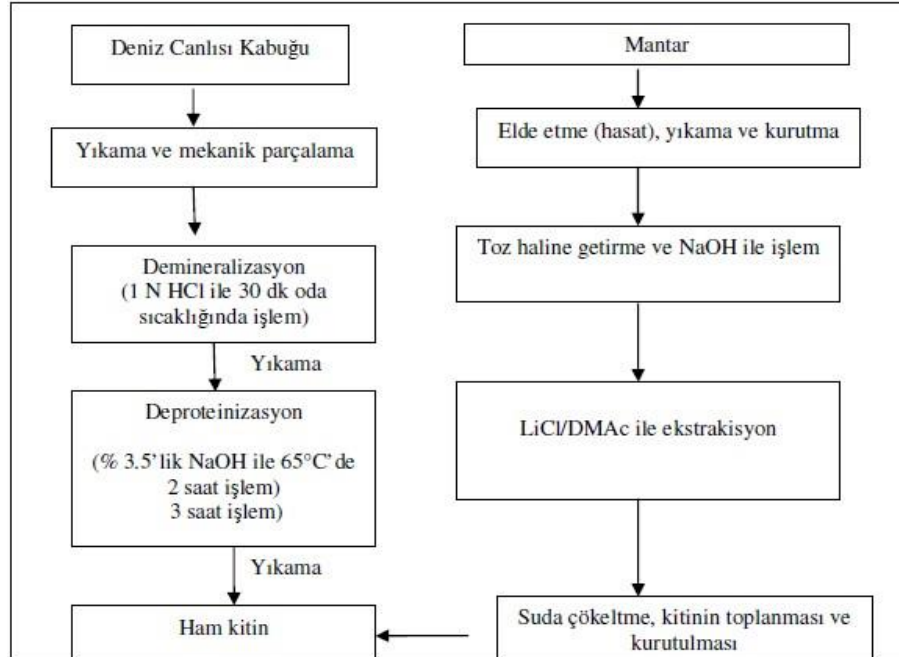
1.2. Kitosanın Genel Özellikleri

Kitosan, kitinin sodyum hidroksit gibi bir bazik madde ile muamele edildiğinde kitin deasetilasyonu ile oluşan bir polisakkarittir. Kitin, asetil gruplarının % 80'inden fazlasını N-asetil-D-glukosamin kalıntılarında uzaklaştırmak için deasetillenir ve onu D-glukosamine dönüştürerek kitosanı oluşturur. Şekil 1.1'de kitin ve kitosanın kimyasal yapıları gösterilmektedir (Nwe ve diğ., 2011).



Şekil 1.1. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları (Nwe ve diğ., 2011)

Kitin veya poli (β - (1 \rightarrow 4) -N-asetil-D-glukozamin), ilk önce 1884'te tanımlanan ve selülozdan sonra en çok bulunan doğal polimerlere ait olan, çok önemli doğal bir polisakarittir. Bu biyopolimer, çok sayıda canlı organizmalar tarafından sentezlenir. Örneğin mantar hücresi duvarlarının, böceklerin dış iskeletlerinin ve kabuklu hayvanların bileşeni olarak sentezlenir. Şu ana kadar kitin ana ticaret kaynakları yengeç ve karides kabuklarıdır. Endüstriyel işlemede, kitin asit işleme ile kalsiyum karbonat çözülür ve bunu takiben proteinleri çözmek için bazik çözelti ile özütlenir (Demir ve diğ., 2009). Buna ek olarak, pigmentleri çıkarmak ve renksiz saf bir kitin elde etmek için renksizleştirme adımı sıkça eklenir (Younes ve diğ., 2015). Şekil 1.2'de deniz hayvanlarının kabukları ve mantarlardan kitinin elde edilmesinin aşamaları gösterilmektedir.



Şekil 1.2. Deniz hayvanlarının kabukları ve mantarlardan kitinin eldesi (Demir ve diğ., 2009)

Deasetilasyon prosesi ile D-glukosamine dönüştürülen N-asetil-D-glukosamin kalıntılarının yüzdesi normalde kitosanın deasetilasyonunun derecesi [degree of deacetylation (DD)] olarak adlandırılır; ama DD'nin tersi olan asetilasyonunun derecesi [degree of acetylation (DA)] bazen kullanılır. Kitin deasetilasyon derecesi (polimerin kökenine bağlı olarak) yaklaşık % 50'ye eriştiğinde, sulu asidik ortamda çözünür hale gelir ve kitosan olarak adlandırılır (Czechowska-Biskup ve diğ., 2012). Kitosanın biyosentetik polimerindeki monomerlerin sayısı polimerizasyon derecesi (degree of polymerization (DP)) olarak ifade edilir. 20'nin altındaki DP'ye sahip kitosan, kitosan oligomerleri olarak ifade edilebilir. Polimerizasyon derecesi (DP) ve asetilasyon derecesi (DA), kitosanın biyolojik aktivitelerini büyük ölçüde etkilediği bilinmektedir (Hembach ve diğ., 2017).

Benzer başlangıç maddelerinden türetilen kitosan, ortalama molekül kütlesi, molekül kütlesi dağılımı ve DD açısından oldukça farklı olabilir. Bu parametrelerdeki farklılıklar, çözünürlük ve bitki uyarma yeteneği gibi, kitosanın fiziksel özelliklerini ve biyolojik aktivitelerini büyük ölçüde etkileyebilir. Başlangıç maddelerindeki farklılıklar, DD'yi modüle ederek NaOH ön muamelesi, boyutu ve poli dispersiteyi modüle ederek kimyasal veya enzimatik hidroliz ile azaltılabilir veya yok edilebilir (Rinaudo M. 2006; Pichyangkura ve diğ., 2015).

Kitosan ve türevleri, biyoyumluluk, biyolojik bozunabilirlik, güvenlik ve ayrıca çeşitli biyolojik aktiviteleri, gibi birçok faydalı özelliğe sahip olduklarından, özellikle biyomedikal, gıda, biyoteknoloji ve farmasötik alanlardaki uygulamalarına çok dikkat gösterilmektedir. Onların çekici biyolojik aktivitelerin arasında; antimikrobiyal, antioksidan ve antitümör aktiviteleri bulunmaktadır. Bu özellikler, kimyasal koruyucuların kullanılmasını önlemek ve kitosanın iyi film oluşturucu özelliklerinden dolayı yenilebilir antimikrobiyal filmler üretmek için özellikle gıda koruma ve ambalajlama alanında tanınmaktadır (Younes ve diğ., 2015).

Kitin ve kitosanın ana özellikleri, örneğin: biyoyumluluk, yenilenebilir köken, toksisite olmama (Ravi Kumar ve diğ., 2000), non-allerjenite, çözünürlük ve biyolojik bozunabilirlik (Patil ve diğ., 2000), belirli farmasötik ve biyomedikal uygulamalar için uygulanır. Buna ek olarak, çekici biyolojik aktiviteleri (antifungal, antibakteriyel, antitümör, immünoadjuvan, antitrombojenik, antikolesteremik) ve

biyo yapışkanlıkları nedeniyle (Venter ve diğ., 2006) film üretme ve yara iyileşmesi için (Khor E. 2002) yanı sıra emilim hızlandırıcılar ve hidratlama maddeleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Kitosan, amaçlanan uygulamaya bağlı olarak lifler, tozlar, filmler, süngerler, boncuklar, çözeltiler, jeller ve kapsüller gibi farklı konformasyonlara işlenebilir (Kardas ve diğ., 2012). Kitosan hem implante edilebilir hem de enjekte edilebilir formlarda ilaç ve aşı verilmesi için oral, nazal ve oküler yollarda kullanılabilir (Mi ve diğ., 2002; Illum ve diğ., 2005).

1.2.1. Bitkiler üzerinde kitosanın etkileri

Kitosan bitkilerde, glukanaaz ve kitinaaz gibi patogenezele ilgili genler gibi çeşitli savunma genlerini uyarır. Ayrıca, reaktif oksijen türleri (ROS) sisteminde, süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz gibi birçok enzimi uyarır. Kitosan hem bitki büyümesini hem de abiyotik stres toleransını uyarıcı bir biyolojik uyarıcı olarak ve patojen direnci uyandırmak için kullanılmıştır. Bu yanıtlar, farklı kitosan temelli yapılara ve konsantrasyonlara, bitki türlerine ve gelişim aşamasına bağlıdır (Pichyangkura ve diğ., 2015).

1.2.1.1. Kitosanın fizyolojik, biyokimyasal ve büyüme etkileri

Kitosan başlangıçta, bezelye (*Pisum sativum* L.) populasyonunda fitoaleksinin (pisatin) üretimini indüklediği ve domates bitkilerinde (*Solanum lycopersicum* L.) bir proteinaz inhibitörünü indüklediği için bitki tepkilerinin bir uyarıcısı olarak rapor edildi (Walker-Simmons ve diğ., 1983). O zamandan beri, kitosanın fizyolojik ve biyokimyasal tepkileri araştırılmış ve hem yaraya (Doares ve diğ., 1995) hem patojen enfeksiyonlara (Bhaskara Reddy ve diğ., 1999) karşı bitki savunma tepkilerinin uyarıcısı olarak davrandığı bulunmuştur.

Hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimi ile bir oksidatif patlama tepkisi, kitosan ile muamele edilen birçok bitkide bulunmuştur (Zhao ve diğ., 2007). Bu, fenolik bileşik biyosentezinde önemli bir enzim olan fenilalanin amonyaklaz (PAL) de dahil olmak üzere bitki savunma enzimlerinin indüksiyonuna neden olur. Hücrede H_2O_2 üretimi de reaktif oksijen türleri (ROS) atma sistemini ve diğer oksidatif strese duyarlı genlerin ekspresyonunu tetikler (Desikan ve diğ., 2001). Ayrıca, kitosan tarafından indüklenen bitki savunma sistemi, nitrik oksit (NO) yolu ile tetiklendiği bulunmuştur

(Zhang ve diğ., 2011; Zhao ve diğ., 2007). Kitosan, kuraklık ve sıcaklık stresi dahil olmak üzere abiyotik streslere karşı direnç uyandırabilir (Górník ve diğ., 2008). Aynı zamanda artan klorofil içeriği kitosan ile muamele edilen birçok bitkinin tepkisidir ve genellikle artmış bir bitki büyümesi ve verim artışı veya artmış net fotosentez oranı ile ilişkilidir (Mondal ve diğ., 2012). Bazı bitkilerde örneğin, çilek (*Fragaria* × *Ananassa* Duch. cv. Sweet Char-lie), yapraklarına uygulanan kitosan püskürtme, vejetatif büyüme (bitki boyu, yaprak / bitki sayısı, yaprak alanı, kök taze ve kuru ağırlıklar ve verim) artırır ama klorofil içeriğini etkilemez (El-Miniawy ve diğ., 2013).

1.2.1.2. Kitosanın sinyal transdüksiyonu ve hücrel etkileri

Kitosan uygulamasından gelen yanıtları ortaya çıkaran sinyal transdüksiyon yolu, hidrojen peroksit ve nitrik oksit sinyallerini içerir ve ayrıca kromatin ile etkileşerek gen ekspresyonunu direkt kontrol edebilir. Kitosan, reseptöre spesifik bir etkileşim yoluyla değil fakat pozitif yüklü kitosan amino grupları ile negatif yüklü hücre fosfolipidler arasındaki yük-yük etkileşimlerini kullanarak bitki hücrelerini uyardığı düşünülmektedir. Kitosan çoklu pozitif yüklere sahip olduğu için DNA üzerindeki negatif yüklü fosfat gruplarına güçlü bir çekim gösterir (Kauss ve diğ., 1989).

Arabidopsis thaliana'da bir kitin reseptörü olan CEBiP tanımlanmasına rağmen, kitosan heptameri ile hiçbir bağlanma aktivitesi göstermemiştir (Kaku ve diğ., 2006). Kitosan bitki hücresi ile etkileşerek hücreye ikincil bir haberci sinyali başlatır ve kloroplastta oktadekanoid yolu ve nitrik oksit (NO) vasıtasıyla hidrojen peroksit (H₂O₂) üretimini tetikler. H₂O₂ hem reaktif oksijen türleri (ROS) sistemini hem de absisik asit (ABA) sentez yolunu tetikler, NO, fosfolipaz C (PLC) ve diasilgliserol kinaz (DGK) (PLC / DGK) yolları vasıtasıyla fosfatidik asit (PA) sentezini düzenler. PA ABI1'i (ABA'nın negatif düzenleyicisi) inhibe ederek ABA etkisini artırır. Daha sonra, ABA, stomaların kapanmasına ve diğer abiyotik strese karşı tepkilere neden olur. H₂O₂, oktadekanoid yolla sentezlenen jasmirik asit (JA) ile aktiviteyi koordine ederek, biyotik strese duyarlı genlerin (örneğin, kitinaz (CHI) veya glukanaaz (GLU) ekspresyonunu düzenler (Pichyangkura ve diğ., 2015).

1.3. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler

Endüstri ve sağlık bilimlerinde, tıbbi ve aromatik bitkilere olan ilgi artmaktadır. Kök, rizom, gövde, soğan, yaprak, soyulmuş kabuk, ahşap, çiçek, meyve ve tohumlar, bitkinin hammaddeleridir. Bunlar, zambak, reçine, esansiyel (uçucu) yağ, uçucu olmayan yağ, mum, özsu, özüt ve baharat gibi maddeler, tıbbi ve aromatik amaçlar için üretilmektedir. Bütün bu ürünlerin dünya çapında ticareti yapılmaktadır. Bazı bitki hammaddeleri tedarikçileri, artık organik olarak yetiştirilen tıbbi bitkiler, şifalı otlar ve baharatları onaylı şekilde sağlamaktadır.

Çin ve Hindistan gibi eski uygarlıklar farmakopelerinde çok sayıda geleneksel tıbbi bitki türüne yer vermiş olup bu bitkiler güneydoğu Asya'da da yaygın olarak kullanılmaktadır. Afrika ve Güney Amerika'da da benzer bir durum söz konusudur. Bu nedenle, dünya nüfusunun çok yüksek bir yüzdesi tıbbi amaçlı olarak şifalı ve aromatik bitkileri kullanmaktadır. Batı tıbbi da son zamanlarda bu konuya önem vermiştir. Örneğin Almanya'da, tüm tıp uygulayıcıları uygulamaya başlamadan önce fitoterapi sınavına girmek zorundadırlar. Avrupa'da ve ABD'de tıbbi, eczacılık ve sağlıkla ilgili okulların fitoterapi konusunda eğitim giderek önem verdikleri görülmektedir. Buna bağlı olarak Batı Dünyasındaki diyet takviyeleri ticaretinin sağlık mağazalarından eczanelere yayıldığı dikkati çekmektedir.

Alternatif tıp, bitki bazlı ürünler içerir, bunların kalitesini, güvenliği ve etkinliğini sağlamak için uygun önlemler bulunmakta olup daha ileri seviyede ABD Gıda ve İlaç İdaresi veya Londra'da oluşturulmuş olan Avrupa Tıbbi Ürünler Değerlendirme Ajansı tarafından daha fazla kontroller yapılmaktadır (Roland, 2002).

1.4. Oregano (*Origanum*) Türleri

Oregano, fenolik monoterpeneoidlerden zengin olan *Origanum* (Lamiaceae) ve *Lippia* (Verbenaceae) türlerinin ticari adıdır. *Origanum*'larda çoğunlukla karvakrol (oregano cinsinden bir bitkiyi karakterize eden sorumlu bileşik) ve bazen timol ile birlikte p-simen ve γ -terpinene bulunmaktadır. *Origanum*, genel olarak dünyanın her tarafında baharat olarak kullanılan, 60'dan fazla bitki türünün oluşturduğu, genel aroma ve lezzet katmak için kullanılan bir bitki cinsidir. Avrupa oreganosu (*Origanum* sp.) Lamiaceae ve Meksika oreganosu (*Lippia* sp.) ise Verbenaceae familyasına dahildir.

Avrupa oreganosu, et ve sosis ürünleri, salatalar, güveçler, soslar ve çorbalarda aroma olarak kullanılır. Önceden, şerbetçiotu katılmadan önce, biraya tat vermek için de kullanılmıştır. Esansiyel yağı ve yağ reçinesi yoğun olarak bitki materyali yerine kullanılır ve gıda ürünleri, kozmetik ürünler ve alkollü içkilerde bulunur. Meksika Oreganosu ağırlıklı olarak Meksika yemekleri, pizza ve barbekü soslarının lezzetlendirilmesinde kullanılır. Meksika Oreganosu, Avrupa Oreganosundan biraz daha keskin ve acı bir lezzete sahiptir.

Oregano, uçucu yağlar içerdiği için otlar ve baharat dünyasında yaygın olarak bilinir. *Origanum* türleri polifenoller (özellikle rosmarinik asit), lipidler ve yağ asitleri, flavonoidler ve antosiyanidler gibi diğer bileşiklerden de zengindir.

Bitkilerin orijinal taze maddeleri kuru otların kalitesini belirleyen temel unsurdur. Bununla birlikte, kurutma yöntemi, ambalaj türü ve saklama koşulları, bitkilerin mikrobiyolojik kalitesi üzerinde net etkilere sahiptir.

1.4.1. *Origanum*'un taksonomisi

Origanum cinsi (Lamiaceae), Yunanca oros: dağ ve tepe ve ganos: süsleme kelimelerinden türemiştir. *Origanum* türleri büyük morfolojik ve kimyasal çeşitlilik ile karakterize edilirler. Ietswaart taksonomik revizyonuna istinaden *Origanum* on kısmı ayrılmaktadır; (*Amaracus* Bentham, *Anatolicon* Bentham, *Brevifilamentum* Ietswaart, *Longitubus* Ietswaart, *Chilocalyx* Ietswaart, *Majorana* Bentham, *Campanula ticalyx* Ietswaart, *Elongatispica* Ietswaart, *Origanum* Ietswaart, *Prolaticorolla* Ietswaart) (Skoula ve diğ., 2002).

Lamiaceae familyasına ait yaklaşık 236 cins ve 7500 tür bulunmaktadır (Temel M. 2014). *Origanum* cinsi büyük bir morfolojik ve kimyasal çeşitlilik ile karakterize edilir. Bu cinse ait 10 bölüme ayrılan kırk dokuz takson, çoğu Akdeniz'de çok yerel bir dağılıma sahiptir. Üç takson Fas ve Güney İspanya, ikisi Cezayir ve Tunus'ta, üçü Cyrenaica (Libya doğu sahili)'ya endemiktir, dokuzu Yunanistan, Güney Balkanlar ve Asya Minor (altısı yerel Yunan endemik), yirmi bir de Türkiye, Kıbrıs, Suriye ve Lübnan (21'i yerel Türk endemiktir), sekizi Filistin, Ürdün ve Sina Yarımadasında yerel olarak dağıtılmaktadır (Kokkini, 1997).

Türkiye florasında toplam 32 *Origanum* taksonu bulunmakta olup Türkiye, *Origanum* 'un gen merkezi olarak belirlenmiştir. Taksonomisinde çok karmaşık olan *Origanum* biyotipleri, bitkinin toprak üstü kısımlarındaki uçucu yağın veya uçucu yağ bileşiminin içeriğine göre farklılık gösterir (Temel M., 2014).

Origanum bitkilerinin uçucu yağları, bitkiler tarafından üretilen toplam miktara (iz miktardan 8 ml / 100 g kuru ağırlığa kadar değişen) ve bitkilerin nitel bileşimine göre değişir. Geniş bir kimyasal çeşitlilik, yaygın olarak kullanılan *O. vulgare* gibi tek bir *Origanum* türünün içinde bile bulunur. *O. vulgare* bitkilerinde nicel ve nitel esansiyel yağların çeşitliliği onun coğrafi dağılışına veya bitki toplama zamanına bağlıdır (Kokkini, 1997).

Uçucu yağ içeriği yüzde 2'den fazla olan *Origanum*, çoğunlukla karvakrol ve / veya timol (önemli miktarda γ -terpinene ve p-simen ile birlikte) veya linalool, terpinene-4-ol ve sabinen hidrat, ana bileşenler olarak karakterizedir. Ticari olarak en çok bilinen üç Oregano türünün *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Yunan Oregano), *O. heracleoticum* ve *O. onites*'den elde edilen kış tatlı marjoramı veya saksı marjoramı (Türk Oregano)'un her birinin uçucu yağ içeriği yüzde 2'den fazladır (Skoula ve diğ., 2002).

Uçucu yağ içeriğine göre, *Origanum* cinsinin farklı taksonları üç ana gruptan ayırt edilebilir (Kokkini, 1997):

1. Uçucu yağı "zayıf" olan taksonlar: Uçucu yağ içeriği % 0,5'den az (ml / 100 g kuru ağırlık), örn. Yunan endemik *O. calcaratum* (Karousou 1995).
2. % 0,5 ile 2 arasında uçucu yağ içeriği olan taksonlar: Örn. Girit endemik taksonu *O. microphyllum*, (Girit marjoramı) olarak bilinir (Karousou 1995).

Uçucu yağı "zengin" olan taksonlar: Uçucu yağ içeriği % 2'den fazla, örn. *O. vulgare* ssp. *hirtum* (Yunanca kekik) ve *O. onites* (Kokkini ve diğ. 1991; Vokou ve diğ. 1988, 1993).

1.4.2. Türkiye'deki *Origanum* türleri

Türkiye, dünya genelinde *Origanum* ticaretinde başta gelmekte (toplam üretimin 2/3'ünden fazlası) olup bunu Meksika, Yunanistan ve diğer Akdeniz ülkeleri izlemektedir. Karvakrol bakımından zengin olan oregano türleri Türkiye'de "kekik" olarak adlandırılmaktadır. *Origanum onites* (İzmir kekiği, bilyalı kekik, Türk Kekiği) Türkiye'nin ticari *Origanum* türlerinin başında gelmekte olup hem yabani hem de ekili bitkilerden elde edilmektedir. Ticari kullanım için yabani olarak toplanan diğer *Origanum* türleri: *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (İstanbul kekiği, kara kekik, Yunan kekiği), *Origanum minutiflorum* (Yayla kekiği, Toka kekiği, Sütçüler kekiği), *Origanum syriacum* var. *bevanii* (İsrail kekiği)'dir. Son zamanlarda, *Origanum acutidens* gibi başka oregano yöresel türleri de Türk pazarına girmiştir. Türkiye'deki *Origanum* türleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır (Başer, 2002):

Sectio Amaracus (Gleditsch) Benth

1. *O. boissieri* Ietswaart [E]
2. *O. saccatum* Davis [E]
3. *O. solymicum* Davis [E]

Sectio Anatolicon Benth

4. *O. hypericifolium* Schwartz et Davis [E]
5. *O. sipyleum* L. [E]

Section Brevifilamentum Ietswaart

6. *O. acutidens* (Hand.-Mazz.) Ietswaart [E]
7. *O. bargyli* Mouterde
8. *O. brevidens* (Bornm.) Dinsmore [E]
9. *O. haussknechtii* Boiss. [E]
10. *O. leptocladum* Boiss. [E]
11. *O. rotundifolium* Boiss.
12. *O. munzurensis* Kit Tan et Sorger [E]
13. *O. husnucan-baseri* H. Duman, Z. Aytac et A. Duran [E]

Sectio Longitubus Ietswaart

14. *O. amanum* Post [E]

Sectio Chilocalyx (Briq.) Ietswaart

15. *O. bilgeri* Davis [E]

16. *O. micranthum* Vogel [E]

17. *O. minutiflorum* Schwartz et Davis [E]

Sectio Majorana (Miller) Benth.

18. *O. majorana* L. [Syn.: *O. dubium* Boiss.]

19. *O. onites* L. [Syn.: *O. smyrnaeum* L.]

20. *O. syriacum* var. *bevani* (Holmes) Ietswaart [Syn.: *O. bevani* Holmes]

Sectio *Origanum* L.

21. *O. vulgare* L. ssp. *vulgare* [Syn.: *O. creticum* L.]

22. *O. vulgare* L. ssp. *gracile* (Koch) Ietswaart [Syn.: *O. tyttanthum* Gontsch.]

23. *O. vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart [Syn.: *O. heracleoticum* L.]

24. *O. vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) Hayek [Syn.: *O. heracleoticum* L.]

Sectio Prolaticorolla Ietswaart

25. *O. laevigatum* Boiss. [E]

Hibritler

26. *O. X dolichosiphon* P.H. Davis [*O. amanum* Post X *O. laevigatum* Boiss.] [E]

27. *O. X intermedium* P.H. Davis [*O. sipyleum* L. X *O. onites* L.] [E]

28. *O. X symeonis* Mouterde [*O. syriacum* L. X *O. laevigatum* Boiss.] [E]

29. *O. X intercedens* Rech. fil. [*O. vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart X *O. onites* L.]

30. *O. X vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart X *O. micranthum* Vogel [E]

31. *O. X adanense* Başer et Duman [*O. laevigatum* Boiss. X *O. bargyli* Mouterde] [E]

32. *O. X majoricum* Cambess [*O. vulgare* L. ssp. *virens* (Hoffm. et Link) Ietswaart X *O. majorana* L.]

Not [E] = Endemik (yöresel).

Türkiye’de *Origanum*, çorbalar, salatalar, zeytinler, çeşitli soslar, tavuk ve kırmızı et yemekleri, özellikle ızgara veya kızarmış dana eti ve kuzu pirzolası gibi yemeklerde tatlandırıcı çeşnisi olarak kullanılır. Ayrıca Türkiye'nin popüler bitkisel çaylarından biridir. Buna ek olarak, kuru *Origanum* türleri, tıbbi etkiye sahip olan uçucu yağ (kekik yağı) ve aromatik su veya hidrozolün (kekik suyu) üretimi için kullanılır (Ayd ve diğ., 1993; Baser, 1995; Baytop ve Baser, 1995; Tümen ve diğ., 1995; Baser, 1998; Baser, 2002; Baytop, 1999).

Dünyada Türk oreganosunun tercih edilmesinin nedeni, Türkiye'de oregano bitkilerin işlenmesi konuda geliştirilen uzmanlık ve beceri kaynaklıdır. Son ürün temizdir ve kabul edilmiş uluslararası standartlara uygundur. Mikrobik kontaminasyon ve böcek parçacıkları da dahil olmak üzere yabancı madde içermemektedir (Olivier, 1997).

1.4.3. Oregano'nun yapısal ve morfolojik özellikleri

Origanum türleri, güney Avrupa ve güney batı Asya'nın dağlık bölgelerindeki kuru, kayalık kalkerli topraklarda ve Akdeniz ülkelerinde yaşayan bitkilerdir. Uzun ömürlü sağlıklı bitkiler, 0,8 ila 1 m arasında bir yüksekliğe ulaşır ve tüylü (trikomlu) saplar, ovat, koyu yeşil yapraklar ve beyaz veya mor çiçekler taşırlar. Oreganonun kök yapısı, toprağı tutacak ve dik yamaçlarda yıkanmasını önleyecek şekildedir. Avrupa kaynaklı oregano öncelikle Yunanistan, İtalya, İspanya, Türkiye ve ABD'de üretilmektedir. *Lippia* (Verbenaceae) türleri, *Origanum* türlerinden daha büyük yaprakları olan ve esasen Meksika'dan gelen küçük çalılardır (Bosabalidis, 2002).

Origanum 'un (Lamiaceae), kare şeklinde gövdesi ve aromatik karşılıklı yaprakları vardır (Şekil 1.3). *Origanum* 'un çiçekleri, en üstteki yaprakların tabanında veya terminal uçlarında kümeler halinde düzenlenmiştir. Bireysel çiçeklerin iki dudağı vardır; üst olanlar iki loblu ve alt olanlar üç lobludur. Her çiçek olgunlaştığında dört küçük tohum benzeri yapı üretir (Şekil 1.4). Yapraklar, bitkiye aromasını ve lezzetini veren uçucu yağ içeren küçük bezlerle noktalanmışlar. (Simon ve diğ., 1984).



Şekil 1.3. *Origanum* yapraklarının görünümü (URL 1)

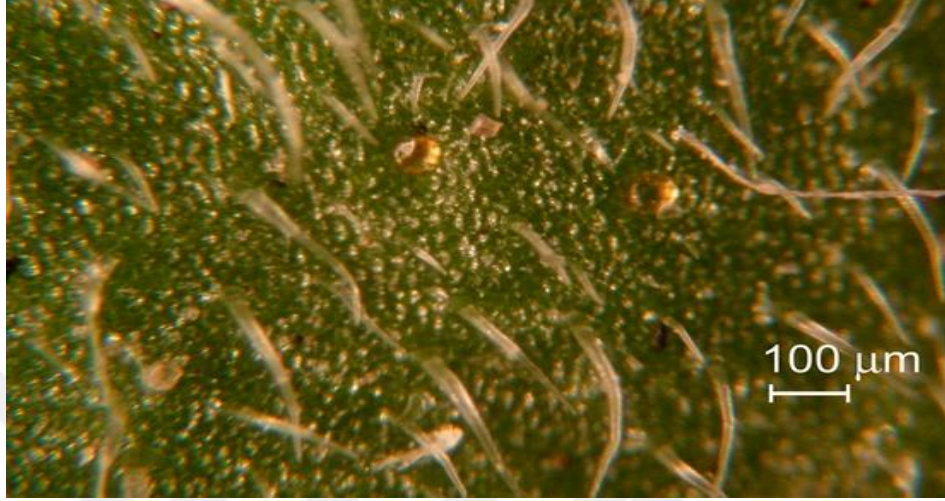


Şekil 1.4. *Origanum* çiçeklerinin görünümü (URL 2)

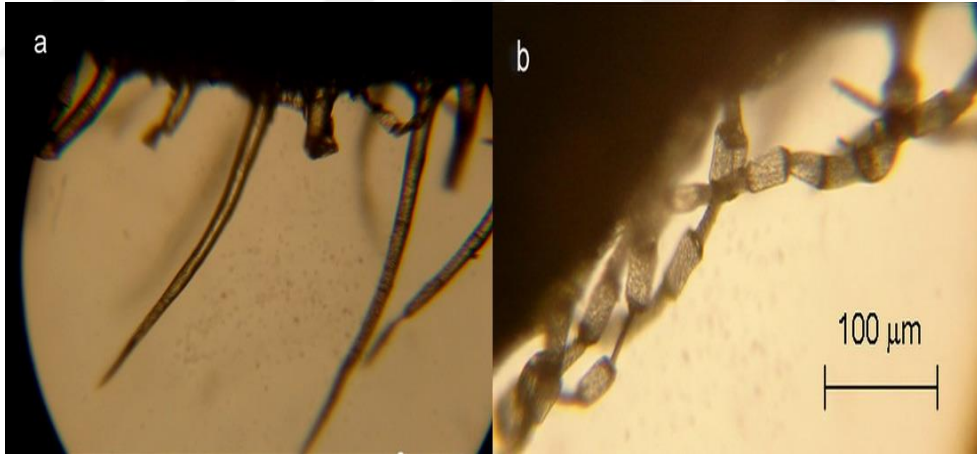
Origanum bitkilerin dikkat çekici morfolojik özelliklerinden biri, toprak üstü organları örten glandüler ve glandüler olmayan trikomların (tüy) varlığıdır. Optik yansıma mikroskopi ile gözlemlenen glandüler tüyler yeşil yaprak yüzeyinde kırmızımsı-sarı damlalar olarak görülürken, glandüler olmayan tüyler renksiz tüyler olarak görülür (Şekil 1.5). Her iki tüy türü de epidermal (protodermal) hücrelerden kaynaklanır. Her epidermal hücre, Netolitzky (1932) 'e göre, pratikte bir tüylere dönüşme potansiyeline sahiptir. Ancak, bir dizi dış ve iç faktör, tipik epidermal hücrelerin hangisi tüylere dönüşeceğini ve ayrıca hangi morfolojik modeli izleyeceğini belirler. Glandüler tüyler, vejetatif organlarında (gövde, yaprak, brakte) çok sayıda bulunur, üreme organlarında ise (kaliks, korolla) yoğunluğu azalır. Çiçeklerin erkek ve dişi organların üzerine, hiçbir glandüler tüyler olduğu rapor edilmemiştir (Werker ve diğ., 1985).

Glandüler tüyler; esansiyel yağ, reçineler, zamklar, nektar, tuzlu solüsyonlar vb. gibi geniş bir spektrumda çeşitli maddeleri biyosentezler ve salgılar. Glandüler olmayan tüyler, glandüler tüyler gibi epidermal eklerdir, ancak, anatomik, ultrastrüktürel ve fonksiyonel bakış açılarından daha az karmaşıktır. Glandüler olmayan tüylerden dallanma sıklıkla (*O. dictamnus*), veya nadiren (*O. vulgare*, *O. onites*, *Origanum x intercedens* vb.) olabilir (Bosabalidis, 2002). Glandüler olmayan tüyler transmisyon

ile ayrıntılı olarak incelenmiş, taze (Şekil 1.6 a) ile kurutulmuş yapraklar arasında ilginç bir farklılık bulunmuştur (Şekil 1.6b). Taze yapraktaki tüylerin yönü homojen iken, kurutulmuş tüyler çökmüş olarak ve daha yüksek ışık saçılımı görüldü. (Novo ve diğ., 2013).



Şekil 1.5. Optik yansıma mikroskopisi ile gözlemlenen *Origanum* taze yaprak (Novo ve diğ., 2013).



Şekil 1.6. Optik transmisyon mikroskopisi ile gözlenen *Origanum* glandüler olmayan tüyler: (a) taze yaprak; (b) kurutulmuş yaprak (Novo ve diğ., 2013).

Origanum'un yaprakları dikotik anatomik desen olarak tipiktir. Mezofildeki kloroplastlar sayısızdır ve iyi gelişmiş bir tilakoid sistemi ve ayrıca büyük nişasta taneleri içerirler. Birçok mezofil hücrelerinde, sitoplazmada paralel çizgilerden oluşan proteinli kristalloidler (protein çift sarmallar) serbest olarak bulunur (Bosabalidis, 2002).

Origanum'un gövdesi enine kesitte kare şeklindedir. Genç gövdelerde, korteks klorenkima hücreleri içerir ve dört köşeli gövdenin her köşesinde açılal kollenkima gelişir. *Origanum*'un birincil kökü tipik olarak bir epidermis, bir korteks ve vasküler silindirden oluşur. *Origanum*'un birincil köklerinin kesitleri üzerinde yapılan morfolometrik tahminlerde, toplam kök hacminin yaklaşık yüzde 20'sinin epidermis, yüzde 60'ının korteks (endodermis dahil) ve yüzde 20'sinin de vasküler silindir (perikals dahil) tarafından işgal edildiği düşünölmektedir (Bosabalidis, 2002).

1.4.4. *Origanum*'un tıbbi önemi

Tıbbi bir bitki olarak, *Origanum* türleri geleneksel olarak gaz giderici, terletici, balgam söktürücü ve tonik olarak kullanılmaktadır. Buna ek olarak, kolik, öksürük, baş ağrısı, sinirlilik, diş ağrısı ve düzensiz menstrüel döngülere karşı halk tedavisinde kullanılmaktadır. Türk köylüleri, geleneksel olarak kekik suyunu kullanırlar. Bu aromatik su *Origanum* otlarının damıtılmasından ve uçucu yağı uzaklaştırdıktan sonra elde edilir ve son yıllarda ticari bir mal haline gelmiştir. *Origanum* yağı güçlü bir dezenfektandır, içindeki karvakrol ve timol, anthelmintik, antibakteriyel ve antifungal maddeler olarak sayılır. *Origanum* türlerin belgelenmiş böcek öldürücü ve allelopatik özellikleri, potansiyel değerini biyolojik bir kontrol maddesi olarak önermektedir (Baricevic, 2002).

Ticari oregano'nun temel bileşeni olan monoterpenik fenol 'karvakrol' düşük toksisiteye sahip olup şaşırtıcı derecede yüksek ve çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olan bu basit molekül, sadece insanlar için değil aynı zamanda hayvanlar ve bitkiler için de yeni ilaçların geliştirilmesi için umut vermektedir. Karvakrol bakımından zengin olan yağlar, antibakteriyel ve antifungal maddeler olarak bilinir ve vücuda dışarıdan ovuşturarak romatizmaya karşı bir ağrı kesici olarak kullanılır. Buna ek olarak hayvan yemi içeriklerinde ve gıdaların bakteriyel veya fungal bozulmalara karşı korunması için ve antioksidanlar olarak kullanımı giderek artış göstermektedir. Karvakrol bakımından zengin *Origanum* suyu (keklik suyu), kan kolesterolü ve glikoz seviyelerini düşürmek için ve aynı zamanda gastrointestinal bozukluklar için ağızdan alınır (Aydin ve diğ., 1993; Baser, 1995; Baytop ve Baser, 1995; Baytop, 1999; Baricevic, 2002).

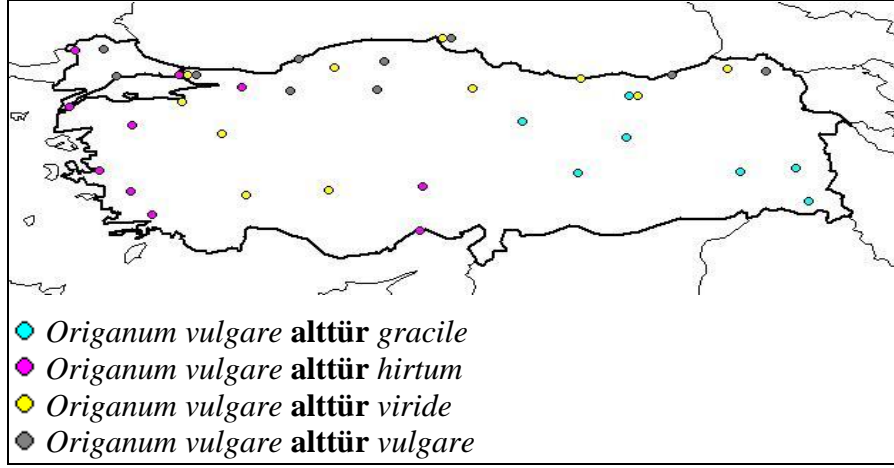
Origanum türlerinin genel olarak güvenli doğal ekstrakt ve uçucu yağlara sahip oldukları kabul edilmektedir. Fakat oregano, hamilelik sırasında yemekten kaçınmaya neden olan yaygın besin maddelerinden biridir. Buna ek olarak, bazı raporlara göre oregano alımı sistemik alerjik reaksiyonlara neden olabilir. *O. vulgare* ile muamele edilmiş gıda alımından sonra hassas hastalarda ortaya çıkabilen potansiyel alerjik tepkiler, bir spesifik serum IgE düzeyinin yükselmesi ve sistemik alerjik reaksiyonları içermektedir (Benito ve diğ., 1996).

1.4.5. *Origanum vulgare* hakkında bilgiler

Origanum türleri arasında en fazla çeşitlilik gösteren tür *Origanum vulgare*'dir. *Origanum vulgare* için bildirilen yaşam şartları, yıllık yağış 0,4-2,7 m, toprak pH'ı 4,5-8,7, ve sıcaklık şartları 5-28 °C arasındadır. Ticari materyalin çoğu yabancı bitkilerden toplanmasına rağmen, biraz alkali olan hafif, kuru, iyi drene edilmiş topraklarda tohumlanabilir ve hasat yılda iki ila altı kez yapılabilir (Baser, 2002). Çiçeklenme zamanı Mayıs ayı ile Ekim ayı arasında olduğu belirlenmiştir. *Origanum vulgare*'nin deniz seviyesinden 4000 m yüksekliğe kadar kalkerli-kalkersiz, taşlı bayırlar, kayalık yerler, hatta dik yamaçlarda yetiştikleri belirtilmiştir (Doğan ve diğ., 2005).

Türkiye'de *Origanum vulgare* L.'nin dört alt türü (ssp. *gracile*, ssp. *hirtum*, ssp. *viride* ve ssp. *vulgare*) (Şekil 1.7), ve üç hibridi (*O. vulgare* L. ssp. *hirtum* x *O. onites* L., *O. vulgare* L. ssp. *hirtum* x *O. micranthum* Vogel ve *O. vulgare* L. ssp. *virens* X *O. majorana* L.) yetişilmektedir (Temel, 2014; Bakis ve diğ., 2018). Türkiye'deki *Origanum vulgare* L.'nin alt türlerinin genel bilgilerinin karşılaştırılması Tablo 1.1'de gösterilmektedir.

Bu çalışmada kullanılan bitki, *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*'dir (Şekil 1.8). Çok yıllık, sık tüylü, pembe çiçekli, kuvvetli kokulu bir bitki türüdür. *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* bitkisinin kimyasal analizlerinde esansiyel yağının ana bileşenleri, fenoller (karvakrol, timol), p-cymene, γ -terpinene , germakren-D ve terpinen-4-ol olarak bildirilmiştir (Şahin ve diğ., 2004).

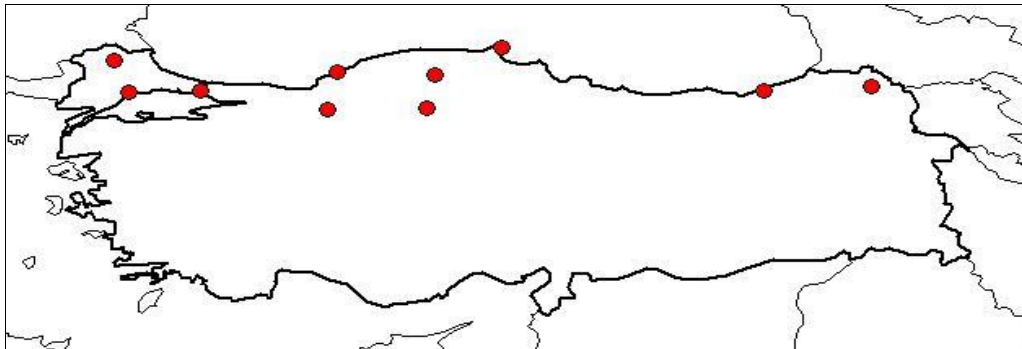


Şekil 1.7. *Origanum vulgare* L.'nin alt türlerinin Türkiye'deki coğrafi dağılımı (Bakis ve diğ., 2018).



Şekil 1.8. *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* L (URL 3).

Origanum vulgare L. ssp. *vulgare*'nin Türkiye üzerindeki coğrafi dağılımı Şekil 1.9'da gösterilmektedir.



Şekil 1.9. *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*'nin Türkiye'deki coğrafi dağılımı (Bakis ve diğ., 2018)

Tablo 1.1. Türkiye'de *Origanum vulgare* L.'nin alt türlerinin ekolojik ve biyocoğrafik özelliklerinin karşılaştırılması (Bakis ve diğ., 2018)

	Ömür	Yapı	Çiçeklenme	Habitat	Yükseklik	Endemik	Element	Türkiye dağılımı	Genel Dağılımı
<i>Origanum vulgare alttür gracile</i>	Çok yıllık	ot	5-10	kuru tepe ve kayalık yamaç, kalkerli ve kalkersiz toprak, konifer veya karışık ormanlar	0-2500	Endemik değil	İran-Turan	D. Anadolu	K. Irak, İran, Afganistan, Pakistan, Transhazar
<i>Origanum vulgare alttür hirtum</i>	Çok yıllık	ot	5-10	kuru tepe ve kayalık yamaç, kalkerli ve kalkersiz toprak, konifer veya karışık ormanlar	0-2500	Endemik değil	D. Akdeniz	Trakya, B. ve G. Anadolu	Yunanistan, Ege
<i>Origanum vulgare alttür viride</i>	Çok yıllık	ot	5-10	kuru tepe ve kayalık yamaç, kalkerli ve kalkersiz toprak, konifer veya karışık ormanlar	2-500	Endemik değil	Bilinmiyor	K. Türkiye, O. ve GB. Anadolu	
<i>Origanum vulgare alttür vulgare</i>	Çok yıllık	ot	5-10	kuru tepe ve kayalık yamaç, kalkerli ve kalkersiz toprak, konifer veya karışık ormanlar	0-250	Endemik değil	Avrupa-Sibirya	K. Türkiye	Avrupa, GB., O. ve D. Asya, Doğuya Doğru Tayvan

1.4.5.1. *Origanum vulgare*'nin esansiyel yağları

Aromatik bitkiler, aromaları ve tıbbi özellikleri açısından büyük ilgi görmektedir. İnsan tüketimi ile birlikte, hayvanların gıda maddeleri ve süs amaçlı olarak da kullanılmaktadır (Dadalioglu ve diğ., 2004; Baydar ve diğ., 2004; Vardar ve diğ., 2007; Bouhdid 2008).

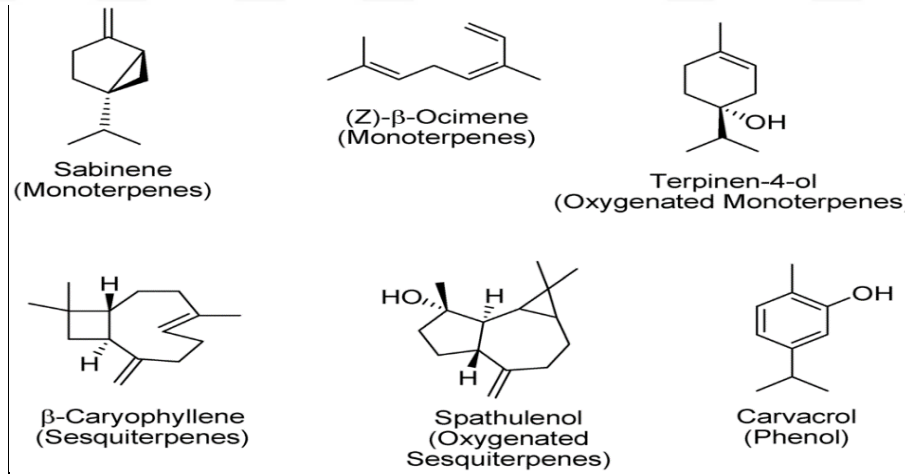
Genelde çiçekli bitkiler daha çok uçucu yağlar içermektedir. Lamiaceae (Labiatae), Pinaceae, Apiaceae (Umbelliferae), Lauraceae, Rutaceae, Myrtaceae, Asteraceae (Compositae), Brassicaceae, Piperaceae, Iridaceae, Ranunculaceae ve Verbenaceae familyaları en fazla uçucu yağ içeren familyalardandır. Bu familyalara ait uçucu yağ içeren çok sayıda tür bulunmaktadır. Bu türler aromatik uçucu yağ içerdikleri için çok önem kazanmışlardır. Bu aromatik türlerin büyük bir kısmı, Akdeniz, Avrupa-Sibirya ve İran-Sibirya bölgelerinde bulunan Lamiaceae familyasına aittir. Bu familyanın içinde *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* en çok kullanılan aromatik bitkilerden biridir (Koyucu, 2014; Çelen, 2006).

Origanum vulgare'nin esansiyel yağı bileşimi, iklim, yükseklik, hasat zamanı ve büyüme aşamasına bağlıdır. Akdeniz ikliminde ya da kontinental bir iklimde yetişen *O. vulgare*, yüksek oranda fenoller (Hristova ve diğ., 1999) veya terpenik alkoller içerir (Tkachenko ve diğ., 2002). Ancak, aynı iklim içindeki ticari ve yabani bitkiler arasındaki değişkenlik verim ve fenolik içerik bakımından yüksek kalmaktadır (Hristova ve diğ., 1999). Genel olarak, uçucu yağlar sıcak yaz koşullarında zirveye ulaşırlar ve % 60-75 fenol içeren yağ üretirler. Çoğunlukla karvakrol, timol, p-simen ve γ -terpinen ile birlikte *Origanum* uçucu yağların ana bileşenleri olarak bildirilmektedir (Viturro ve diğ., 2010; Rhayour ve diğ., 2003).

İtalya'da yapılan bir çalışmada, *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*'nin esansiyel yağlarının kimyasal bileşimini belirleme amacıyla, tam çiçeklenme döneminde ve iki farklı mekansal dağılım şartlarında yetiştirilen *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*'nin hem yaş hem kuru bitki örnekleri test edilmiştir. Bileşenler, biyogenetik sınıflandırmalara göre gruplandırılmıştır. Genel olarak, yağın % 90,4 – 93,9'unu temsil eden 120 bileşik, gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ve gaz kromatografisi (GC) ile belirlenmiştir (De Falco ve diğ., 2013).

O. vulgare türlerinin, farklı alttürlerin varlığına ve aynı zamanda çevre ve iklim koşullarına bağlı olarak uçucu yağ bileşiminde büyük değişkenlik sunduğu bilinmektedir. Birkaç *Origanum* türünün uçucu yağları için iki ana kemotip öngörülmüştür; birincisi esas olarak monoterpen alkoller, terpinen-4-ol ya tek başına ya da cis- ve trans-sabinen hidrat ile birlikte, diğeri fenoller (timol ve / veya karvakrol) açısından zengindir. *O. vulgare* ssp. *vulgare*'nin uçucu yağının bilinen kemotipleri ise, ana bileşenler olarak fenoller (timol ve / veya karvakrol) veya germakren-D ve terpinen-4-ol içerenlerdir (Şahin ve diğ., 2004).

Türkiye'de yapılan bir çalışmada, Doğu Anadolu Bölgesinde bulunan *O. vulgare* ssp. *vulgare*'nin esansiyel yağların kimyasal bileşimi, gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılarak analiz edilmiş ve esansiyel yağın yaklaşık %89'unu temsil eden 62 bileşik tespit edilmiştir. Bu çalışmanın bulgularına göre, ağırlıklı olarak karyofilin / spathulenol ve ikinci olarak germakren-D'den oluşan yeni bir yağ kemotipi gösterilmektedir (Şahin ve diğ., 2004). *Origanum vulgare*'nin uçucu yağların temel bileşenlerinin kimyasal yapıları Şekil 1.10'da gösterilmektedir (De Falco ve diğ., 2013).



Şekil 1.10. *Origanum vulgare*'nin uçucu yağların temel bileşenlerinin kimyasal yapıları (De Falco ve diğ., 2013)

Bitki esansiyel yağlarının etki mekanizması ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. *Origanum vulgare*'nin yağlarının (özellikle içerisinde fenolik yapıdaki karvakrol ve timol bileşikleri) antioksidan, antibakteriyel, antifungal, gaz giderici, antispazmodik, allelopatik ve analjezik etkinliklere sahip oldukları gösterilmiştir (Şahin ve diğ.,

2004; Souza ve diğ., 2007; Saraç ve diğ., 2009; Coelho da Costa ve diğ., 2009; Tommasi ve diğ., 2009; Kordali ve diğ., 2009; De Souza ve diğ., 2016; Dragoeva ve diğ., 2014). Buna ek olarak, sindirim fizyolojisi üzerindeki ve sindirim sistemi florasındaki etkileri gösterilmiştir (Franz ve diğ., 2009).

İtalya’da yapılan bir çalışmaya göre, *O. vulgare*’nin uçucu yağları ağırlıklı olarak Gram pozitif patojenlere karşı aktivite göstermiş, bunların arasında *Bacillus cereus* ve *B. subtilis*’in en fazla etkilendiği belirtilmiştir. Gram-negatif bakteriler arasında yalnızca *E. coli* etkilenmiştir (De Falco ve diğ., 2013). İnsanlarda bazı rahatsızlıklara neden olduğu bilinen seçilmiş on Gram pozitif ve Gram negatif bakteri suşlarına karşı, *O. vulgare*’nin esansiyel yağlarının Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) ve Minimum Bakteri Konsantrasyonu (MBK) değerleri Tablo 1.2’de gösterilmektedir.

Tablo 1.2. *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* esansiyel yağlarının MİK, ve MBK* ($\mu\text{g} / \text{mL}$) ve referans antibiyotik MİK değerleri (De Falco ve diğ., 2013)

Bakteri türü	Yaş	Kuru	G
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	50 (100)	50	1,56
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	50 (100)	50	1,56
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 2592	50 (100)	50 (100)	3,12
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	50 (100)	50 (100)	6,25
<i>Streptococcus faecalis</i> ATTC 29212	100	50 (100)	>100
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	100	50 (100)	3,12
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	100	100	100
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	>100	100	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>100	>100	12,5

* MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu, MBK: Minimum Bakteri Konsantrasyonu. MBK değerleri, MİK değerlerinden farklı olduğunda parantez içinde rapor edilmiştir; G: Gentamisin.

1.4.5.2. *Origanum vulgare*'ye ait bazı çalışmalar

Muhtemelen dünyanın ticari olarak en değerli baharatı olmasına rağmen, *Origanum* bitkileri biyoteknoloji için henüz yeni bir hedeftir. Şimdiye kadar, birkaç araştırmacının *Origanum* bitkilerinden doku kültürlerinin oluşturulması ve bazı durumlarda fidelerin yenilenmesi hakkında raporları bulunmaktadır. Hücrelerin ve organların *in vitro* kültürü, geliştirilmiş özelliklere sahip olan *Origanum* bitkileri için mikroçoğaltım imkânı sunar. Ayrıca, seçkin *Origanum* germplazmını sürdürmek için çok önemli bir katkıda bulunabilir.

Origanum vulgare'nin uçucu yağının ana bileşenlerinin antimikrobiyal ve antioksidan özellik gösterdiğini birçok araştırmada tespit edilmiştir.

(Adam ve diğ. 1998) fareler üzerinde yaptıkları araştırmalarında, *Trichophyton rubrum*, *Malassezia furfur* ve *Trichosporon beigeli* mikroorganizmalarına karşı, *Origanum vulgare*'nin yüksek fungisidal etkilerinin olduğunu tespit etmişler. Bitkilerin ekstraktlarının uygulanmasından altı saat sonra mikroorganizmaların hücre aktivitelerinin % 95 oranında azaldığını gözlemlemişlerdir.

(Gill 1999) etlik piliçlerin yem ve içme sularına *Origanum* esansiyel yağı ilave edildiğinde, *E. acervulina* ile *E. tenella*'ya karşı antioksidan etkileri ve ayrıca koksidiyozis ve kolibasillozis gibi hastalıkların kontrol edilmesinde olumlu sonuçlar gösterdiğini bildirmiştir.

(Bampidis ve diğ. 2005) 1-84 günlük olgunlaşmamış dişi hindi yemlerine 1,25, 2,5 ve 3,75 g/kg kurutulmuş *Origanum vulgare* yaprakları ilave etmişlerdir. 42 günlük yaşa kadar yem tüketimi ve yemden yararlanma oranının gruplar arasında benzer olmuş, 43 ila 84 yaş arasında ve genel deneme süresi boyunca yem tüketimi, 3,75 g/kg kurutulmuş *Origanum* yaprağı tüketen grupta doğrusal olarak azalmış ve yemden yararlanmanın diyetteki *Origanum* içeriği ile doğrusal olarak artmış.

(Chaudhry ve diğ., 2007) tarafından *Origanum vulgare* uçucu yağının, 11 farklı gram negatif bakteri türü; (*Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter* sp., *Enterobacter aerogenese*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium* sp., *Klebsiella ozaenae*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*,

S. paratyphi B, *Serratia marcescens* ve *Shigella dysenteriae*) üzerinde antibakteriyel aktivitesine disk difüzyon yöntemi ile bakılmıştır. *Origanum vulgare* uçucu yağının, denemeye alınan bakteriler karşısında antibakteriyel aktivite sağladığı bildirilmiştir. *Origanum vulgare* uçucu yağı 24,0 mm \pm 0,5 inhibisyon ortalaması ile *Citrobacter* türlerine karşı en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

(Dragoeva ve diğ., 2014) Kuzeydoğu Bulgaristan'da laboratuvar koşullarında yetişen *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*'nin toprak üstü kısımlarından yapılan soğuk su ekstraktının *Allium cepa*'nın kök uzama testi kullanarak allelopatik aktivitesini incelemiştir. *Origanum* su ekstraktının (17,5 g/l, 52,5 g/l) *Triticum aestivum* L. kök gelişimini önemli ölçüde azaltmış olduğunu belirlemiştir. Test edilen bitkide kök gelişiminin azaltılması, suda çözünen allelopatik sekonder metabolitlerin mevcut olduğunu belirler. *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* su ekstraktı (3,5 g/l) *Allium cepa*'nın kök meristematik hücrelerinin bölümlerini inhibe etmiş. Ayrıca mitotik ve interfaz hücrelerde anormalliklere neden olduğundan genotoksik olarak da düşünülebilir. *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*'nin yabancı ot kontrolünde kullanılmasının mümkün olabileceğini savunmuşlardır.

(Babacan ve diğ., 2012) *Origanum* esansiyel yağında bulunan fenollerin antimikrobiyal etkilerinin bakteri hücre duvarında ozmotik basıncın değişmesi ve sitoplazmik membran yapısının bozulması ile birlikte ATP sentezinin durmasına bağlı olduğunu bildirmişlerdir. *Origanum* ekstraktının *Salmonella* serotipleri üzerine antibakteriyel etkili olduğu belirlemiştir.

1.4.5.3. Kitosan kullanarak *Origanum vulgare* üzerinde yapılan bazı çalışmalar

Manihot esculenta'dan elde edilen manyok nişastası, bolluğu, düşük maliyeti ve parçalanabilirliği nedeniyle, biyolojik olarak parçalanabilir filmlerin üretimindeki kullanımı geniş bir şekilde araştırılmıştır. Ancak, manyok nişastasının teknolojik uygulamaları normalde mekanik ve bariyer özelliklerinin geliştirilmesini gerektirir; çünkü bu filmler suda çözünebilir, kırılabilir ve işlenmesi zordur. Kitosanın manyok nişastası ile kombinasyonu film bariyer özelliklerini arttırmak için kullanılmıştır. Kitosan, mükemmel bir oksijen bariyeri olup, nişastadan daha hidrofobiktir ve bu, su buharı daha az geçirgen filmlerin oluşumunu kolaylaştırabilir (Pelissari ve diğ., 2009).

(Pelissari ve diğ., 2009) Oregano esansiyel yağı içeren nişasta-kitosan filmlerinin fiziko-kimyasal ve antimikrobiyal özellikleri araştırmışlardır. Nişasta-kitosan-oregano esansiyel yağ filmlerinin *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobik etkileri disk engelleme bölgesi yöntemi ile belirlenmiştir. Oregano esansiyel yağı ile eklenen filmler, test edilen dört mikroorganizmayı etkili bir şekilde inhibe etmiş ve daha iyi bariyer özellikleri göstermiştir. Nişasta-kitosan filmlerinde oregano esansiyel yağı bulunması, daha esnek filmlerin oluşumunu sağlamıştır.

(Dos Santos ve diğ., 2012) yaptıkları çalışmada, laboratuvar ortamında kitosan ve *Origanum vulgare* uçucu yağının kombine uygulanmasında, üzümde *Rhizopus stolonifer* ve *Aspergillus niger*'in inhibisyondaki etkinliğini ve meyvelerin depolamadaki fiziksel, fizikokimyasal ve duyuşsal özelliklerine olan etkisini değerlendirmişlerdir. Farklı kitosan ve *Origanum vulgare* esansiyel yağ karışımlarının minimum inhibisyon konsantrasyonunda uygulanması, test edilen mantarlarının misel büyümesini engellediği tespit edilmiştir. Kitosan ve *Origanum vulgare* uçucu yağı alt-inhibitör konsantrasyonlarda uygulanması mantar sporların çimlenmesini engellemiş ve mantar sporlarında ve miselyumda morfolojik değişikliklere neden olmuş, ayrıca yapay olarak enfekte olan üzümdeki test edilen mantar soylarının ve yanı sıra hem oda hem de soğuk sıcaklıkta depolanan üzümdeki otokton mikofloranın büyümesini engellemiştir. Genel olarak, kitosan ve *Origanum vulgare* uçucu yağı içeren bir kaplamanın uygulanması, fiziksel ve fizikokimyasal özellikleriyle ölçülen üzüm kalitesini korumuştur. Bu sonuçlar, meyvelerdeki hasat sonrası patojenik fungusları, özellikle üzümdeki *R. stolonifer* ve *A. niger*'i kontrol etmek için, kitosan ve *Origanum vulgare* uçucu yağının kombinasyonunun önemli bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

(Paparella ve diğ. 2016) yaptıkları çalışmada, domuz filetosu üç *Listeria monocytogenes* soyu ile inoküle edilmiş, sonra % 2 ve 4 oranında *Origanum vulgare* esansiyel yağda veya tek başına % 1 kitosanda veya kitosan ile % 2 ve 4 oranında *Origanum vulgare* esansiyel yağa batırılmıştır. Daha sonra modifiye atmosfer altında paketlenmiştir. Kitosan ve % 4 *Origanum vulgare* esansiyel yağı olan örneklerde *L. monocytogenes* büyümesi 15 gün engellenmiştir. *Origanum vulgare* uçucu yağı kitosan ile kombine edildiğinde, yaşayan bozucu bakterilerin özellikle *Pseudomonas*

ve *Brochothrix thermosphacta*'nın toplam sayısı zaman içinde azalmıştır. Kontrol örneğine göre kitosan ve *Origanum vulgare* uçucu yağı etin lipid oksidasyonunu azaltarak onun raf ömrü uzatmıştır. Kitosan ile muamele edilmiş domuz eti, kontrol örneğine göre tadı etkilenmemiş, oysa *Origanum vulgare* esansiyel yağı, acı bir tat vermiş ve kitosan, *Origanum vulgare* esansiyel yağının acı tadını hafifletmiştir. *Origanum vulgare* esansiyel yağı ile kombine edilen kitosan, *L. monocytogenes* büyümesinin kontrolü, renk stabilitesi ve oksidasyondan koruyucu etkisinde potansiyel etki göstermiştir.

(Li ve diğ., 2016) güvenli doğal gıda koruyucuları, on yıllardır gıda ürünlerinin güvenliğini artırmak için gıda endüstrisinde bir öncelik haline gelmiştir. Li ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada, *O. vulgare* esansiyel yağı ile birlikte allisin ve kitosanın antimikrobiyal aktivitesi ve bunların 4,5 °C depolamasındaki levrek (*Lateolabrax japonicas*) filetolarının özellikleri üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Dört farklı muamele uygulanmıştır; kaplamasız kontrol, kitosan kaplama, kitosan-*O. vulgare* yağı (% 0,5) kaplama ve kitosan-alisin (% 0,2) kaplama. Mikrobiyolojik, fizikokimyasal, lipid oksidatif ve protein özellikleri periyodik olarak 20 gün boyunca değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçları, kitosan-*O. vulgare* yağ kaplaması ve kitosan-alikin kaplamanın, mikroorganizma sayılarını azaltabileceğini, toplam uçucu bazik azot, peroksit değerinin artmasını engelleyebileceğini ve protein ayrışmasını azaltabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada, kitosan-*O. vulgare* yağ kaplaması ve kitosan-alisin kaplaması gıda işleme ve muhafazasında faydalı olabileceği gösterilmektedir.

(Kamel ve diğ., 2017) yaptıkları çalışmada, kitosan nutrasötik (gıda takviyesi) maddeleri kapsüllemek, opsonizasyonu en aza indirmek ve pasif hedeflemeyi kolaylaştırmak için lipid esaslı nano-taşıyıcıları kaplamak için kullanılmıştır. Tarçın (*Cinnamomum spp.*) ve *Origanum* ekstraktları (Sinamaldehit ve rosmarinik asit) katı lipid nanopartiküllerinde (çekirdek) ve kitosan (kabuk) kapsülленerek kullanılmıştır. Bu çalışma, kapsüllenmemiş / kapsülленmiş tarçın ve *Origanum* ekstraktlarının HCT-116 hücrelerinde sitotoksik aktivitesinin değerlendirilmesine odaklanmıştır. Sonuç olarak, kitosan nutrasötik maddeleri insan kolon kanserinin tedavisinde ve yan etkilerin azalmasında düşük dozda tarçın ve *Origanum* özütlerinin başarısını doğrulanmıştır.

1.5. Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi

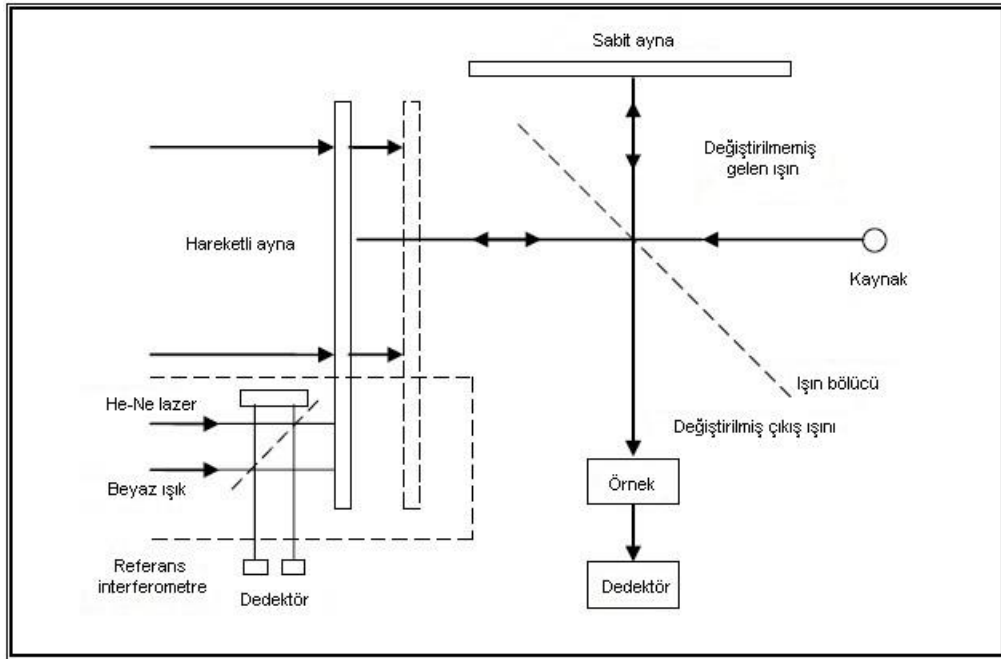
Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi biyolojik örneklerin biyokimyasal analizinin yapılmasını sağlayan bir tekniktir. Kızılötesi spektroskopisi, moleküllerin fonksiyonel gruplarının titreşimleri temelinde örneklerin kimyasal bileşimini tanımlar. Belirli moleküllerin titreşimleri, kızılötesi tayfin bilinen ve tanımlanmış bir aralığında meydana geldiğinden FT-IR spektroskopisinden elde edilen bir FT-IR spektrumundaki piklerin karakteristik frekanslarının tanımlanması, incelenen örneğin biyokimyasal analizinin yapılmasına olanak sağlar (Baker ve diğ., 2014; Türker 2009).

FT-IR spektroskopisinin çok sayıda avantajları bulunmaktadır. Örneğin, FT-IR metodu hızlı ve duyarlı bir tekniktir. Kızılötesi ışını örnek tarafından belirli bir enerji limitine ve proba ihtiyaç olmadan direkt olarak tamamen absorblanır. Kızılötesi spektroskopisinde, biomoleküllerin fonksiyonel gruplarından kaynaklanan titreşimler, incelenen moleküllerin çeşitli bölgelerinden gözlenebildiği için bu verilerden yapısal ve fonksiyonel bilgi elde edilebilir. Ayrıca piklerin absorbans değerleri de ilgili molekülün miktar ya da konsantrasyon açısından değerlendirilmesine de imkân sağlar. Tüm bu parametreler uygun cihaz eklenmeleriyle, örneğin sıcaklık ayarlı, değişik çevresel koşullarının ve uygulamaların biyomoleküller üzerine etkileri incelenebilir (Altunayar, 2012; Şahin, 2009).

FT-IR spektrometresinin ana avantajı, sinyal ortalama oranına göre sinyal-gürültü oranını arttırmaktır. Ayrıca, FTIR spektroskopisinde, dedektöre gelen tüm dalga boylarını aynı anda incelemek mümkündür. Bu tekniğin diğer avantajı, hızı ve duyarlılığıdır. Ayrıca, birkaç mikrogram kadar düşük örnek miktarlarından yüksek kaliteli kızılötesi spektrumları verebilir. Buna ek olarak, örnekler katı maddeler, sıvılar ve gazlar gibi çeşitli fiziksel durumlarda incelenebilir. (Türker, 2009; Baker ve diğ., 2014).

FT-IR spektrometresinin temeli Michelson interferometresine dayanır. İlk olarak bir ışık kaynağı ilgi alanı boyunca ışık üretir, ondan sonra bir Michelson Interferometre ışık radyasyonunu farklı dalga boylarına ayırır. Işık, bir fiber optik kablodan, dar bir açıklık olan bir giriş yarığında spektrometreye yönlendirilir. Bu yarık örnek

boyunca parıldayan dalga boylarını toplar, çift ışın işleminde, bir ışın bölücü, gelen ışını ikiye ayırır; yarısı numuneye ve yarısı referansa gider. Örnek, ışığını kimyasal özelliklerine göre absorbe eder. Bir dedektör, örnekten geçen radyasyonu toplar, çift ışınlı çalışmasında, enerjisini referanstan geçen enerjiyle karşılaştırır. Dedektör, doğrudan bir analog kaydediciye gönderilen bir elektrik sinyali verir. Monokrometre ile kayıt cihazı arasındaki bağlantı, kaydedicinin nasıl ayarlandığına bağlı olarak, frekansı veya dalga boyunun bir fonksiyonu olarak enerjiyi kaydetmeyi sağlar. Bir lazer ışını, cihaz çalışması için bir referans sağlamak üzere eklenir. Hareketli bir ayna, bir kızılötesi bantın doğru pozisyonu belirlenmesini sağlar. Bu pozisyonu tam olarak belirlemek için, bir helyum-neon lazer ışını kaynağının ışına dahil edilir. Bu lazer ışını, ardışık taramaları doğru şekilde sıralayabilen standart saçaklar üretir ve hareketli aynanın konumunu her zaman belirleyebilir. FT-IR spektrometresinin çalışma prensibi Şekil 1.11’de gösterilmektedir (Türker, 2009; Lindon ve diğ., 2000).



Şekil 1.11. FTIR spektrometresinin çalışma prensibi (Türker, 2009)

Bu çalışmada, *Origanum vulgare* bitkisi kinetin, BAP ve kitosan ile muamele edildikten sonra, bitki örnekleri arasında kimyasal bileşimdeki özellikle esansiyel yağ bileşiminde herhangi bir farklılığın olup olmadığını belirlemek için FT-IR spektroskopisi kullanıldı.

2. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmanın deneyleri, Kocaeli Üniversitesi, Biyoloji Bölümünün Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deneylerde kullanılan kitosan stok çözeltisi Münster Üniversitesi (Almanya) Bitki Biyolojisi ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde üretilmiş ve bu çalışmada kullanılmak üzere Dr. Arda Acemi'den temin edilmiştir.

2.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

- Hassas terazi
- pH metre
- Otoklav
- Laminar hava akışlı kabin
- Isıtıcı manyetik karıştırıcı
- Vorteks
- Alev kaynağı
- Mikrodalga fırın
- Bitki büyütme kabini
- Buzdolabı
- Distile su cihazı
- Santrifüj
- Hidrolik pres cihazı (Camilla 95)
- FT-IR spektroskopisi cihazı
- Bilgisayar

2.2. Deneylerde Kullanılan Diğer Ekipmanlar

- Farklı boyutlarda otoklav şişeleri, kuvarz erlenler, beherler, kapsüller, vb.
- Farklı boyutlarda tüp ve tüp sporu
- Bitki doku kültürü Magenta ve Petri kapları
- Mikropipet ve pipet uçları

- Eldivenler
- Parafilm
- Filtre kağıtları
- Havan
- Pisetler
- Alüminyum folyo
- Buzdolabı poşetleri
- Pens, bistüri, makas, cetvel, spatula
- Kesme tablası
- Püskürtücü

2.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

- Murashige & Skoog Besiyeri (MS vitaminli)
- 6-benzilaminopürin
- Kinetin
- Kitosan
- Sükroz
- Tween 20
- Sodyum hidroksit
- Hidroklorik asit
- Etanol
- Aseton
- Sodyum hipoklorit
- Potasyum bromür
- Distile su
- Agar

2.4. Besi Ortamlarının Hazırlanması

Murashige ve Skoog'un (MS) (1962) bazal ortamı, *Origanum*'un doku kültürlerinin başlatılması için hemen hemen seçkin bir şekilde kullanılmıştır. Ortam, agar (% 0,8) veya gellan-gum (% 0,3) gibi çeşitli jelleştirici maddeler ile katılaştırılır ve sükroz (% 2-3) ilave edilir.

Bu çalışmada, MS vitaminleri içeren MS besi ortamı % 3 süzkroz ve farklı kombinasyon ve konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyiciler ile desteklendi, %0,8 agar ile katılaştırıldı, pH $5,7 \pm 1$ 'e ayarlandı.

Bir litre besi ortamı hazırlamak için, ilk olarak, MS tozunun oksidiyonunu önlemek için otoklav şişesi 20 ml distile su ile dolduruldu, daha sonra hassas terazi kullanılarak 4,4 g MS besi ortamı tartıldı. Tartılan MS tuzları beklemeden içerisinde distile su bulunan şişeye aktarıldı, manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırıldı. MS tuzu çözüldükten sonra hassas teraziyi kullanarak 30 g süzkroz tartıldı ve karıştırılmakta olan şişeye aktarıldı. Oluşan hacim distile su ile bir litreye kadar tamamlandı (her 3g süzkroz toplam hacmi 2,5 ml artırdığından dolayı, bir litre besi ortamı hazırlamak için 975 ml distile su eklendi). 0,5 N HCL ve 0,5 N NaOH kullanarak çözeltinin pH'ı $5,7 \pm 1$ 'e ayarlandı. Son olarak ortamın katılaşmasını sağlamak için çözeltiye 8 g agar eklendi.

Kinetin veya BAP içeren besi ortamın hazırlanması için aynı işlem takip edildi ancak pH'ı ayarlamadan önce çözeltiye kinetin veya BAP ilave edildi. Deneylerde kullanılan Kinetin ve BAP'ın stok çözeltileri, her biri 1 mg/L'lik bir konsantrasyona sahipti (1 mg/L kinetinveya 1 mg/L BAP içeren 1 L besi ortamı hazırlamak için kinetin veya BAP'ın stok çözeltilerinden 1 mL çözeltiye eklendi).

Kitosan içeren besi ortamın hazırlanması ise, hemen hemen aynı işleme sahipti fakat kitosan yapı olarak ısıdan etkilenebilecek bir polisakkarit olduğu için, otoklavlama yerine steril kabin içerisinde filtre sterilizasyonuna tabi tutuldu. Soğutulduğunda fakat katı değilken otoklavlanmış MS besi ortamına ilave edildi. Kullanılan kitosan çözeltisi, 1 mg/L'lik bir konsantrasyona ve 1 kDa'lık bir atomik kütleyle sahipti.

2.4.1. Besi ortamlarının sterilizasyonu ve kültür kaplarına aktarımı

Gevşek bir şekilde kapatılmış olan ve besi ortamı içeren şişeler 30 dakika boyunca $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, $1,2\text{ kg / cm}^2$ basınç altında otoklavda sterilize edildi. Otoklav süreleri hazırlanan besi ortamlarının hacimlerine göre ayarlandı (Tablo 2.1).

Besi ortamı içeren şişelerle birlikte, buzdolabı poşetlerinin içinde konulan Magenta kapları otoklavda sterilize edildi. Laminar hava akışlı kabin içerisinde steril Magenta

kaplarının bulunduğu buzdolabı poşetleri ve steril besi ortamı içeren şişeler üzerlerine % 70 Etanol püskürtülerek sterilize edildi. Otoklavda sterilize edilen besi ortamlarının yaklaşık 40 °C'ye kadar soğumaları beklendi. Soğuyan besi ortamları köpürmeyecek şekilde, Magenta kaplarına her bir kapta 50 ml olacak şekilde aktarıldı ve kapların kapakları hemen kapandı. Magenta kaplarına dökülen besi ortamları katılaştıktan sonra, kapların kapakları parafilm ile sarıldı, her kabın üzerine besi ortamın içindeki madde'nin ismi ve konsantrasyonu yazıldı ve steril bir yerde bırakıldı.

Tablo 2.1. Sıvı hacmine göre otoklav süreleri (Acemi 2011)

Kap cinsi	Sıvı hacmi	Süre (d)
Test tüpleri	5-15 ml	15
500 ml erlen	250-350 ml	20
1 litre erlen	500-750 ml	25
2 litre erlen	1-1,5 litre	30
5 litre erlen	2-3 litre	35

Besi ortamı içeren şişelerle birlikte, buzdolabı poşetlerinin içinde konulan Magenta kapları otoklavda sterilize edildi. Laminar hava akışlı kabin içerisinde steril Magenta kaplarının bulunduğu buzdolabı poşetleri ve steril besi ortamı içeren şişeler üzerlerine % 70 Etanol püskürtülerek dezenfekte edildi. Otoklavda sterilize edilen besi ortamlarının yaklaşık 40 °C'ye kadar soğumaları beklendi. Soğuyan besi ortamları köpürmeyecek şekilde, Magenta kaplarına her bir kapta 50 ml olacak şekilde aktarıldı ve kapların kapakları hemen kapandı. Magenta kaplarına dökülen besi ortamları katılaştıktan sonra, kapların kapakları parafilm ile sarıldı, her kabın üzerine besi ortamın içindeki madde'nin ismi ve konsantrasyonu yazıldı ve steril bir yerde bırakıldı.

2.5. Deneylerde Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu

Deneylerde kullanılan Magenta ve Petri kapları iyice yıkandı ve kurutulduklarında buzdolabı poşetlerine konuldu. Kesme tablasının içinde temiz kurutma kağıtları yerleştirildi ve buzdolabı poşetine konuldu. Makas, bistüri sapı, cetvel ve pens gibi malzemeler alüminyum folyolarla sarıldı. Mikropipet ucu kutusu temiz pipet uçları ile dolduruldu ve buzdolabı poşetine konuldu. Daha sonra bu malzemeler otoklavda

121 °C, 1,2 kg/cm² basınç altında 20 dakika sterilize edildi. İçinde distile su veya besi ortamları bulunan otoklav şişelerinin ağzı gevşek bir şekilde kapatıldı. Şişeler içerdiği sıvı hacmine göre artan sürelerde otoklavda 121 °C, 1,2 kg/cm² basınç altında sterilize edildi (Tablo 2.1). Laminar hava akışlı kabinin iç yüzeyi % 70 etanol ile silindi. Tamamen steril olduğundan emin olmak için kabini kullanmadan önce UV lambası en az 15 dakika boyunca açıldı. Kitosanın yapısı sıcaklıkla bozulabileceği için filtre sterilizasyonuna tabi tutuldu. Steril kabin içinde çalışmaya başlamadan önce eldiven giyildi ve eller % 70 etanol ile sürekli steril edildi.

2.6. Tohumların Sterilizasyonu

Tohumların ekilmesinden önce, *Origanum vulgare* tohumlarının sterilizasyonunu optimize etmek için dört set sterilizasyon çözeltisi test edildi. İlk iki örnekte, tohumlar iki ayrı eppendorf tüpünde birkaç damla etanol ile işlendi, bir vorteks kullanılarak iki dakika karıştırıldı, daha sonra etanol dikkatli bir şekilde atıldı, bir tüpe yaklaşık 1 mL % 0,5'lik NaOCI çözeltisi eklendi ve diğer tüpe 1 mL % 1,0'lik NaOCI çözeltisi eklendi. Diğer iki tüpe aynı işlem, ancak etanol kullanılmadan yapıldı. Tüm tüplere birkaç damla tween 20 eklendi ve hepsi 10 dakika boyunca vorteks ile karıştırıldı. Laminar akışlı kabin içinde eppendorf tüplerinden NaOCI çözeltileri atıldı, tohumlar üç kez steril distile su ile yıkandı ve MS besi ortamına ekildi. Sterilizasyon testi üç kez tekrarlandı.

Yapılan bu deneyde, *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*'nin tohumları % 0,5 NaOCI ve 1-2 damla Tween 20 kullanılarak iyi bir şekilde yüzey sterilize edilebilirken, %70 etanol kullanılması tercih edilmedi. Çünkü ön denemelerde kullanılan % 70'lik alkol muhtemelen bazı tohumların ölmesine neden oldu.

Ticari olarak satılan *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*'nin tohumları Vilmorin Garden, Türkiye'den satın alındı. Tohumlar ekilmeden önce ayrı eppendorf tüplerin içerisine aktarıldı (bir tüpte 30-40 tohum). Her bir eppendorf tüpüne yaklaşık 1 mL % 0,5 NaOCI çözeltisi ve 1-2 damla Tween 20 aktarıldı, daha sonra tüpler 10 dakika boyunca vorteks kullanılarak karıştırıldı. Sterilize edilmiş laminar hava akışlı kabinin içerisinde, NaOCI çözeltisi, eppendorf tüplerinden dikkatli bir şekilde atıldı. İçerisinde tohumlar bulunan eppendorf tüplerine steril distile su aktarıldı, suyun içinde tohumları karıştırarak tohumlar yıkandı, su dikkatli bir şekilde eppendorf

tüplerinden atıldı, bu işlem üç kez tekrarlandı. Tohumlar yıkandıktan sonra sterilize edildi ve ekilmeye hazırlandı.

Denemelerin amacıyla, bazı eppendorf tüplerinin içerisine % 0,5 NaOCI ve Tween 20 ile birlikte % 70 etanol eklendi, fakat bu çözelti ile sterilize edilen tohumların çoğu çimlenmedi. Bunun için tohumların sterilizasyonunda % 70 etanol kullanılması tercih edilmedi.

2.7. Tohumların Ekimi ve İnkübasyonu

Steril laminar hava akışlı kabin içinde sterilize edilmiş *Origanum vulgare*'nin tohumları, içerisinde besiy ortamları bulunan kültür kaplarında ekildi (her kaptaki 10 tohum). *Origanum vulgare*'nin tohumları çok küçük olduğu için, onları ekme için steril binlik mikro pipet kullanıldı, pipetin ucu sürekli değiştirildi. Tohumları ektikten sonra, içerisinde ekilen tohumlar bulunan Magenta ya da Petri kaplarının kapakları parafilm ile sarıldı, her kabin üzerindeki daha önce yazılan besiy ortamının içindeki BBD'nin ismi ve konsantrasyonu ile birlikte tohumlar ekim tarihi de yazıldı. Sanyo MCR-351 H model bitki büyütme kabini içinde 23 ° C'de, aydınlatılmış ve steril koşullar altında 15 gün inkübasyona bırakıldı.

Tohumlar dört farklı besiy ortamında ekildi; örnek olarak kinetin, BAP ve kitosan ile desteklenen besiy ortamları ve kinetin ve BAP veya kitosan içermeyen MS besiy ortamı kontrol olarak kullanıldı. Besiy ortamlarda kinetin, BAP ve kitosanın dört farklı konsantrasyonu (0,5, 1, 2 ve 4 mg/L) kullanıldı. Belirtilen ortamlarda her konsantrasyonda üç tekrar (10 tohum / tekrar) uygulandı. İnkübasyon süresinde tohumların çimlenmesi gözlemlendi ve çimlenen tohumların sayısı 15 gün boyunca günlük olarak sayıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, denenen her besiy ortamındaki çimlenen tohumların sayıları karşılaştırıldı. Her üç tekrarın ortalama ve sapmaları hesaplandı. En iyi ve en fazla tohum çimlenen besiy ortamları seçildi. Bu besiy ortamları tohum çimlenmesinin sağlanması amacıyla sürekli kullanıldı.

2.8. Eksplantların Yeni Besiy Ortamlarına Aktarılması ve Çoğaltımı

Tohumları ektikten 15 gün sonra, çimlenen tohumlar (fideler), eksplant olarak kullanılarak steril laminar hava akışlı kabin içerisinde ve steril koşullar altında yeni

ortamlara (kinetin, BAP ve kitosan ile desteklen besli ortamları ve kontrol için BBD veya kitosan içermeyen MS besli ortamı) aktarıldı. Fideleri yeni besli ortamlarına aktarmak için steril pens kullanıldı. Her fideyi aktarmadan önce pens alkol içine daldırıldı ve daha sonra bir alev kaynağı kullanarak sterilize edildi. Pensi soğutmak için besli ortamın boş bir yerine konuldu ondan sonra fide yeni ortama aktarıldı. Her kültür kabına 5 adet fide dikey şekilde yerleştirildi. Aktarılan fideler, *in vitro* çoğaltım başlangıcı için 23 ° C'de tekrar inkübe edildi.

In vitro çoğaltım için, besli ortamlarında, yine kn, BAP ve kitosanın dört farklı konsantrasyonu kullanıldı; Kinetin ve BAP için (0,5, 1, 2 ve 4 mg/L), kitosan için (0,25, 0,50, 0,75 ve 1 mg/L), ve kontrol için sadece MS besli ortamı kullanıldı. Belirtilen ortamlarda her konsantrasyonda üç tekrar (10 fide / tekrar) uygulandı. Toplam 78 Magenta kabının içine 390 fide aktarıldı. *In vitro* çoğaltım süresi 30 gün olarak belirlendi. Çoğaltım sırasında, bitkilerin büyümesi düzenli olarak gözlemlendi. Bir ay sonra, her bitkinin sürgünlerinin sayısı ve uzunlukları, yaprakların sayısı ve köklerin sayısı ve uzunlukları ölçüldü ve tüm veriler istatistiksel analizler için not edildi.

Ölçümler aldıktan sonra bitkiler, daha fazla kültür ve çoğaltım için ve sonraki deneysel amaçlar için yeni besli ortamlarına aktarıldı. Steril şartlar altında, kesme tablasında bitkilerin köklerini kestikten sonra, sürgünleri kesilip yeni besli ortamlarına köklendirilmek üzere kültüre alındı. Her bir kültür kabına 5 adet nod içeren eşit boyda sürgün parçası dikey şekilde yerleştirildi. Çoğaltım süresi yine 30 gün olarak belirlendi.

2.8.1. Sürgün, yaprak ve kök sayılarının belirlenmesi

Çoğaltım süresi bittikten sonra, kültür kapları üzerlerine % 70 etanol püskürtüldü. Bitkiler, steril kabin içerisinde kültür kaplarından steril pens ile çıkartılarak steril kesme tablasına yerleştirildi, her bitkide, sürgün ve kök sayıları belirlendi. Her sürgünde kaç yaprak oluştuğu da belirlendi ve tüm ölçümler kaydedildi.

2.8.2. Sürgün ve kök uzunluklarının ölçümü

Sürgün, kök ve yaprak sayılarını belirledikten sonra, köklerin etrafında kalan besi ortamı kalıntıları distile su ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Sürgünlerin ve köklerin boylarının ölçümleri steril metal cetvel kullanarak yapıldı, tüm ölçümler kaydedildi. Ölçümleri tamamlanan sürgünler noddan kesilip yeni besi ortamlarına kültüre alındı. Her bir kültür kabına nod içeren eşit boyda sürgün parçaları dikey şekilde yerleştirildi.

2.9. FT-IR Spektroskopisi İçin Örneklerin Hazırlanması

Kültür kaplarında çoğaltılmış bitkilerden birkaç tanesi alındı, ve bu işlem her tekrar için gerçekleştirildi. Köklerin etrafında kalan besi ortamı kalıntıları distile su ile temizlendi. Yapraklar, sürgünler ve kökler ayrıldı ve kurumaya bırakıldı. Örnekler kurutulduktan sonra, her örnek havan içinde ayrı olarak ezildi ve toz haline getirildi (Şekil 2.1). Toz halinde olan örnekler ayrı eppendorf tüplerine aktarıldı. Kitosan, kinetin veya BAP ile muamele edilmeyen bitkiler kontrol örnek olarak kullanıldı. Her örnekten üç tekrar yapıldı. Toz halinde olan örneklerin her birinden 1'er mg tartıldı, havan içinde 150 mg Sigma-Aldrich, ABD'den satın alınan potasyum bromür (KBr) ile ezildi ve eppendorf tüplere aktarıldı (Şekil 2.2). KBr'in kızılötesi bölgesinde soğrulması olmadığı için kullanılması uygundur. Kullanılan KBr nem tutucu özelliğinden dolayı içerdiği nem kızılötesi spektrumunda analiz edilecek bantların kapatmasına neden olur. Bundan dolayı FT-IR çekimleri yapmadan önce tüm örnekler bir dondurarak kurutucu makinesinde (freeze dryer) bir gün boyunca iyice kurutuldu.



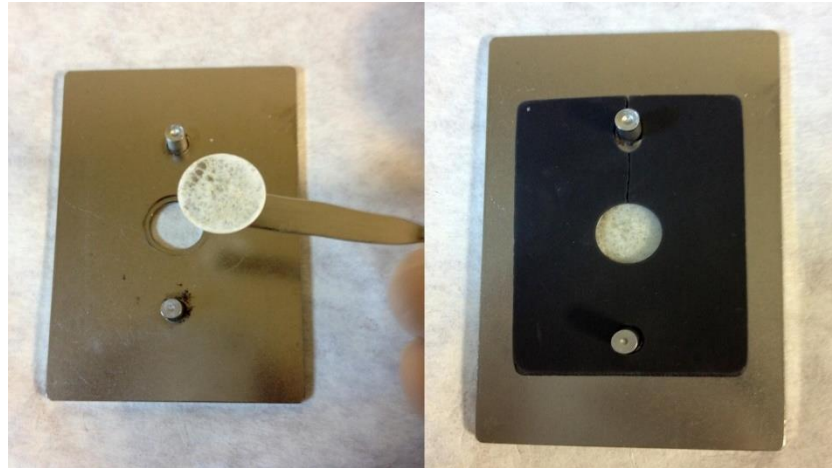
Şekil 2.1. FT-IR spektroskopisi için kurutulmuş bitki katı örneklerin hazırlanması sırasında havan içinde toz haline getirilmesi



Şekil 2.2. FT-IR spektroskopisi için toz haline getirilen bitki katı örneklerin havan içinde potasyum bromür (KBr) ile karıştırılması

2.9.1. KBr peletlerinin hazırlanması ve FT-IR spektrumlarının elde edilmesi

Kurutulmuş FT-IR örnekleri hidrolik pres aleti kullanılarak 1300 kg/cm^2 basınçla sıkıştırılıp ince şeffaf pelet haline getirildi (Şekil 2.3) ve disk tutucuya aktarıldı (Şekil 2.3). Tüm örneklerin FT-IR spektrumları 4 cm^{-1} rezolüsyonda ve $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında kaydedildi. FT-IR spektroskopisinin analizi için, Sigma-Aldrich, ABD'den satın alınan bazı *Origanum vulgare*'nin esansiyel yağ bileşenlerin (karvakrol, timol ve γ -terpinene) FT-IR spektrumları kontrol olarak kullanıldı.



Şekil 2.3. FT-IR katı örnekleri ince bir disk haline getirildikten sonra bir disk tutucuya aktarılması ve yerleştirilmesi

2.10. Nicel, Nitel ve İstatistiksel Yöntemler

Nicel yöntem, tohumları ektikten sonraki 15 gün boyunca her örnekte çimlenen tohumların sayısının belirlenmesi ve çoğaltım süresi bittikten sonra her bitkinin sürgün, yaprak ve kök sayılarının belirlenmesi ve tüm sürgünlerin ve köklerin uzunluklarının ölçülmesine dayanmaktadır. Nitel yöntem, tohumların çimlenmesi ve eksplantların büyümesi üzerine yapılan gözlemler ile gerçekleştirildi. Elde edilen her sonuçtan sonra ve çalışma boyunca istatistiksel ve analitik yöntemler uygulandı. Yapılan tüm denemeler 3 tekrarlı olarak tasarlandı ve her tekrarda 10 tohum veya 10 eksplant kullanıldı. Elde edilen verilere ANOVA testi uygulanarak ortamlar LSD karşılaştırma testine göre karşılaştırıldı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Tohumların Sterilizasyonunun Optimizasyonu

Tohumların ekilmesinden önce, *Origanum vulgare* tohumlarının sterilizasyonunu optimize etmek için dört set sterilizasyon çözeltisi test edildi. Bu çalışma boyunca *Origanum vulgare* tohumları, ekildikten 5 gün sonra ya da biraz daha sonra çimlenmeye başlıyordu. Bundan dolayı, sterilize edilmiş tohumların çimlenmesi, onları ekledikten sonraki beşinci günde gözlemlendi, çimlenme yüzdesi Tablo 3.1’de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Dört farklı sterilizasyon çözeltisi ile muamele edilen tohumların çimlenme yüzdesi

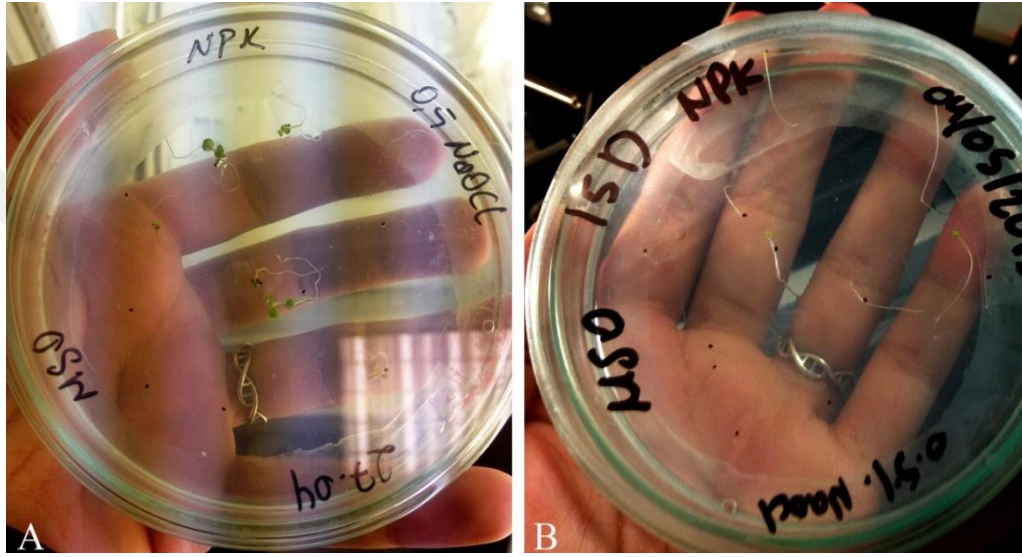
Sterilizasyon Çözeltisi	Çimlenme Yüzdesi
Etanol ve % 0,5 NaOCI	0
Etanol ve % 1,0 NaOCI	0
% 0,5 NaOCI	54,5
% 1,0 NaOCI	44,4

Kullanılan tüm sterilizasyon çözeltileri kontaminasyon oluşmasını engelledi, fakat *Origanum vulgare* tohumlarının optimal çimlenmesi sadece % 0,5 NaOCI sterilizasyon çözeltisi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu sterilizasyon çözeltisi kullanıldığında, tohumların % 54,5’i ekildikten 5 gün sonra çimlendi. Etanol’ün kullanılması tercih edilmedi ve muhtemelen tohumların ölümüne neden oldu, çünkü etanol ile muamele edilmiş tohumların hiçbiri ekildikten 5 gün sonra çimlenmedi.

3.2. Tohumların Çimlenmesi

Daha önce de belirtildiği gibi, bu çalışma boyunca *Origanum vulgare* tohumlarının hep ekildikten beş gün sonra veya biraz daha sonra çimlenmeye başladı, ancak bu süreden önce çimlenmeye başladıkları hiç görülmedi. Bundan dolayı ekildikten sonraki 5. gün çimlenmenin ilk günü olarak kabul edildi.

Ekilen tohumların inkübasyonu sırasında ışık koşullarının optimizasyonu, aydınlatılmış bir inkübatör ve başka aydınlatılmamış bir inkübatör kullanılarak gerçekleştirildi. Her iki inkübatördeki çimlenme yüzdesi hemen hemen aynıydı, bu da ışığın tohumların çimlenme oranını etkilemediğini gösterir ancak karanlıkta inkübe edilen fidelerin ışıklı koşullarda inkübe edilenlerle karşılaştırıldığında, daha yavaş büyüdüğü ve daha az yaprak sayısı ve daha dikey sürgünleri olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. (A) Işıklı ortamda inkübe edilmiş fidelerin görünümü, (B) karanlık ortamda inkübe edilmiş fidelerin görünümü (Karanlık ortamda inkübe edilmiş fidelerin daha az yaprak sayısı ve daha dikey sürgünleri bulunmaktadır)

3.2.1. Farklı kinetin, BAP ve kitosan konsantrasyonlarının tohum çimlenmesi üzerine etkileri

Kitosan ve bitki büyüme düzenleyicileri (kinetin ve BAP), kültürün besi ortamına eklendiler. Her bir muameleden dört farklı konsantrasyonu; (0,5, 1,0, 2,0 ve 4,0 mg/L), tohum çimlenmesi üzerine etkilerini incelemek için kullanıldı. Her konsantrasyonda üç tekrar (10 tohum / tekrar) uygulandı. Kinetin, BAP veya kitosan içermeyen MS besi ortamı, bir kontrol ortamı olarak kullanıldı. Tohum çimlenmesine ait bulgular Tablo 3.2'de gösterilmektedir. Her besi ortamının farklı konsantrasyonlarındaki ortalama çimlenen tohum sayıları belirlendikten sonra, bu ortalamalar Post Hoc testleri uygulanarak, LSD çoklu karşılaştırma testine göre ayrıldı (ortamalar arasındaki fark $P < 0,05$ seviyesinde anlamlıdır).

Tablo 3.2. Kontrol ile karşılaştırılarak, farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamların tohum çimlenmesi üzerine olan etkilerine ait bulgular

Besi Ortamı-konsantrasyon (mg/ L)	Tohum sayısı	Toplam çimlenen tohum sayısı	Ortalama çimlenen tohum sayısı \pm std.s.*	Çimlenme yüzdesi %.**	M.Ö. tohumlar hariç çimlenme yüzdesi***
Kontrol	30	18	6 \pm 0,82	60	60
Kinetin					
Kn 0,5	30	21	7 \pm 0,82	70	70
Kn 1,0	30	21	7 \pm 0,82	70	70
Kn 2,0	30	23	7,67 \pm 1,25	76.67	81.7
Kn 4,0	30	24	8 \pm 0,82	80	80
BAP					
BAP 0,5	30	15	5 \pm 0,82	50	50
BAP 1,0	30	13	4,33 \pm 0,47	43.33	43.33
BAP 2,0	30	15	5 \pm 0,82	50	50
BAP 4,0	30	14	4,67 \pm 0,47	46.67	46.67
Kitosan					
Kit 0,5	30	23	7,67 \pm 2,05	76.67	87.8
Kit 1,0	30	25	8,33 \pm 1,70	83.33	91.9
Kit 2,0	30	24	8 \pm 2,16	80	91.1
Kit 4,0	30	22	7,33 \pm 1,88	73.33	86.9

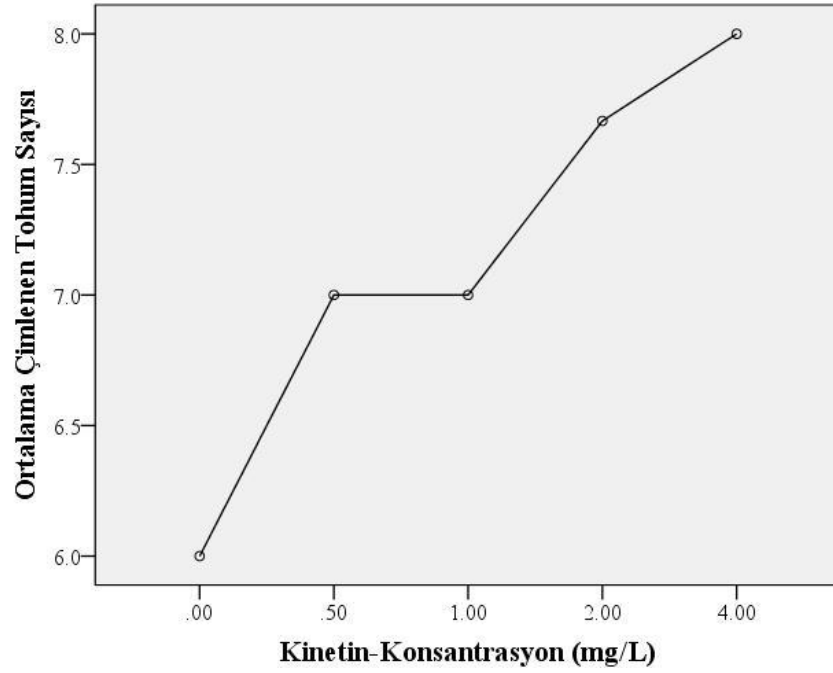
* Üç tekrarın ortalama çimlenen tohum sayısı (Tekrar başına 10 tohum).

** Çimlenen tohum sayısı / toplam tohum sayısı x %100

*** M.Ö: Muhtemelen ölü tohumlar.

3.2.1.1. Farklı kinetin konsantrasyonlarının etkileri

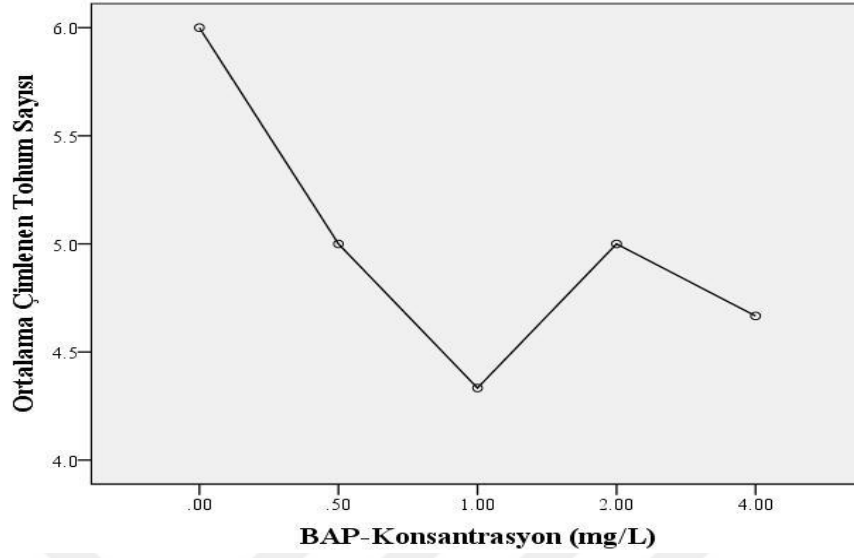
Farklı konsantrasyonlarda kinetin içeren besi ortamlarına ekilen tohumların ortalama çimlenen tohum sayıları azalan sırayla; 4,0 mg/L (8), 2,0 mg/L (7,67), 1,0 ve 0,5 mg/L (7) şeklindedir. Şekil 3.2’de kontrol ile farklı kinetin konsantrasyonlarında ekilen tohumların ortalama çimlenen tohum sayılarının çizgi grafiği gösterilmektedir.



Şekil 3.2. Kontrol ile farklı kinetin konsantrasyonlarında ekilen tohumların ortalama çimlenen tohum sayılarının çizgi grafiği

3.2.1.2. Farklı BAP konsantrasyonlarının etkileri

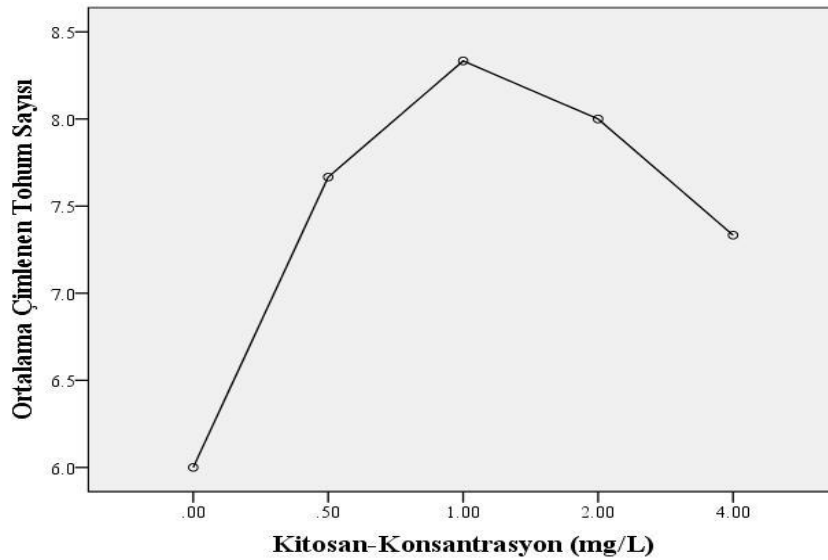
Farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarında ekilen tohumların ortalama çimlenen tohum sayıları azalan sırayla; 0,50 ve 2,0 mg/L (5), 4,0 mg/L (4,67) ve 1,0 mg/L (4,33) şeklindedir. Şekil 3.3’te kontrol ile farklı BAP konsantrasyonlarında ekilen tohumların ortalama çimlenen tohum sayılarının çizgi grafiği gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Kontrol ile farklı BAP konsantrasyonlarında ekilen tohumların ortalama çimlenen tohum sayılarının çizgi grafiği

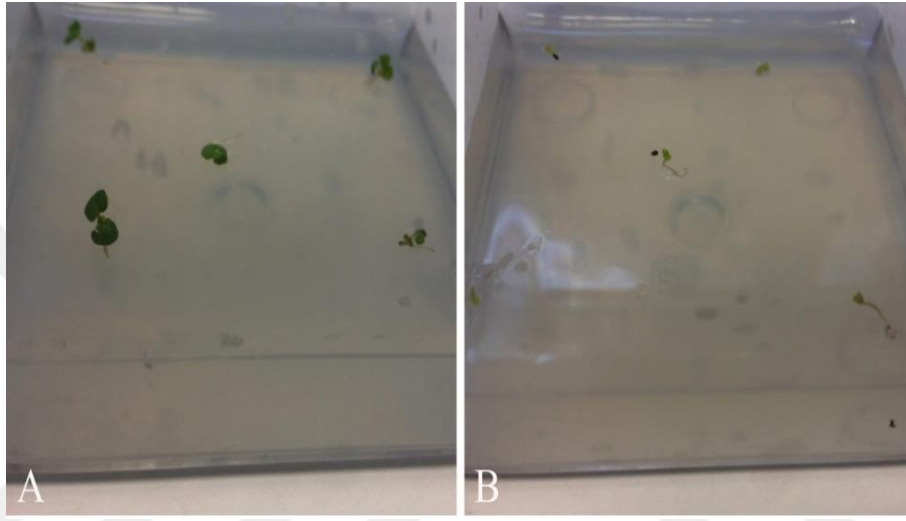
3.2.1.3. Farklı kitosan konsantrasyonlarının etkileri

Farklı konsantrasyonlarda kitosan içeren besi ortamlarında ekilen tohumların ortalama çimlenen tohum sayıları azalan sırayla; 1,0 mg/L (8,33), 2,0 mg/L (8), 0,5 mg/L (7,67) ve 4,0 mg/L (7,33) şeklindedir. Şekil 3.4'te kontrol ile farklı kitosan konsantrasyonlarında ekilen tohumların ortalama çimlenen tohum sayılarının çizgi grafiği gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Kontrol ile farklı kitosan konsantrasyonlarında ekilen tohumların ortalama çimlenen tohum sayılarının çizgi grafiği

Dikkate değer bir nokta ki, 2,0 mg/L ve 4,0 mg/L kitosan örnekleri, tohumların çimlenmesini sağlamasına rağmen, bu iki örnekte büyüyen fidelerin kırılğan ve zayıf gözüktüğü ve soluk kahverengi olduğu gözlemlendi (Şekil 3.5). Ayrıca, 0,5 mg/L ve 1,0 mg/L kitosan örneklerinde büyüyen fidelere kıyasla, onların büyümeleri çok yavaştı ve çoğunun yeni bir kültür ortamına aktarıldıktan sonra ölmeye başladı. Bu yüzden 2,0 mg/L ve 4,0 mg/L kitosan *Origanum vulgare*'nin *in vitro* çoğaltımı için tercih edilmeyen konsantrasyonlar idi.



Şekil 3.5. A: 0,5 mg/L kitosan içeren besi ortamında büyüyen fidelerin görünümü B: 4,0 mg/L kitosan içeren besi ortamında büyüyen fidelerin görünümü

Kültür ortamına kitosan eklemek yerine, *Origanum vulgare* tohumlarının bazıları, 30 dakika boyunca farklı konsantrasyonlarda kitosan çözeltileri içinde inkübe edildi ve daha sonra MS besi ortamında ekildi. Kontrol ile karşılaştırılarak, tohumların kitosan çözeltilerinde inkübasyonunun, tohum çimlenmesi üzerine etkisi görünmedi.

Kitosanın tohum çimlenmesi üzerindeki etkilerinin test edilmesi sırasında, 1kD, 10 kD ve 100 kD kitosan olmak üzere üç farklı molekül kitosan kullanıldı. 1 kD kitosan içeren ortamlarda bulunan tohumlardaki çimlenme yüzdesi, 10 kD ve 100 kD kitosan içeren ortamlardakilere göre daha yüksekti. Bunun için çalışma boyunca 1 kD kitosanın kullanılması tercih edildi.

3.3. Farklı Kinetin, BAP ve Kitosan Konsantrasyonlarının Sürgün Sayıları ve Uzunlukları Üzerine Etkileri

Daha önce bahsedildiği gibi, 2,0 mg/L ve 4,0 mg/L kitosan içeren besi ortamlarında ekilen tohumlar iyi bir şekilde çimlenme verimini göstermesine rağmen, bu iki konsantrasyonda büyüyen fidelerin, 0,5 mg/L ve 1,0 mg/L kitosan içeren ortamlarda da büyüyen fidelere kıyasla, çok kırılmalı ve zayıftı, büyümeleri çok yavaştı ve çoğu yeni bir kültür ortamına aktarıldıktan sonra öldüler. Bu nedenle, *in vitro* çoğaltım sırasında kitosanın kullanıldığı konsantrasyonlar: (0,25, 0,50, 0,75 ve 1,0 mg/L) olarak düşürülürken, kinetin ve BAP'ın konsantrasyonları aynı kaldı (0,5, 1,0, 2,0, 4,0).

Besi ortamlarının farklı konsantrasyonlarında kültüre alınan eksplantların sürgünlerinin, farklı sayılara ve uzunluklara sahip olduğu görüldü. Kontrol ile karşılaştırılarak, farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamların sürgün sayıları ve uzunlukları üzerine olan etkilerine ait bulgular Tablo 3.3'de gösterilmektedir. Her besi ortamının farklı konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün sayıları ve ortalama sürgün uzunlukları belirlendikten sonra, bu ortalamalar Post Hoc testleri uygulanarak, LSD çoklu karşılaştırma testine göre ayrıldı (ortamalar arasındaki fark $P < 0,05$ seviyesinde anlamlıdır).

Tablo 3.3. Kontrol ile karşılaştırılarak, farklı kinetin, BAP ve kitosan konsantrasyonlarının sürgün sayıları ve uzunlukları üzerine olan etkilerine ait bulgular

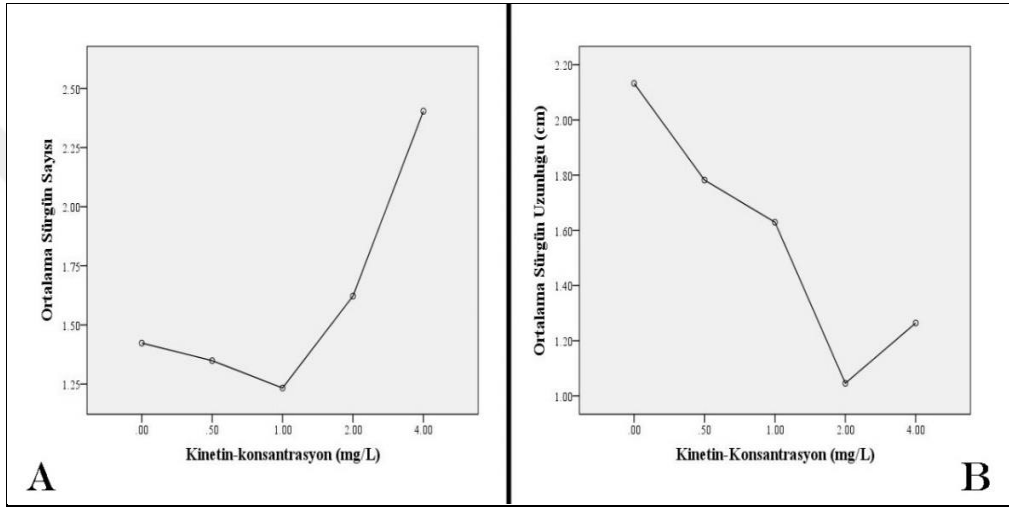
Besi Ortamı-konsantrasyon (mg/ L)	Toplam eksplant sayısı	Hayatta kalan eksplant sayısı	Toplam sürgün sayısı	Ort. Eksplant başına sürgün sayısı \pm std.s*	% Sürgün indüksiyonu**	Ort. Sürgün uzunluğu (cm) \pm std.s
Kontrol	30	27	38	1,42 \pm 0,17	90	2,13 \pm 0,03
Kinetin						
Kn 0,50	30	27	36	1,35 \pm 0,20	90	1,78 \pm 0,29
Kn 1,00	30	30	37	1,23 \pm 0,09	100	1,63 \pm 0,11
Kn 2,00	30	29	47	1,62 \pm 0,09	96.67	1,04 \pm 0,05
Kn 4,00	30	28	67	2,40 \pm 0,23	93.33	1,26 \pm 0,05
BAP						
BAP 0,50	30	25	31	1,24 \pm 0,11	83.33	1,44 \pm 0,06
BAP 1,00	30	25	31	1,24 \pm 0,11	83.33	2,17 \pm 0,17
BAP 2,00	30	23	27	1,18 \pm 0,08	76.67	1,71 \pm 0,03
BAP 4,00	30	26	37	1,43 \pm 0,14	86.67	1,56 \pm 0,10
Kitosan						
Kit 0,25	30	30	32	1,07 \pm 0,05	100	2,34 \pm 0,12
Kit 0,50	30	29	33	1,14 \pm 0,14	96.67	3,8 \pm 0,22
Kit 1,75	30	30	31	1,03 \pm 0,05	100	4,38 \pm 0,17
Kit 1,00	30	25	33	1,32 \pm 0,05	83.33	2,1 \pm 0,08

* Her tekrarda toplam sürgün sayısı/ canlı eksplant sayısı (üç tekrarın ortalaması)

** % Sürgün indüksiyonu= (Canlı eksplantların sayısı / Tüm eksplantların sayısı) x % 100

3.3.1. Farklı kinetin konsantrasyonlarının etkileri

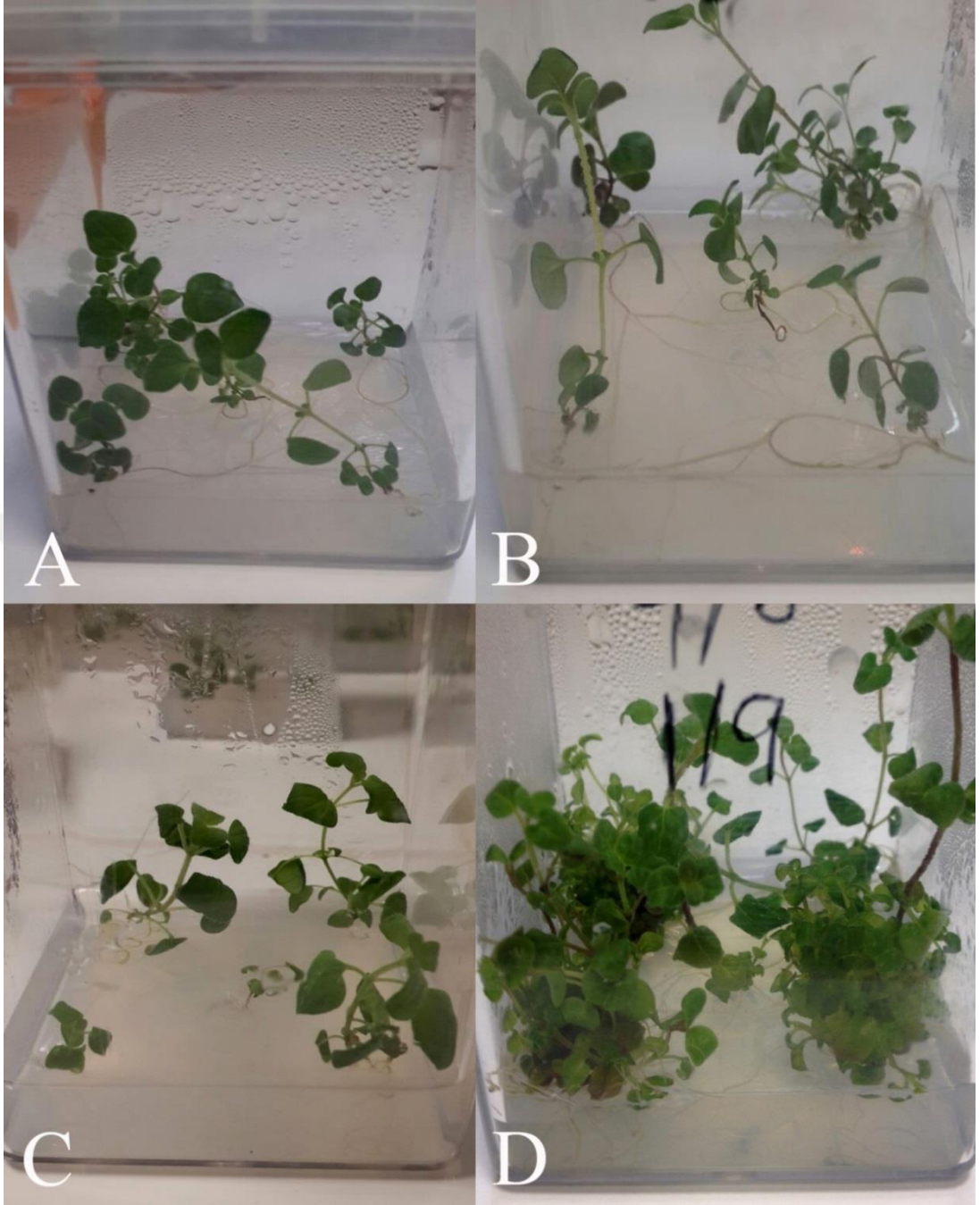
Farklı konsantrasyonlarda kinetin içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek ortalama sürgün sayıları azalan sırayla; 4,0 mg/L (2,40), 2,0 mg/L (1,62), 0,5 mg/L (1,35) ve 1,0 mg/L (1,23) şeklindedir. Şekil 3.6 A'da kontrol ile farklı konsantrasyonlarda kinetin içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün sayılarının çizgi grafiği gösterilmektedir.



Şekil 3.6. Kontrol ile farklı konsantrasyonlarda kinetin içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün sayıları (A) ve uzunluklarının (B) çizgi grafikleri

Farklı konsantrasyonlarda kinetin içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek ortalama sürgün uzunlukları azalan sırayla; 0,5 mg/L (1,78 cm), 1,0 mg/L (1,63 cm), 4,0 mg/L (1,26 cm) ve 2,0 mg/L (1,04 cm) şeklindedir. Şekil 3.6 B'de kontrol ile farklı kinetin konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün uzunluklarının çizgi grafiği gösterilmektedir.

Çoğaltım süresinin sonunda farklı konsantrasyonlarda kinetin içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların genel görünümü Şekil 3.7'de gösterilmektedir.

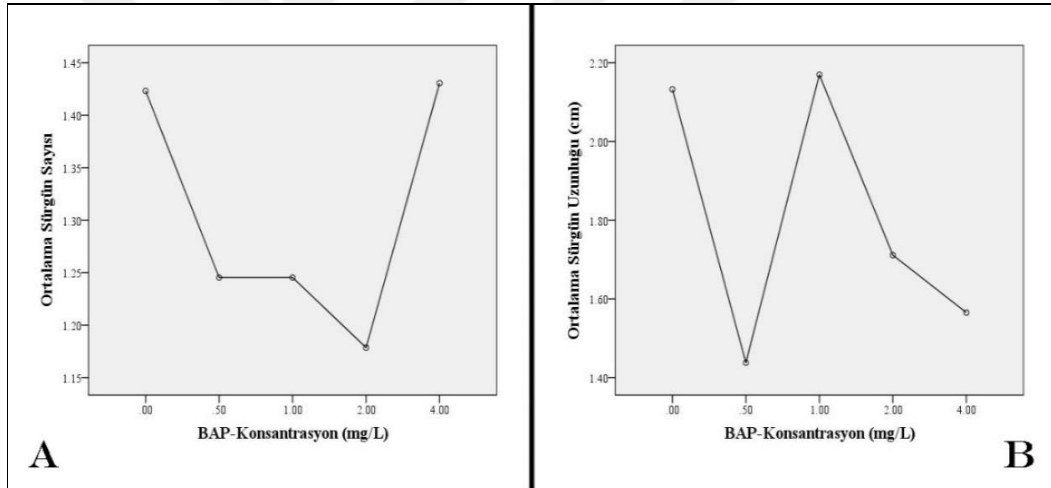


Şekil 3.7. Farklı konsantrasyonlarda kinetin içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların genel görünümü, A: 0,5 mg/L kinetin, B: 1,0 mg/L kinetin, C: 2,0 mg/L kinetin, D: 4,0 mg/L kinetin

3.3.2. Farklı BAP konsantrasyonlarının etkileri

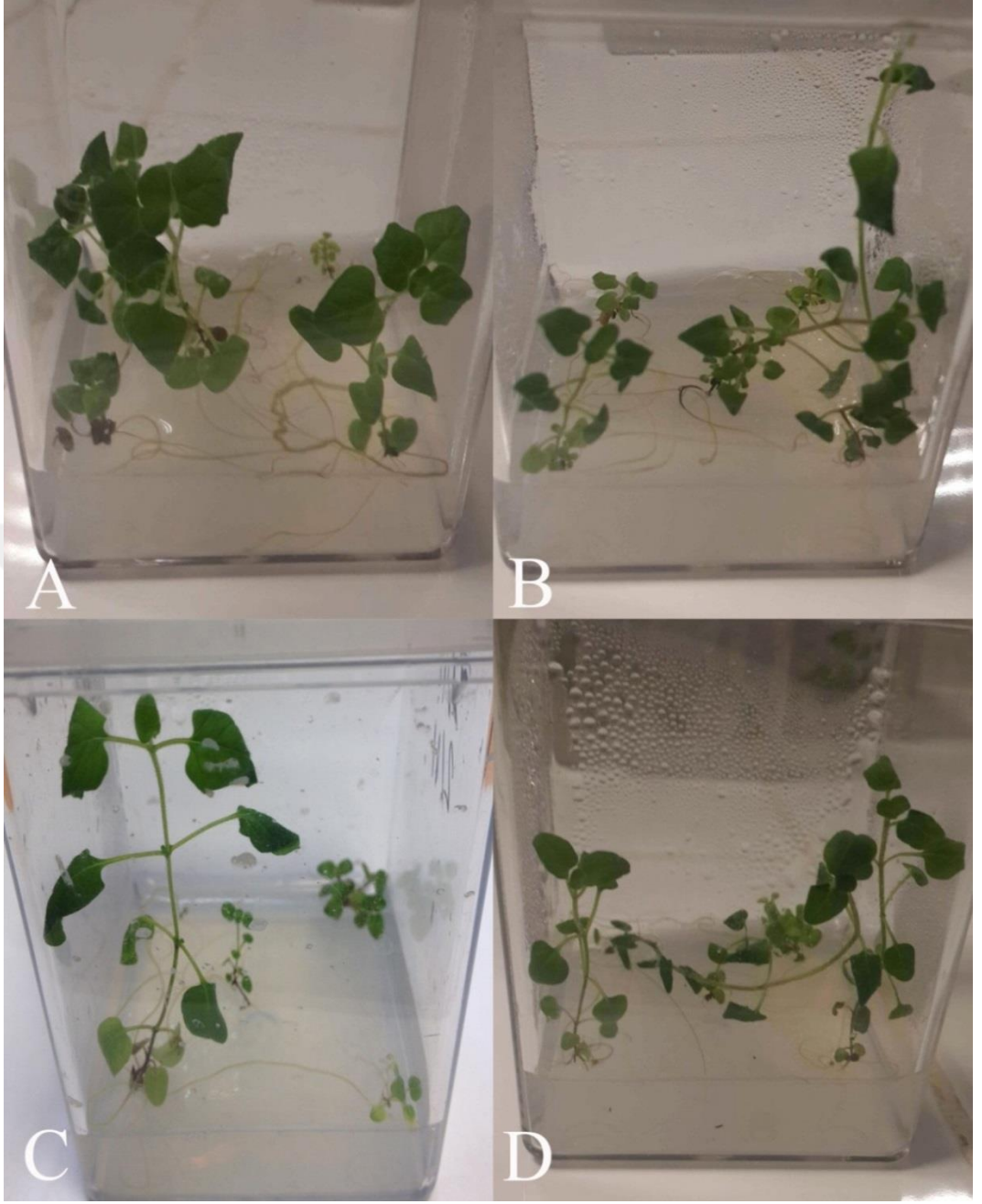
Farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek ortalama sürgün sayıları azalan sırayla; 4,0 mg/L (1,43), 0,5 mg/L ve 1,0 mg/L (1,24) ve 2,0 mg/L (1,18) şeklindedir. Şekil 3.8 A'da kontrol ile farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün sayılarının çizgi grafiği gösterilmektedir.

Farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek ortalama sürgün uzunlukları azalan sırayla; 1,0 mg/L (2,17 cm), 2,0 mg/L (1,71 cm), 4,0 mg/L (1,56 cm) ve 0,5 mg/L (1,44 cm) şeklindedir. Şekil 3.8 B'de kontrol ile farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün uzunluklarının çizgi grafiği gösterilmektedir.



Şekil 3.8. Kontrol ile farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün sayıları (A) ve uzunluklarının (B) çizgi grafikleri

Çoğaltım süresinin sonunda farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların genel görünümü Şekil 3.9'da gösterilmektedir.

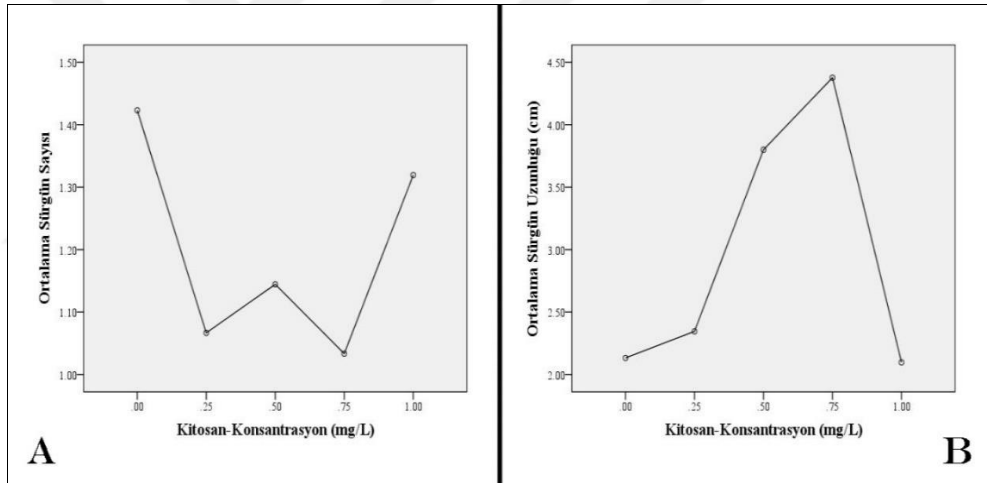


Şekil 3.9. Farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların genel görünümü, A: 0,5 mg/L BAP, B: 1,0 mg/L BAP, C: 2,0 mg/L BAP, D: 4,0 mg/L BAP

3.3.3. Farklı kitosan konsantrasyonlarının etkileri

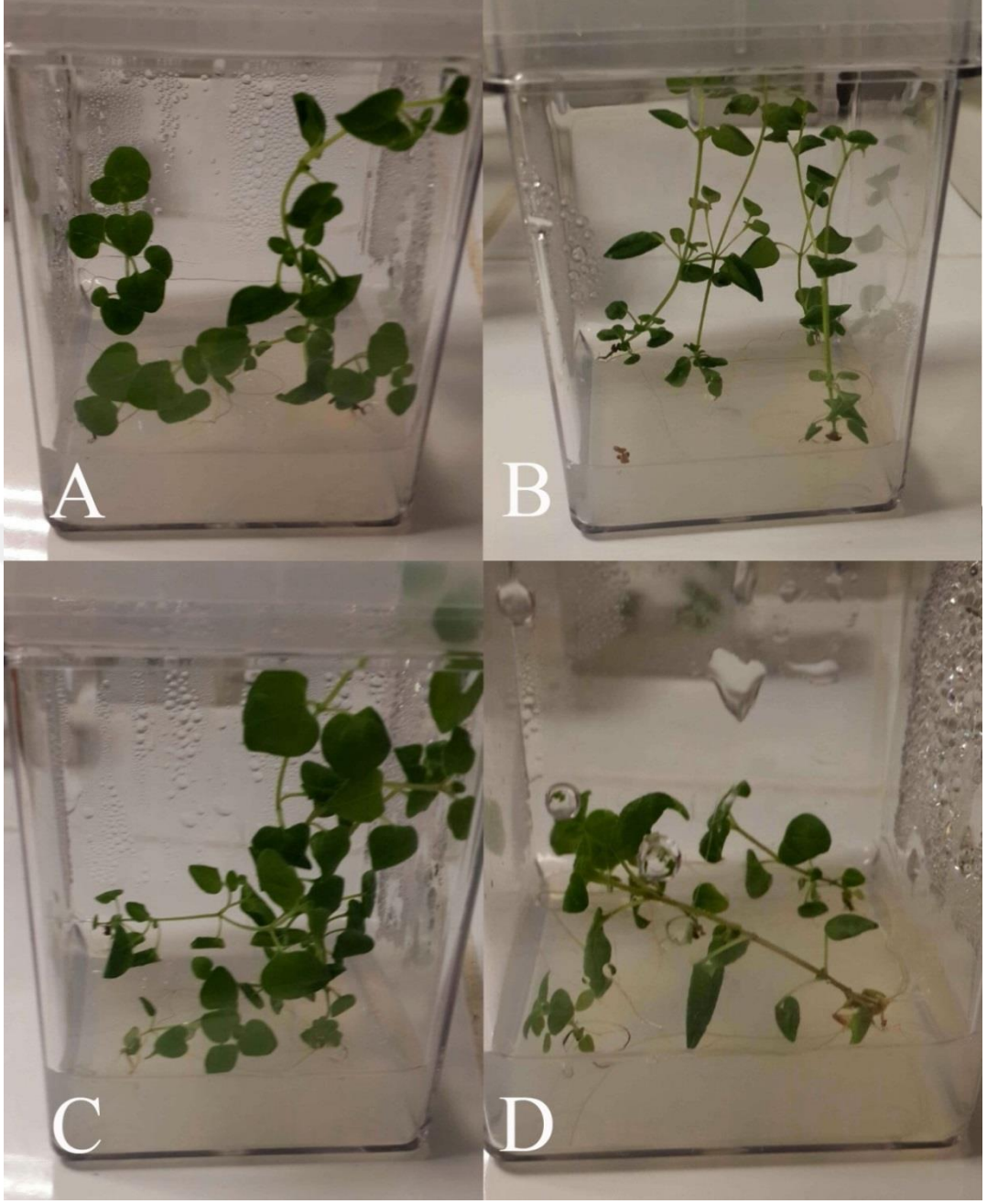
Farklı konsantrasyonlarda kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek ortalama sürgün sayıları azalan sırayla; 1,0 mg/L (1,32), 0,50 mg/L (1,14), 0,25 mg/L (1,07) ve 0,75 mg/L (1,03) şeklindedir. Şekil 3.10 A’da kontrol ile farklı konsantrasyonlarda kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün sayılarının çizgi grafiği gösterilmektedir.

Farklı konsantrasyonlarda kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek ortalama sürgün uzunlukları azalan sırayla; 0,75 mg/L (4,38 cm), 0,50 mg/L (3,8 cm), 0,25 mg/L (2,34 cm) ve 1,0 mg/L (2,1 cm) şeklindedir. Şekil 3.10 B’de kontrol ile farklı konsantrasyonlarda kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün uzunluklarının çizgi grafiği gösterilmektedir.



Şekil 3.10. Kontrol ile farklı konsantrasyonlarda kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün sayıları (A) ve uzunluklarının (B) çizgi grafikleri

Çoğaltım süresinin sonunda farklı konsantrasyonlarda kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların genel görünümü Şekil 3.11’de gösterilmektedir.



Şekil 3.11. Farklı konsantrasyonlarda kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların genel görünümü, A: 0,5 mg/L kitosan, B: 1,0 mg/L kitosan, C: 2,0 mg/L kitosan, D: 4,0 mg/L kitosan

3.4. Farklı Kinetin, BAP ve Kitosan Konsantrasyonlarının Kök Sayıları ve Uzunlukları Üzerine Etkileri

Besi ortamlarının farklı konsantrasyonlarında kültüre alınan eksplantların kökleri, farklı sayılara ve uzunluklara sahip olduğu görüldü. Kontrol ile karşılaştırılarak, farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamların kök sayıları ve uzunlukları üzerine olan etkilerine ait bulgular Tablo 3.4'te gösterilmektedir. Her besi ortamının farklı konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların ortalama kök sayıları ve ortalama kök uzunlukları belirlendikten sonara, bu ortalamalar Post Hoc testleri uygulanarak, LSD çoklu karşılaştırma testine göre ayrıldı (ortalamalar arasındaki fark $P<0,05$ seviyesinde anlamlıdır).

Tablo 3.4. Kontrol ile karşılaştırılarak, farklı kinetin, BAP ve kitosan konsantrasyonların kök sayıları ve uzunlukları üzerine olan etkilerine ait bulgular

Besi Ortam-konsantrasyon (mg/L)	Toplam eksplant sayısı	Hayatta kalan eksplant sayısı	Toplam kök sayısı	Ort. Eksplant başına kök sayısı \pm std.s*	% Kök indüksiyonu**	Ort. Kök uzunluğu (cm) \pm std.s
Kontrol	30	27	129	4,81 \pm 0,39	90	1,91 \pm 0,04
Kinetin						
Kn 0,50	30	27	154	5,69 \pm 0,51	90	2,13 \pm 0,05
Kn 1,00	30	30	185	6,17 \pm 0,12	100	2,15 \pm 0,05
Kn 2,00	30	29	134	4,62 \pm 0,09	96.67	1,78 \pm 0,05
Kn 4,00	30	28	152	5,44 \pm 0,33	93.33	1,59 \pm 0,17
BAP						
BAP 0,50	30	25	54	1,99 \pm 0,44	83.33	1,18 \pm 0,02
BAP 1,00	30	25	54	2,17 \pm 0,24	83.33	1,31 \pm 0,19
BAP 2,00	30	23	50	1,97 \pm 0,24	76.67	2,22 \pm 0,15
BAP 4,00	30	26	50	1,92 \pm 0,06	86.67	1,5 \pm 0,19
Kitosan						
Kit 0,25	30	30	104	3,47 \pm 0,20	100	2,45 \pm 0,17
Kit 0,50	30	29	142	4,91 \pm 0,31	96.67	2,49 \pm 0,05
Kit 0,75	30	30	113	3,77 \pm 0,09	100	2,89 \pm 0,07
Kit 1,00	30	25	93	3,74 \pm 0,29	83.33	2,21 \pm 0,10

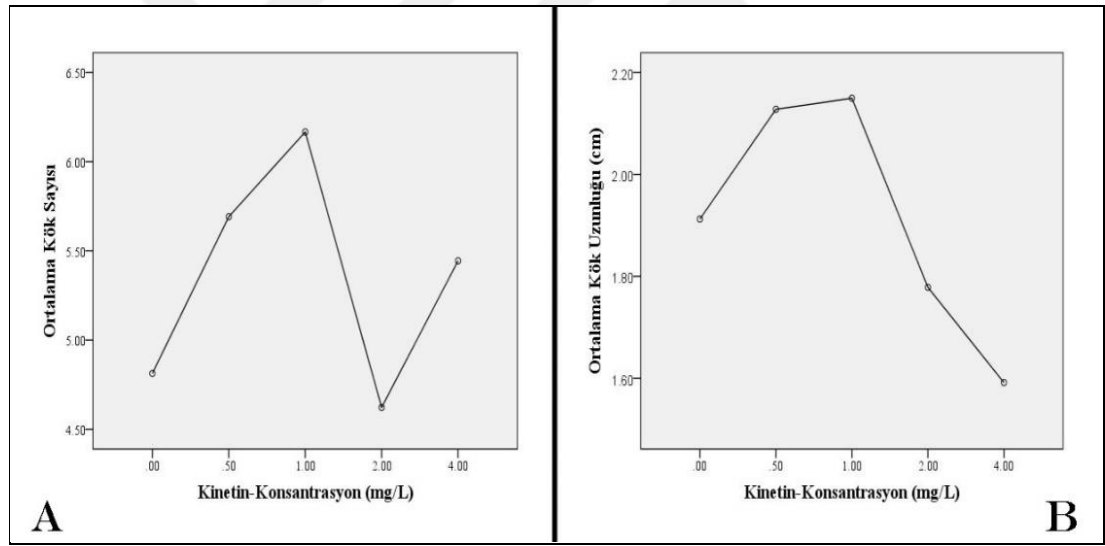
* Her tekrarda toplam kök sayısı/ canlı eksplant sayısı (üç tekrarin ortalaması)

** % Kök indüksiyonu= (Canlı eksplantların sayısı / Tüm eksplantların sayısı) x % 100

3.4.1. Farklı kinetin konsantrasyonlarının etkileri

Farklı konsantrasyonlarda kinetin içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek ortalama kök sayıları azalan sırayla; 1,0 mg/L (6,17), 0,50 mg/L (5,69), 4,0 mg/L (5,44) ve 2,0 mg/L (4,62) şeklindedir. Şekil 3.12 A’da kontrol ile farklı kinetin konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların ortalama kök sayılarının çizgi grafiği gösterilmektedir.

Farklı konsantrasyonlarda kinetin içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek ortalama kök uzunlukları azalan sırayla; 1,0 mg/L (2,15 cm), 0,5 mg/L (2,13 cm), 2,0 mg/L (1,78 cm) ve 4,0 mg/L (1,59 cm) şeklindedir. Şekil 3.12 B’de kontrol ile farklı kinetin konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün uzunluklarının çizgi grafiği gösterilmektedir.

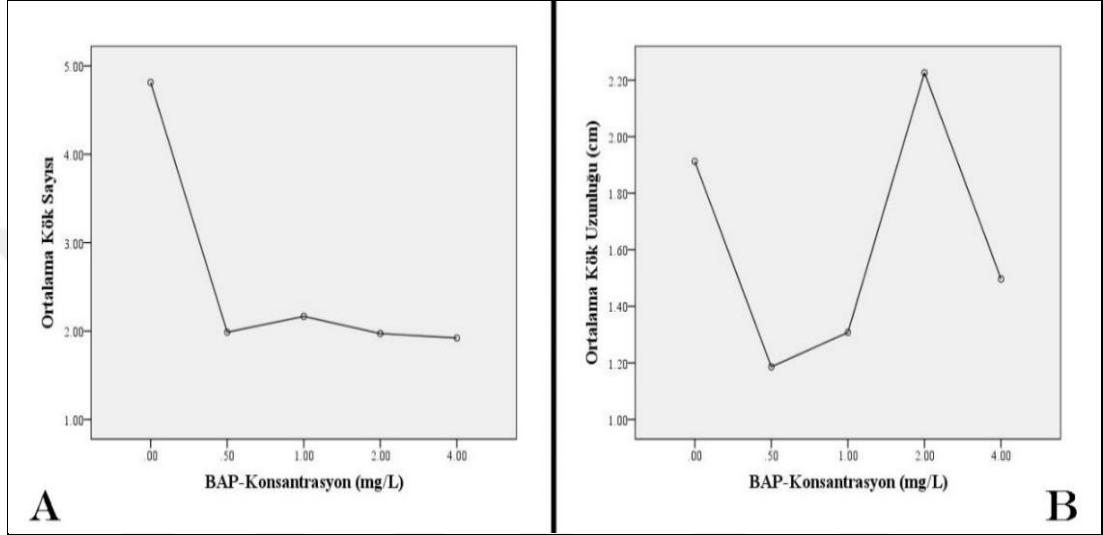


Şekil 3.12. Kontrol ile farklı kinetin konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların ortalama kök sayıları (A) ve uzunluklarının (B) çizgi grafikleri

3.4.2. Farklı BAP konsantrasyonlarının etkileri

Farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek ortalama kök sayıları azalan sırayla; 1,0 mg/L (2,17), 0,50 mg/L (1,99), 2,0 mg/L (1,97) ve 4,0 mg/L (1,92) şeklindedir. Şekil 3.13 A’da kontrol ile farklı BAP konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların ortalama kök sayılarının çizgi grafiği gösterilmektedir.

Farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek ortalama kök uzunlukları azalan sırayla; 2,0 mg/L (2,22 cm), 4,0 mg/L (1,50 cm), 1,0 mg/L (1,31cm) ve 0,50 mg/L (1,18 cm) şeklindedir. Şekil 3.13 B’de kontrol ile farklı BAP konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün uzunluklarının çizgi grafiği gösterilmektedir.

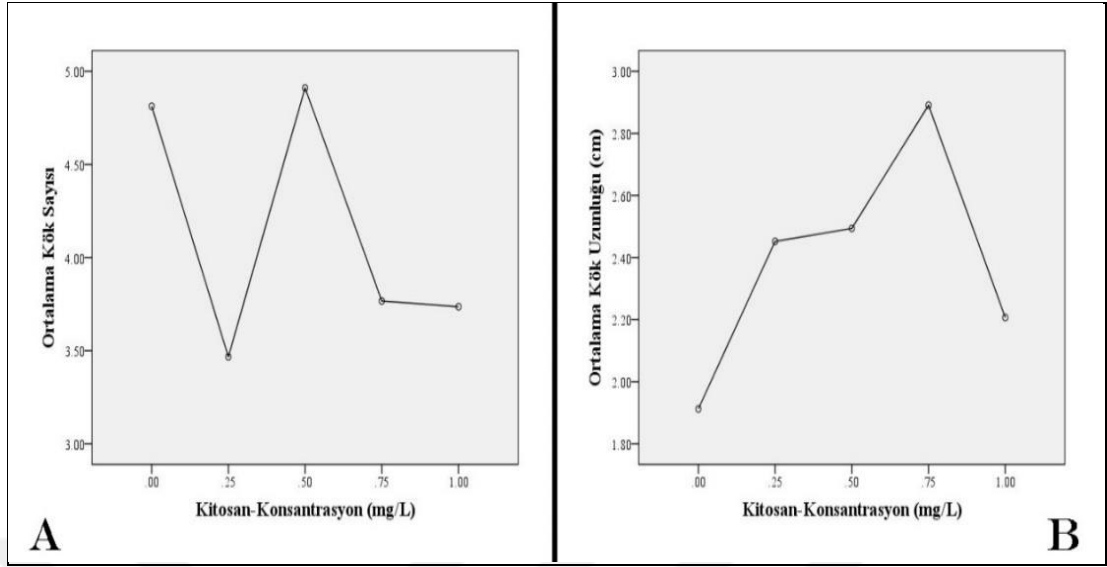


Şekil 3.13. Kontrol ile farklı BAP konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların ortalama kök sayıları (A) ve uzunluklarının (B) çizgi grafikleri

3.4.3. Farklı kitosan konsantrasyonlarının etkileri

Farklı konsantrasyonlarda kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek ortalama kök sayıları azalan sırayla; 0,50 mg/L (4,91), 0,75 mg/L (3,77), 1,0 mg/L (3,74) ve 0,25 mg/L (3,47) şeklindedir. Şekil 3.14 A’da kontrol ile farklı kitosan konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların ortalama kök sayılarının çizgi grafiği gösterilmektedir.

Farklı konsantrasyonlarda kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek ortalama kök uzunlukları azalan sırayla; 0,75 mg/L (2,89 cm), 0,5 mg/L (2,49 cm), 0,25 mg/L (2,45cm) ve 1,0 mg/L (2,21 cm) şeklindedir. Şekil 3.14 B’de kontrol ile farklı kitosan konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün uzunluklarının çizgi grafiği gösterilmektedir.



Şekil 3.14. Kontrol ile farklı kitosan konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların ortalama kök sayıları (A) ve uzunluklarının (B) çizgi grafikleri

3.5. Farklı Kinetin, BAP ve Kitosan Konsantrasyonlarının Yaprak Sayıları Üzerine Etkileri

Besi ortamlarının farklı konsantrasyonlarında kültüre alınan eksplantların yaprakları, farklı sayılara sahip oldukları görüldü. Kontrol ile karşılaştırılarak, farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamların yaprak sayıları üzerine olan etkilerine ait bulgular Tablo 3.5'te gösterilmektedir. Her besi ortamının farklı konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların eksplant başına ortalama yaprak sayıları ve sürgün başına ortalama yaprak sayıları belirlendikten sonra, bu ortalamalar Post Hoc testleri uygulanarak, LSD çoklu karşılaştırma testine göre ayrıldı (ortamalar arasındaki fark $P < 0,05$ seviyesinde anlamlıdır).

Tablo 3.5. Kontrol ile karşılaştırılarak, farklı kinetin, BAP ve kitosan konsantrasyonların yaprak sayıları üzerine olan etkilerine ait bulgular

Besi Ortamı-konsantrasyon (mg/ L)	Toplam eksplant sayısı	Hayatta kalan eksplant sayısı	Toplam yaprak sayısı	Ort. Eksplant başına yaprak sayısı \pm std.s*	Ort. Sürgün başına yaprak sayısı \pm std.s**
Kontrol	30	27	334	12,50 \pm 1,49	8,79 \pm 0,03
Kinetin					
Kn 0,50	30	27	380	14,12 \pm 0,66	10,64 \pm 1,28
Kn 1,00	30	30	376	12,53 \pm 0,09	10,22 \pm 0,74
Kn 2,00	30	29	374	12,92 \pm 0,61	7,99 \pm 0,49
Kn 4,00	30	28	606	21,76 \pm 2,23	9,05 \pm 0,35
BAP					
BAP 0,50	30	25	252	10,14 \pm 1,39	8,11 \pm 0,44
BAP 1,00	30	25	232	9,29 \pm 0,16	7,5 \pm 0,53
BAP 2,00	30	23	198	8,63 \pm 0,38	7,33 \pm 0,18
BAP 4,00	30	26	304	11,76 \pm 1,28	8,21 \pm 0,28
Kitosan					
Kit 0,25	30	30	374	12,47 \pm 0,09	11,72 \pm 0,62
Kit 0,50	30	29	460	15,9 \pm 0,86	14,01 \pm 0,97
Kit 0,75	30	30	548	18,27 \pm 0,09	17,71 \pm 0,69
Kit 1,00	30	25	380	15,24 \pm 0,75	11,7 \pm 0,87

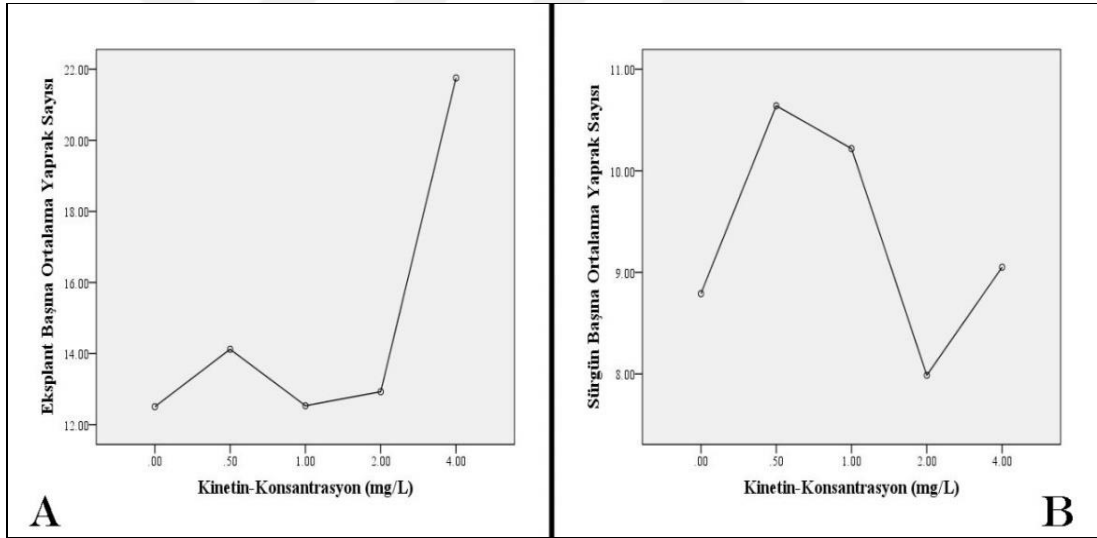
* Her tekrarda toplam yaprak sayısı/ canlı explant sayısı (üç tekrarin ortalaması).

** Her tekrarda toplam yaprak sayısı/ sürgün sayısı (üç tekrarin ortalaması).

3.5.1. Farklı kinetin konsantrasyonlarının etkileri

Farklı konsantrasyonlarda kinetin içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek eksplant başına ortalama yaprak sayıları azalan sırayla; 4,0 mg/L (21,76), 0,50 mg/L (14,12), 2,0 mg/L (12,92) ve 1,0 mg/L (12,53) şeklindedir. Şekil 3.15 A'da kontrol ile farklı kinetin konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların eksplant başına ortalama yaprak sayılarının çizgi grafiği gösterilmektedir.

Farklı konsantrasyonlarda kinetin içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek sürgün başına ortalama yaprak sayıları azalan sırayla; 0,50 mg/L (10,64), 1,0 mg/L (10,22), 4,0 mg/L (9,05) ve 2,0 mg/L (7,99) şeklindedir. Şekil 3.15 B'de kontrol ile farklı kinetin konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların sürgün başına ortalama yaprak sayılarının çizgi grafiği gösterilmektedir.

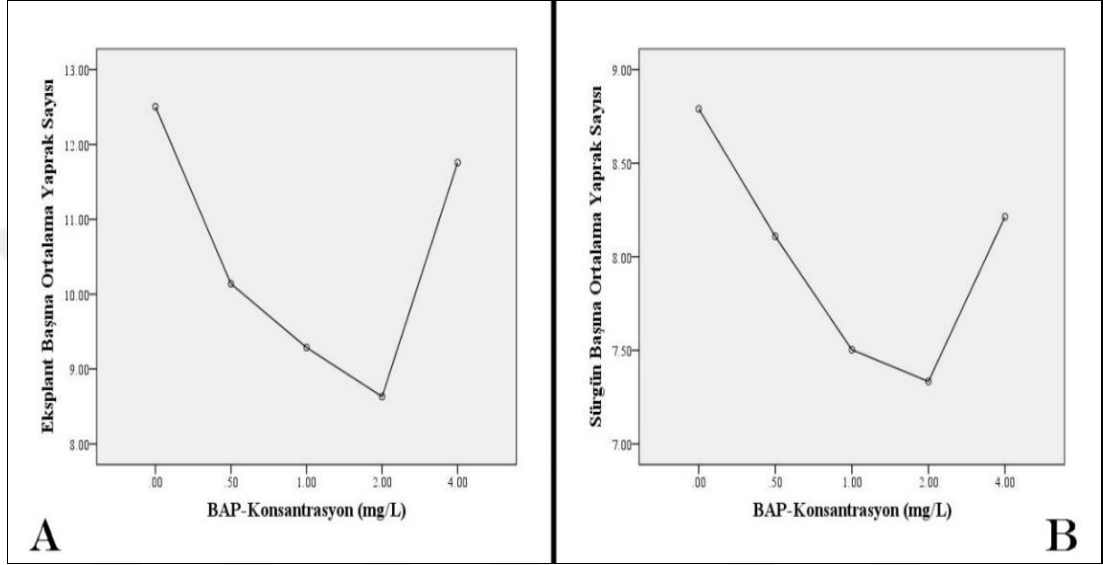


Şekil 3.15. Kontrol ile farklı kinetin konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların eksplant başına (A) ve sürgün başına (B) ortalama yaprak sayılarının çizgi grafikleri

3.5.2. Farklı BAP konsantrasyonlarının etkileri

Farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek eksplant başına ortalama yaprak sayıları azalan sırayla; 4,0 mg/L (11,76), 0,50 mg/L (10,14), 1,0 mg/L (9,29) ve 2,0 mg/L (8,63) şeklindedir. Şekil 3.16 A'da kontrol ile farklı BAP konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların eksplant başına ortalama yaprak sayılarının çizgi grafiği gösterilmektedir.

Farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek sürgün başına ortalama yaprak sayıları azalan sırayla; 4,0 mg/L (8,21), 0,50 mg/L (8,11), 1,0 mg/L (7,50) ve 2,0 mg/L (7,33) şeklindedir. Şekil 3.16 B’de kontrol ile farklı BAP konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların sürgün başına ortalama yaprak sayılarının çizgi grafiği gösterilmektedir.

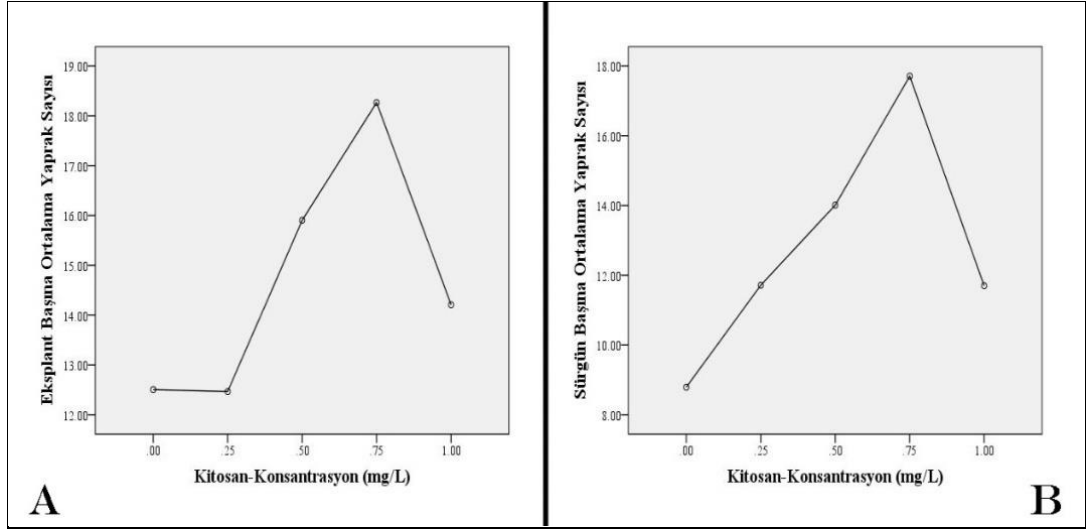


Şekil 3.16. Kontrol ile farklı BAP konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların eksplant başına (A) ve sürgün başına (B) ortalama yaprak sayılarının çizgi grafikleri

3.5.3. Farklı kitosan konsantrasyonlarının etkileri

Farklı konsantrasyonlarda kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek eksplant başına ortalama yaprak sayıları azalan sırayla; 0,75 mg/L (18,27), 0,50 mg/L (15,90), 1,0 mg/L (15,24) ve 0,25 mg/L (12,47) şeklindedir. Şekil 3.17 A’da kontrol ile farklı kitosan konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların eksplant başına ortalama yaprak sayılarının çizgi grafiği gösterilmektedir.

Farklı konsantrasyonlarda kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların en yüksek sürgün başına ortalama yaprak sayıları azalan sırayla; 0,75 mg/L (17,71), 0,50 mg/L (14,01), 0,25 mg/L (11,72) ve 1,0 mg/L (11,70) şeklindedir. Şekil 3.17 B’de kontrol ile farklı kitosan konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların sürgün başına ortalama yaprak sayılarının çizgi grafiği gösterilmektedir.



Şekil 3.17. Kontrol ile farklı kitosan konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların eksplant başına (A) ve sürgün başına (B) ortalama yaprak sayılarının çizgi grafikleri

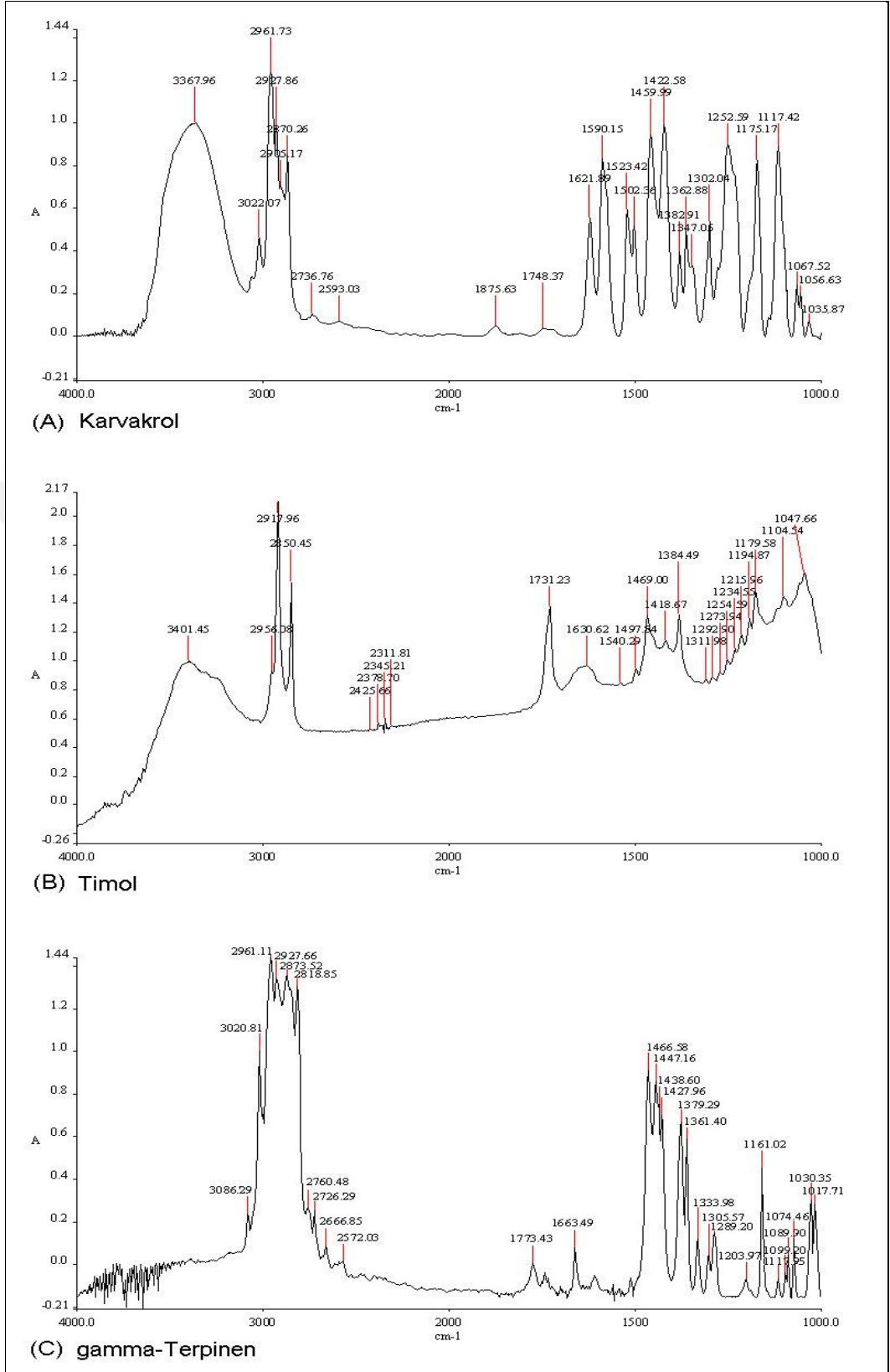
3.6. FT-IR Spektroskopisine Ait Bulgular

Bitkilerin çoğaltılmasından sonra, bitki örneklerin arasında esansiyel yağ bileşiminde herhangi bir farklılığın olup olmadığını belirlemek için FT-IR spektroskopisi kullanıldı. Kinetin, BAP ve kitosanın bitkilerdeki esansiyel yağ bileşenleri üzerine olan etkileri belirlemek için bu deneyde iki tür örnek kontrol olarak kullanıldı. Birincisi bitki örneklerin arasında esansiyel yağ bileşiminde herhangi bir farklılığın olup olmadığını belirlemek için, *Origanum vulgare*'nin esansiyel yağının temel üç bileşeni; karvakrol, timol ve γ -terpinen'in FT-IR spektrumları kontrol olarak kullanıldı. İkincisi bitki örneklerindeki bu yağ bileşenlerinin konsantrasyonlarında bir farklılığın olup olmadığını anlamak için kinetin, BAP veya kitosan ile muamele edilmeyen bitki örnekleri kontrol olarak kullanıldı. Şekil 3.29'da esansiyel yağların ana bileşenlerinin spektrumları gösterilmektedir.

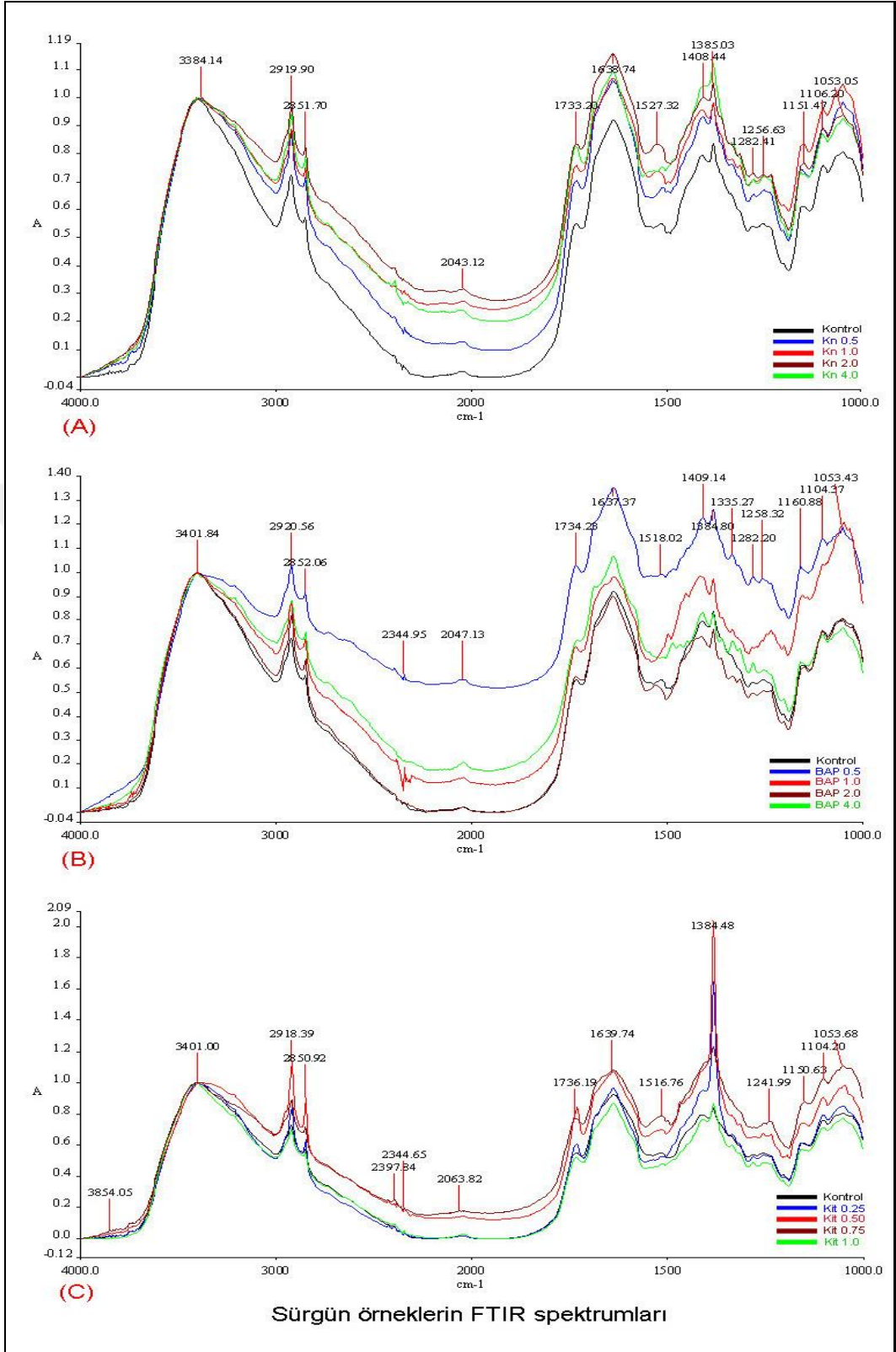
Bitkilerin sürgün örneklerinin spektrumlarına göre, tüm sürgün örneklerinde, çoğunlukla timol ve karvakrol bantları tespit edildi. Kontrol örneğine kıyasla, kinetin, BAP ve kitosan içeren ortamlarda yetiştirilen bazı eksplantların sürgünlerinde bu esansiyel yağ bileşenlerine ait bazı bantların absorbansları arttı. Bu artış en çok 0,5 mg/L BAP ile muamele edilen sürgün örneklerinde gözlemlendi, ondan sonra azalan sırayla; 2,0 mg/L kinetin, 0,75 mg/L kitosan, 4,0 mg/L kinetin, 1,0 mg/L BAP, 1,0 mg/L kinetin, 0,5 mg/L kitosan, 0,5 mg/L kinetin ve 4,0 mg/L BAP ile muamele edilen örneklerindekiydi (Şekil 3.30).

Aynı şekilde, kök ve yaprak örneklerinde, çoğunlukla timol ve karvakrol bantları tespit edildi. Bitkilerin kök örneklerinin spektrumlarına göre, yine bu esansiyel yağ bileşenlerinin absorbanlarında bir artış bulundu. Bu artış en çok 0,5 mg/L kinetin ile muamele edilen sürgün örneklerinde iken, ondan sonra azalan sırayla; 1,0 mg/L BAP, 0,75 mg/L kitosan, 1,0 mg/L kitosan, 2,0 mg/L kinetin, 1,0 mg/L kinetin, 4,0 mg/L BAP ve 4 mg/L kinetin ile muamele edilen örneklerindekiydi (Şekil 3.31).

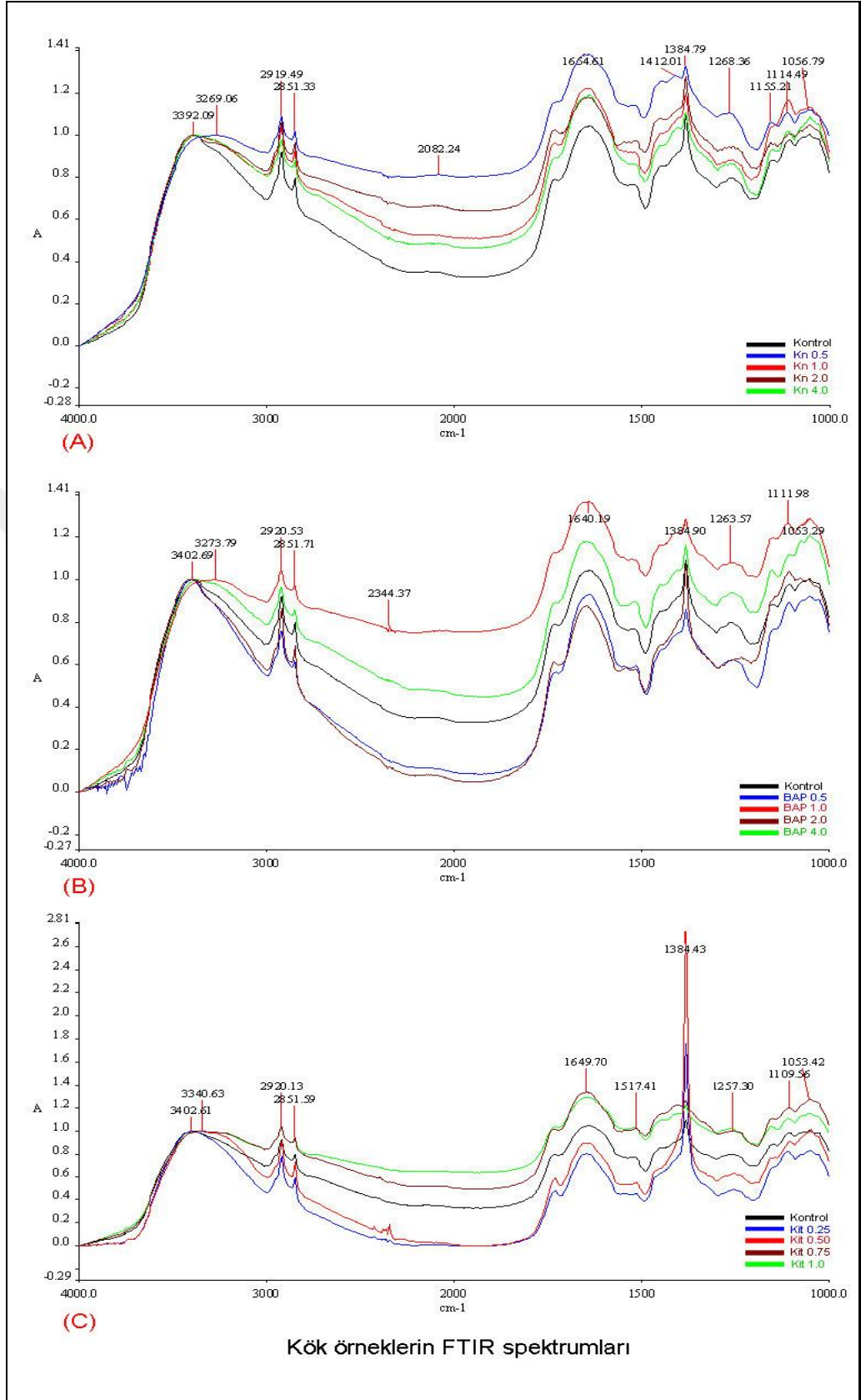
Bitkilerin yaprak örneklerinin spektrumlarına bakınca, esansiyel yağ bileşenlerinin absorbanlarının artışı en çok 2,0 mg/L kinetin ile muamele edilen sürgün örneklerinde gözlemlendi, ondan sonra azalan sırayla; 1,0 mg/L BAP, 1,0 mg/L kinetin, 0,75 mg/L kitosan, 1,0 mg/L kitosan, 0,5 mg/L kitosan, 4,0 mg/L BAP, 2,0 mg/L BAP ve 4,0 mg/L kinetin ile muamele edilen örneklerindekiydi (Şekil 3.32).



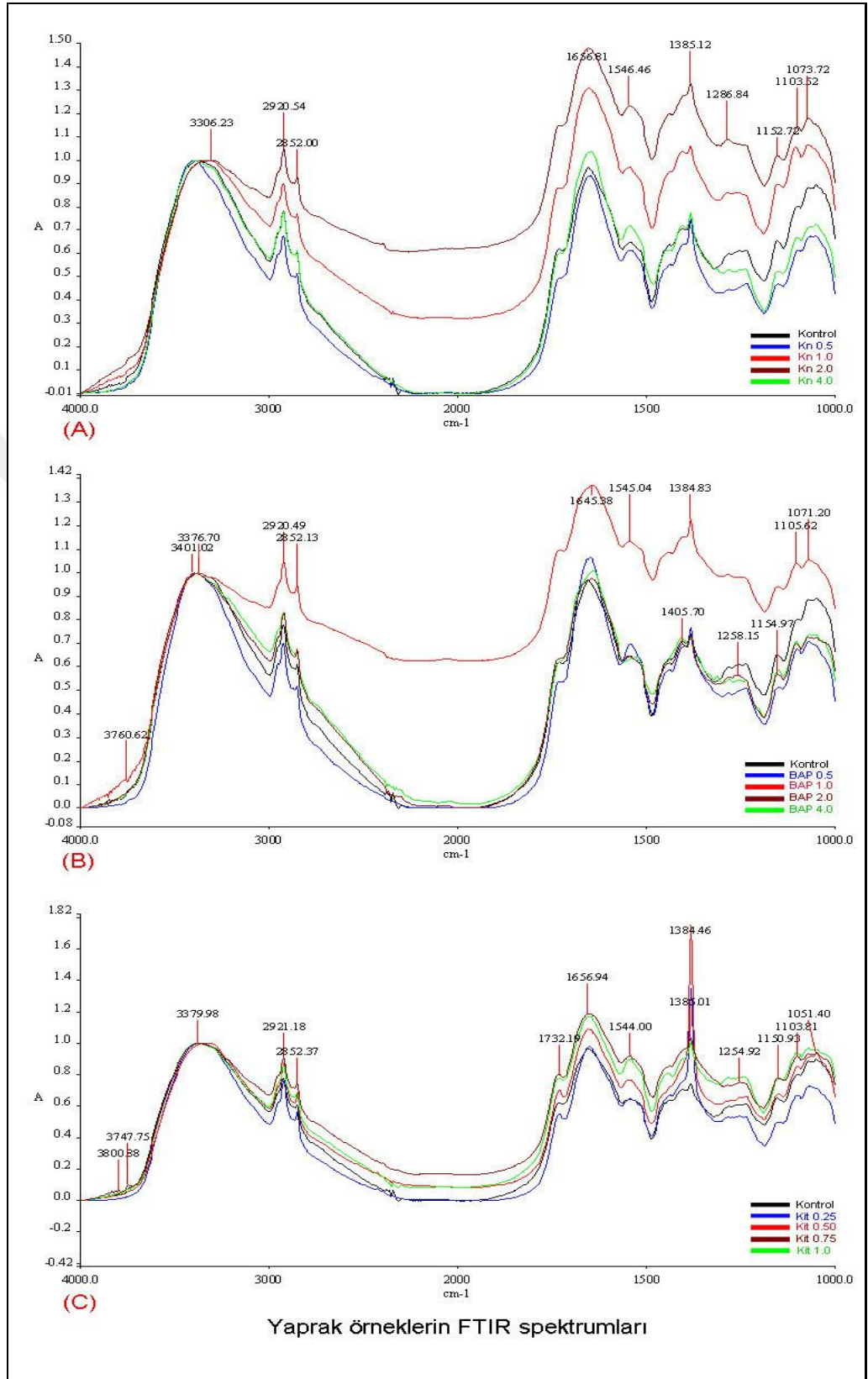
Şekil 3.18. *Origanum vulgare*'nin esansiyel yağının ana bileşenleri; (A) karvakrol, (B) timol ve (C) γ -terpinen'in FT-IR spektrumları



Şekil 3.19. Farklı (A) kinetin, (B) BAP ve (C) kitosan konsantrasyonlarıyla muamele edilen bitkilerin sürgün örneklerinin FT-IR spektrumları



Şekil 3.20. Farklı (A) kinetin, (B) BAP ve (C) kitosan konsantrasyonlarıyla muamele edilen bitkilerin kök örneklerinin FT-IR spektrumları



Şekil 3.21. Farklı (A) kinetin, (B) BAP ve (C) kitosan konsantrasyonlarıyla muamele edilen bitkilerin yaprak örneklerinin FT-IR spektrumları

Bitki örneklerinin FT-IR spektrumlarına ait şekillerde görüldüğü gibi, bitki dokularına ait FT-IR spektrumları lipitler, karbonhidratlar ve proteinler gibi bitkilere özgü birçok molekülden kaynaklı değişik bantlar içerdiklerinden dolayı oldukça komplekstirler. FT-IR spektroskopisinin prensiplerinden biri olarak; FT-IR spektrumundaki bir bantın oluşumunda tek bir biyomolekülün yapısındaki fonksiyonel grupların vibrasyonu değil, aynı fonksiyonel grubu içeren başka biyomoleküllerin katkısı da söz konusudur (Türker, 2007; Türker, 2009). Bu yüzden bir bantın oluşumunda tek ve belirli bir fonksiyonel grubu temsil ettiği kesin olarak varsayılmaz (Tablo 3.6). Bu nedenle, bazı bantların absorbanısında gözlenen artış, sadece esansiyel yağ moleküllerine değil, aynı zamanda bu bantların bölgesine ait olan herhangi bir moleküldeki bir artışın bir sonucu olabilir, ancak bu artışta, bitkideki esansiyel yağ konsantrasyonlarındaki artışın katkısı çok fazladır.

Tablo 3.6: Bitki FT-IR spektrumunun genel bant tanımları (Türker, 2007)

Pik #	Dalga sayısı (cm ⁻¹)	Bant Tanımlama
1	3380	O-H ve N-H grubu gerilme: karbonhidratlar, protein
2	2957	CH ₃ asimetric gerilme: çoğunlukla lipitler ve az miktarda proteinler, karbonhidratla ve nükleik asitler
3	2922	CH ₂ asimetric gerilme: çoğunlukla lipitler ve az miktarda proteinler, karbonhidratla ve nükleik asitler
4	2873	CH ₃ asimetric gerilme: çoğunlukla lipitler ve az miktarda proteinler, karbonhidratla ve nükleik asitler
5	2852	CH ₂ asimetric gerilme: çoğunlukla lipitler ve az miktarda proteinler, karbonhidratla ve nükleik asitler
6	1733	Doymuş ester C=O gerilme: fosfolipitler, kolesterol esterler, hemiselüloz ve pektin
7	1651	Amid I (protein C=O gerilme): protein ve pektin
8	1601	C=O aromatik gerilme: lignin
9	1555	Amid II (C=N ve N-H gerilme): çoğunlukla proteinler
10	1446 1415 1250	C-H: hücre duvarı polisakkaritler O-H eğilme: hücre duvarı polisakkaridler, alkoller ve karboksilik asitler Pektik maddeler
11	1235	Amid III (C-N ve N-H gerilme): çoğunlukla proteinler
12	1145	Selüloz (β -1.4 glukozan)
13	1101 1073	Antisimetric faz içi: pektik maddeler, Rhamnogalakturonan ve β -galaktan
14	1064	C-O gerilme: hücre duvarı polisakkaritler (glukozan)
15	1035	OH ve C-OH gerilmesi: hücre duvarı polisakkaridleri
16	895 893	Arabinan Galaktan
17	873	β -D-fruktoz

3.7. Tartışma

Bezelye (*Pisum sativum* L.) ve domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkilerinde kitosanın uyarıcı etkisi ile ilgili ilk rapordan sonra (Walker-Simmons ve diğ., 1983), bitkilerin büyümesini uyarmak, yenilebilir ürünleri korumak ve çeşitli bitki türlerinde abiyotik ve biyotik stres toleransı ve savunma tepkilerini uyarmak için kitosanın kullanıldığı bildirilmiştir (Malerba ve Cerana, 2016; Choi ve diğ., 2016).

Bitki büyümesi üzerine kitosanın etkileri:

Bu çalışmada kitosan *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* bitkisinin tohumlarının çimlenme yüzdesini arttırdığı gözlemlendi. Bu sonuç önceki çalışmaların sonuçları ile tutarlıdır. Örneğin, kitosan *Cynara cardunculus* var. *scolymus*'un (Enginar) (Ziani ve diğ., 2010), *Plantago ovata* Forsk 'un (Isabgol) (Mahdavi, 2013) ve *Dendrobium formosum* orkid'in (Kananont ve diğ., 2010) tohum çimlenme yüzdesini ve kalitesini artırmıştır. Ayrıca bu çalışmada 0,25 , 0,50 ve 0,75 mg / L kitosan ile muamele edildikten sonra. bitki boyuna göre *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*'nin büyüme oranları % 9,85 , % 78,4 ve % 105,6 olarak artmıştır. Bu veriler *Origanum vulgare*'de boy artışının uyarılması için kullanılan kitosan konsantrasyonlarının arasında 0,75 mg / L en etkili konsantrasyon olduğunu gösterdi. Kitosan kullanılarak *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Yunan kekiği) üzerinde yapılan bir çalışma dışında, oregano büyüme ve sekonder metabolitleri üzerine çalışmalar bulunmamaktadır. Kitosan oligosakkarit çözeltileri (200 ve 500 ppm) ile muamele edilen Yunan kekikte bitki boyu büyüme oranını önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir (Yin ve diğ., 2012). Kitosan ile muamele edilen diğer bitki türlerinin bitki boyunu arttırdığı önceki çalışmalarda tespit edilmiştir, bazı örnekler: *Hibiscus esculentus* L. (Okra) (Mondal ve diğ., 2012), Freesia (Salachna ve Zawadzi'nska 2014) ve *Capsicum annuum* L. (acı biber) (Chookhongkha ve diğ., 2012).

Kitosan ayrıca *origanum vulgare* ssp. *vulgare*'nin köklerinin uzunluğunu arttırdı, ve bu, köklerin yüzey alanını artırıp bitkinin etrafındaki çözünmüş minerallerin taşınmasını hızlandırıp bitkinin büyümesini artırır. Kitosanın etkisi olarak geliştirilmiş köklenme, üzüm (Górnik ve diğ., 2008) ve isabgol (Mahdavi, 2013) gibi bazı bitkiler üzerine yapılan önceki çalışmalarda bildirilmiştir.

Oiganum vulgare ssp. *vulgare* üzerine 0,75 mg / L kitosan uygulaması, bitkinin boyu, yaprak sayısı ve kök uzunluğunda bir artışa neden oldu. Ancak kitosanın 0,75 mg / L'den daha fazla uygulanması, düşük kitosan konsantrasyonlarına kıyasla bitki büyümesinde azalmaya neden oldu. Buna karşılık, *Hibiscus esculentus* L. (bamya) bitkisinin optimal büyüme artışı için daha yüksek kitosan konsantrasyonları gerekli olmuştur. 100–125 mg / L kitosan uygulaması, bamya meyvesinin yanı sıra bitki boyu, yaprak sayısı, nispi büyüme oranı ve fotosentez oranını arttırmış, fakat klorofil içeriği üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır (Mondal ve diğ., 2012). ki, farklı kitosan konsantrasyonlarının bitkilerde farklı algıyı tetiklediğini düşünmektedir.

Artan klorofil içeriği de bir kitosanın etkisidir ve genellikle gelişmiş bir büyüme veya artmış net fotosentez oranı ile ilişkilidir. Örneğin, uygun bir kitosan türü ve konsantrasyonu içinde üzüm asmaları daldırılması klorofil içeriğini arttırmıştır (Górnik ve diğ., 2008), ve kahve (Robusta) fideleri üzerine kitosanın püskürtülmesi, yaprak klorofil içeriği artmıştır (Van ve diğ., 2013). Benzer şekilde, frezya üzerine kitosan uygulaması, bitki büyümesinde ve klorofil içeriğinde artışa neden olmuştur (Salachna ve Zawadzinska, 2014). Fakat, bazı türlerde, örneğin çilek (*Fragaria* × *ananassa* Duch. cv. Sweet Char-lie), kitosanın püskürtülmesi yaprak / bitki sayısı ve yaprak alanı da dahil olmak üzere vejetatif büyümeyi arttırmış, fakat klorofil içeriğini etkilememiştir (El-Miniawy ve diğ., 2013).

Uçucu organik bileşiklerin içeriği ve sekonder metabolitlerin birikimi üzerine kitosanın etkileri:

Kitosan, sekonder metabolitlerin ve uçucu organik bileşiklerin birikmesini arttırmak için tıbbi bitkilerin hücre kültürlerinde ve bitki organlarında kullanılmaktadır. Örneğin, kitosan tatlı fesleğende (*Ocimum basilicum* L.) fenolik ve terpenik bileşikleri, özellikle rosmarinik asit ve eugenolü arttırdığı gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2005). Ayrıca domateste fenolik bileşiklerin içeriği (Liu ve diğ., 2007; Badawya ve Rabea, 2009) ve kirazlarda antosiyanin ve toplam fenolik bileşiklerin içeriği (Kerch ve diğ., 2011) ve üzümde kateşinler gibi diğer polifenollerin birikimini arttırmıştır (Ferri ve diğ., 2011). Bu çalışmada kitosan görünüşte, *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*'de karvakrol, γ -terpinen ve timol konsantrasyonlarını arttırmış. Benzer şekilde *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*'da terpenlerin toplam içeriği ve karvakrol, γ -terpinen ve timol konsantrasyonları kitosan oligosakkaritleri tarafından belirgin bir

şekilde arttırılmıştır ve toplam polifenol içeriği yanı sıra toplam flavonoidler ve litospermik asit B içeriği de anlamlı ölçüde artmıştır (Yin ve diğ. , 2012). Bazı yazarlar, polifenollerin yukarı regülasyonunun, kitosanın, fenilalanin amonyak liyaz (PAL) ve chalkon sintaz (CHS) gibi polifenollerin biyosentezinde yer alan enzimler üzerindeki etkisinden kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Örneğin, *Vitis vinifera* hücre süspansiyonlarında kitosan, polifenol seviyelerini ve hem gen transkript hem de bazı polifenol sintaz-ilişkili enzimlerin (PAL ve CHS) protein seviyelerini arttırmıştır (Ferri ve diğ., 2009). Bu raporlar, kitosanın sekonder metabolitlerin birikimini indükleme yeteneğinin farklı bitki sistemlerinde değiştiğini göstermektedir. Yanıt bitkiden bitkiye değişebilir ve kitosanın konsantrasyonu, büyüme aşaması, kitosanla temas süresi gibi birçok faktöre bağlı olabilir.

Kitosanın bitkilerin savunma / stres tepkileri ve raf ömrü üzerine etkileri:

Kitosanın abiyotik ve biyotik stres toleransı ve çok çeşitli patojenlere karşı savunma yanıtlarını arttırdığını tespit edilmiştir (Hamel ve diğ., 2010). Pek çok çalışmada kitosan ve türevlerinin antimikrobiyal özellikleri ve birçok bitki patojeni, kitosana duyarlı olduğu bildirilmiştir (Iriti ve Varoni, 2015). Birçok çalışma mantarlar üzerinde kitosan etkisi ile ilgilenmektedir. Çünkü hem hasat öncesi hem de hasat sonrası süreçlerde, patojenik mantarların enfeksiyonu, meyve ve sebzelerin büyük kayıplarına neden olur. Şu anda, sentetik kimyasal fungusitler bu patojenleri yönetmek için birincil tercihtir. Ayrıca, sentetik fungusitler potansiyel olarak insan sağlığına zararlıdır ve bunların rastlantısal kullanımı, dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olur. Kitosan bu hastalıkları kontrol etmek için umut verici bir alternatiftir (Malerba ve Cerana, 2016).

Kitosanın etki şekli henüz tamamen çözülmemiştir. Antimikrobiyal etkisi için farklı mekanizmalar var, örneğin, mikrobiyal hücre plazma membranının fosfolipidleri ile etkileşimi (Liang ve diğ., 2014), hücre plazma zarının proteinleri ile etkileşimi (Xing ve diğ., 2009), hücre yüzeyinin negatif yüklü bileşenlerle etkileşimi (García-Rincóna ve diğ., 2010), hücre duvarı bileşenleri ile etkileşimi (Geisberger ve diğ., 2013), DNA / RNA yüklü fosfat gruplarıyla etkileşimi (Liu ve diğ., 2001), bakteri yüzeyinde birikmesi (Vishu ve diğ., 2005).

Farklı enzim aktivitelerinin reaktif oksijen türlerini detoksifiye etmeye teşvik edici etkisi, kitosan sinyallemede hidrojen peroksit ve nitrik oksidin rol oynadığını göstermektedir (Malerba ve Cerana, 2015). Kitosan ile beslenen farklı bitkilerde (Iriti ve Varoni, 2015) ve bazı bitki hücre kültürlerinde (Ferri ve diğ., 2011; Malerba ve diğ., 2011) hidrojen peroksit (H_2O_2) birikimi ile ilk oksidatif patlama gözlemlendi (Ferri ve diğ., 2011; Malerba ve diğ., 2011). Kitosan uygulamasından kısa bir süre sonra, Yunan oregano yapraklarının epidermal hücrelerinde H_2O_2 üretimini uyarmıştır (Yin ve diğ., 2012). Hem H_2O_2 'de hem de polifenollerin üretiminde düşük kitosan konsantrasyonlarının etkisi olmuştur. Bu etki daha yüksek kitosan konsantrasyonlarında azalmıştır. Bu sonuçlar kitosan kaynaklı H_2O_2 ve polifenollerin birikimi arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Yüksek konsantrasyonlu kitosan hızla H_2O_2 birikimini indüklemiştir, ancak sekonder metabolitlerin üretimi üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır. Bu, yüksek düzeyde kitosan konsantrasyonlarında H_2O_2 'nin strese bağlı olarak düzenlenmesini yansıtabilir ve bitki hücresi ölümü sonuçlanabilir (Yin ve diğ., 2010; Wang ve diğ., 2008; Vasil ve diğ., 2009).

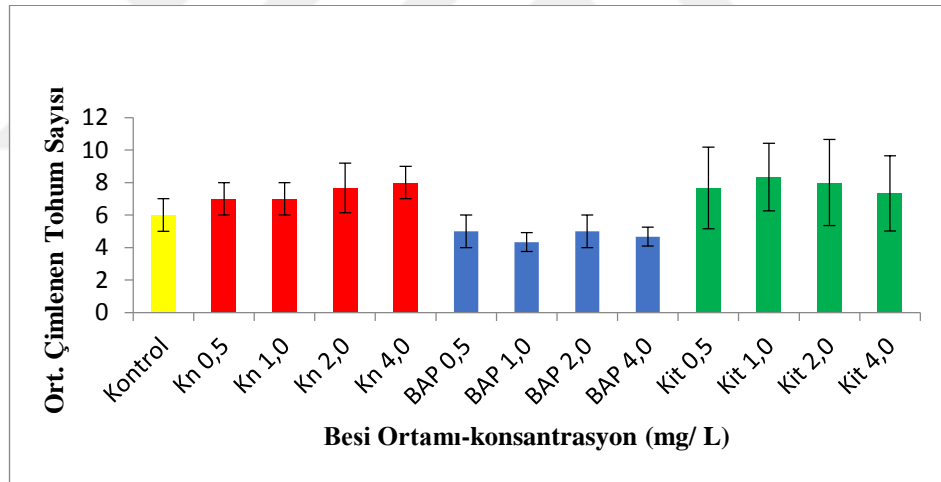
Kitosan aynı zamanda meyveleri kaplamak veya daldırmak için de kullanılabilir ve bu tedavi raf ömrünü uzatır ve salatalık, havuç, elma, narenciye, kivi, şeftali, armut, çilek ve tatlı kiraz gibi birçok meyvenin bozulmasını geciktirir (Kerch, 2015). Son zamanlardaki çalışmaların sonuçları, kitosanın saklama ömrü uzatıp papaya ve mango meyveleri gibi ticari olarak önemli tropik meyvelerin çürümesini geciktirdiğini göstermiştir (Hewajulige ve diğ., 2015).

Kitosan ile muamele edilen bitkilerde gözlenen diğer biyokimyasal ve moleküler değişiklikler şunları içerir: kallos yerleştirilmesi (Faoro ve Iriti, 2007), sitosolik Ca^{2+} artışları (Zuppini ve diğ., 2003), MAP-kinazların aktivasyonu (Yin ve diğ., 2010), plazma membranı H^+ -ATPaz inhibisyonu (Amborabé ve diğ., 2008), kromatin modifikasyonları (Hadwiger ve diğ., 2008; Iriti ve Faoro, 2009), alkaloidlerin (Orlita ve diğ., 2008) ve fitaguratörlerin (jasmonik asit, JA ve absisik asit, ABA) sentezi (Iriti ve Faoro, 2008).

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

4.1. Kinetin, BAP ve Kitosanın Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması

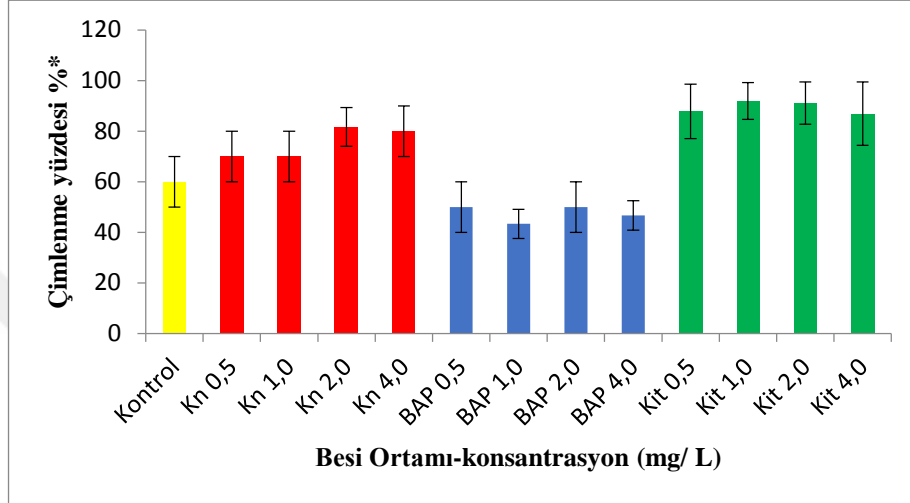
Kitosanın dört konsantrasyonunun hepsi, kültür ortamına eklendiğinde, kinetin ve BAP'a kıyasla *Origanum vulgare* tohumlarının daha fazla çimlenmesini teşvik ettiğini gösterdi. Kitosan içeren besi ortamlarında ekilen tohumlar, kinetin, BAP ve kontrol besi ortamlarında ekilen tohumlardan daha hızlı ve daha yüksek bir verimle çimlendiler. Tohum ekiminden sonraki 15. güne kadar, kitosan örnekleri, tüm örnekler arasında en yüksek çimlenen tohum sayısına sahipti. Şekil 4.1'de her besi ortamında çimlenen tohumların ortalama sayısı gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamlarındaki çimlenen tohumların ortalama sayılarının sütun grafiği

Bazı örneklerin üçüncü tekrarı inkübatördeki yer eksikliğinden dolayı birkaç hafta sonra uygulandı. Bunun için bazı tohumların o zamana kadar değişikliklere uğramış olduğu ve bu durumun veriminde hafif bir düşüşe neden olduğu düşünülmektedir ve dolayısıyla standart sapma değerleri beklenenden daha yüksekti. Bu nedenle, ekim sırasında muhtemelen ölü tohumlar hariç tutuldu ve tohum çimlenme yüzdesi hesaplandı. Şekil 4.2'de muhtemelen ölü tohumlar çıkarıldıktan sonra her besi ortamındaki tohum çimlenme yüzdesinin sütun grafiği gösterilmektedir.

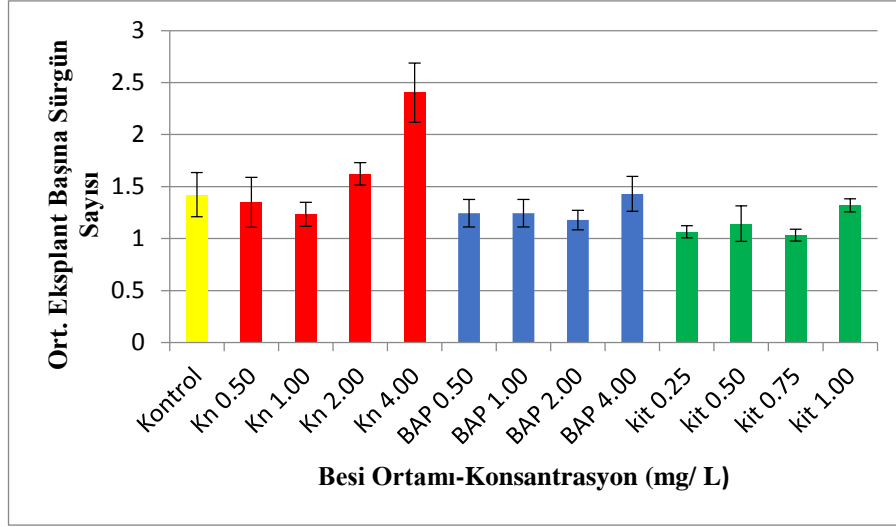
Kontrol örneğine kıyasla tohumların çimlenmesinde en fazla artış gösteren besi ortamları azalan sırayla; 1,0 mg/L kitosan (% 31,9), 2,0 mg/L kitosan (% 31,1), 0,5 mg/L kitosan (% 27,8), 4,0 mg/L kitosan (% 26,9), kinetin örnekleri ise azalan sırayla 2,0 mg/L kinetin (% 21,8), 4,0 mg/L kinetin (% 20), 0,5 mg/L ve 1,0 mg/L kinetin, ikisinde tohum çimlenmesi (% 10) oranında arttı. BAP örneklerin tohum çimlenmesini arttırmadığını gözlemlendi.



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamlarındaki tohumların çimlenme yüzdesinin sütun grafiği

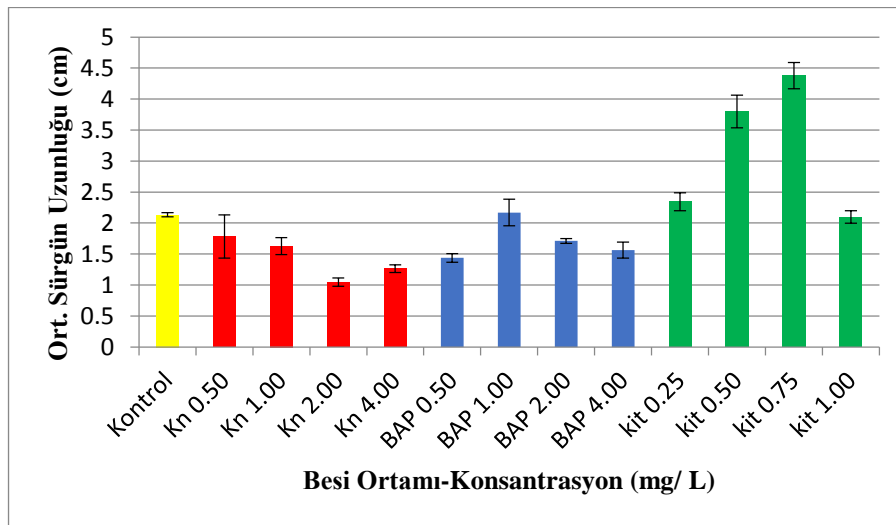
4.2. Kinetin, BAP ve Kitosanın Sürgün Sayıları ve Uzunlukları Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması

Deneyleerde kullanılan tüm besi ortamları arasında 4,0 mg/L kinetin içeren besi ortamında büyüyen eksplantlar en yüksek ortalama sürgün sayısına sahipti. Ayrıca bu konsantrasyonda büyüyen bu eksplantların sürgünleri karmaşık bir şekilde bir araya toplanıyordu (Şekil 3.9 D). Sonuçlara göre, 4,0 mg/L kinetin hariç deneyleerde kullanılan tüm besi ortamları, kontrol örneğine göre sürgün sayısında istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olmamıştır. Şekil 4.3'te kontrol ile karşılaştırılarak, farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün sayısının sütun grafiği gösterilmektedir.



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besin ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün sayısının sütun grafiği

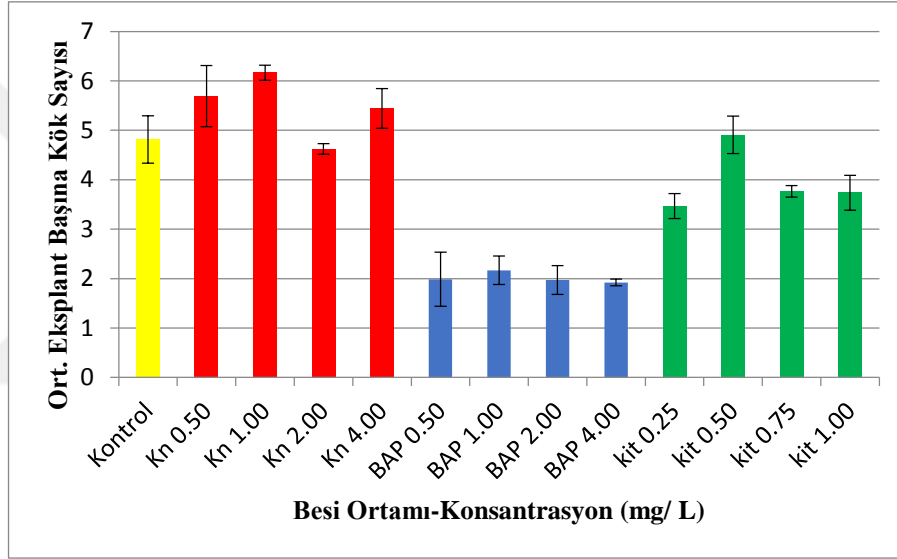
Kontrol örneğine kıyasla, 1,0 mg/L BAP hariç, kinetin ve BAP'ın tüm konsantrasyonlarında büyüyen eksplantların sürgünlerinin uzunluğunda bir azalma olurken, 0,5 ve 0,75 mg/L kitosan içeren ortamlarda da büyüyen eksplantların sürgünlerinin uzunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmuştur. Şekil 4.4'te kontrol ile karşılaştırılarak, farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besin ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün uzunluğunun sütun grafiği gösterilmektedir.



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besin ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama sürgün uzunluğunun sütun grafiği

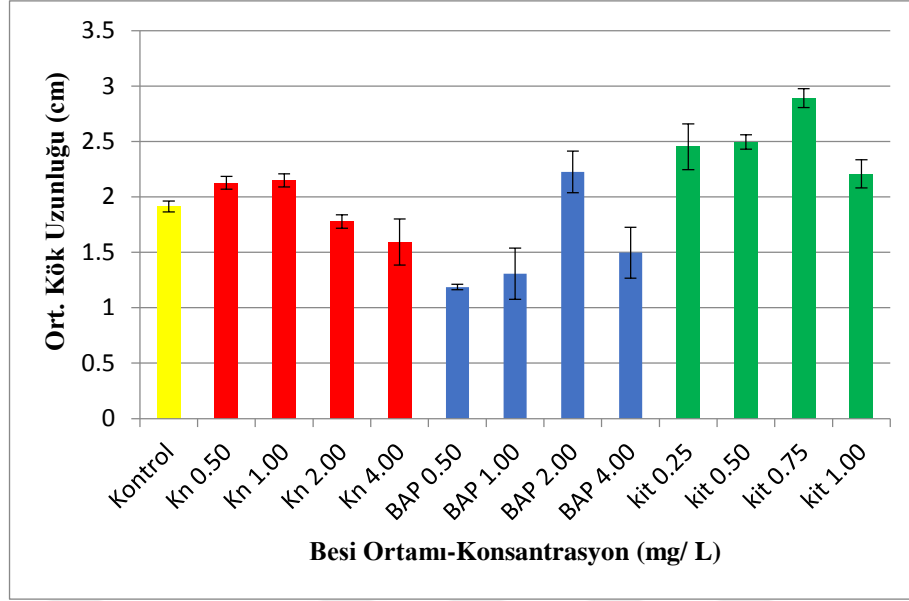
4.3. Kinetin, BAP ve Kitosanın Kök Sayıları ve Uzunlukları Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması

Kontrol örneğine göre, 0,5 ve 1,0 mg/L kinetin içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların kök sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olurken, 0,5 mg/L kitosan hariç, diğer tüm konsantrasyonlarda BAP ve kitosan içeren ortamlarda büyüyen eksplantların kök sayıları istatistiksel olarak önemli ölçüde daha düşüktür. Şekil 4.5'te kontrol ile karşılaştırılarak, farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama kök sayısının sütun grafiği gösterilmektedir.



Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama kök sayısının sütun grafiği

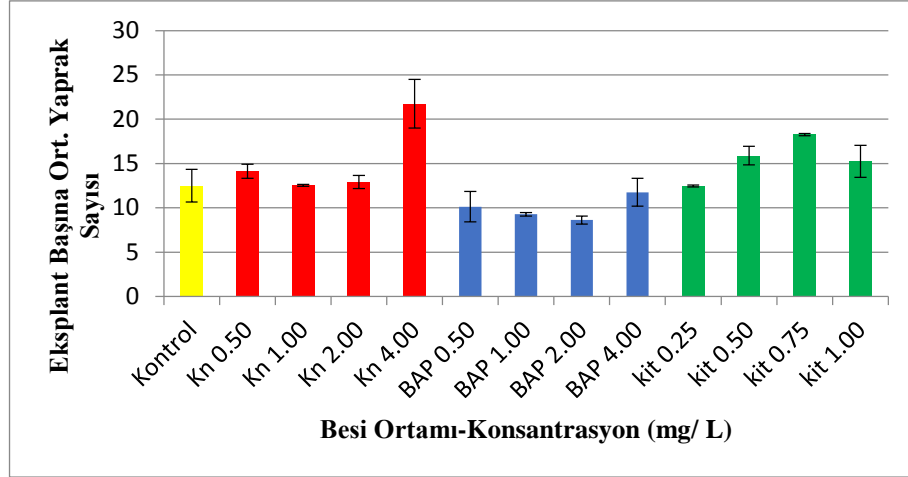
Tüm eksplantlar arasında, 0,75 mg/L kitosan içeren ortamda büyüyen eksplantlar en uzun sürgünlere sahipti, aynı zamanda bunlar tüm eksplantlar arasında en uzun köklere de sahiptiler. Kontrol örneğine kıyasla, tüm konsantrasyonlarda kitosan içeren ortamlarda büyüyen eksplantların köklerinin uzunluğu istatistiksel olarak önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca 0,5 ve 1,0 mg/L kinetin içeren ortamlarda ve 2,0 mg/L BAP içeren ortamda da artmıştır. Şekil 4.6'da kontrol ile karşılaştırılarak, farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama kök uzunluğunun sütun grafiği gösterilmektedir.



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besit ortamlarında büyüyen eksplantların ortalama kök uzunluğunun sütun grafiği

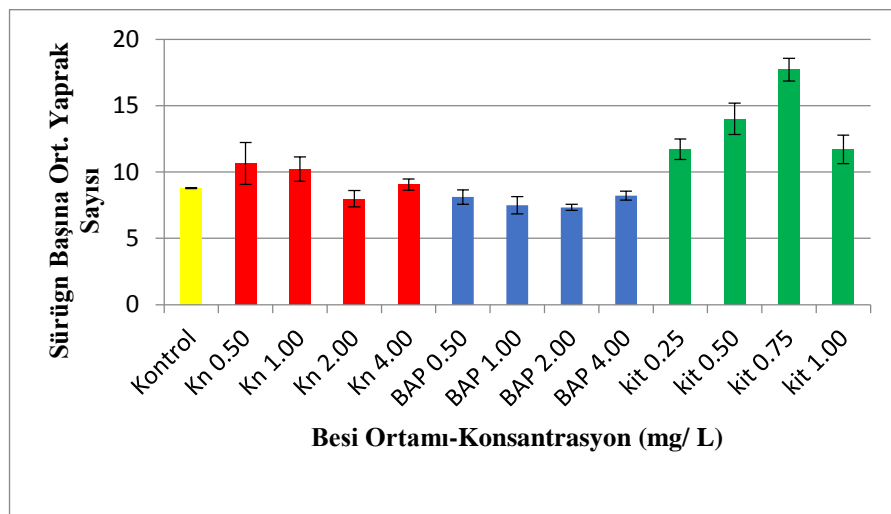
4.4. Kinetin, BAP ve Kitosanın Yaprak Sayıları Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması

Eksplant başına en yüksek ortalama yaprak sayısı 0,4 mg/L kinetin içeren ortamda büyüyen eksplantlarda gözlemlendi. Bu, bu eksplantlardaki en yüksek sürgün sayısı ile açıklanabilir. Kontrol örneğine kıyasla, eksplant başına yaprak sayısında istatistiksel olarak önemli bir artış, 0,50 ve 0,75 mg/L kitosan içeren ortamlarda büyüyen eksplantlarda da gözlemlendi. Bu da bu eksplantlardaki yüksek sürgün uzunluğu ile açıklanabilir. Şekil 4.7’de kontrol ile karşılaştırılarak, farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besit ortamlarında büyüyen eksplantların eksplant başına ortalama yaprak sayısının sütun grafiği gösterilmektedir.



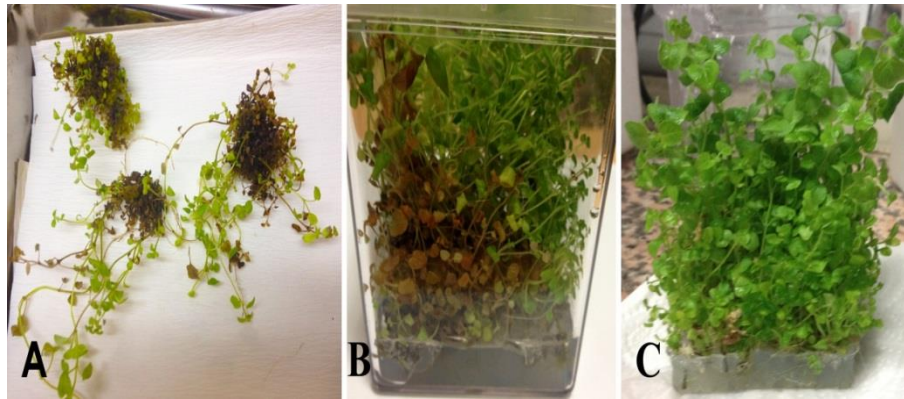
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besin ortamlarında büyüyen eksplantların eksplant başına ortalama yaprak sayısının sütun grafiği

Tüm eksplantlar arasında, 0,75 mg/L kitosan içeren ortamda büyüyen eksplantların en uzun sürgünlere, en uzun köklere ve sürgün başına en yüksek yaprak sayısına sahip olduğu gözlemlendi. Kontrol örneğine kıyasla, 0,5 mg/L kinetin içeren ortamda büyüyen eksplantlarda ve kitosanın tüm konsantrasyonlarında içeren ortamlarda büyüyen eksplantlarda, sürgün başına yaprak sayısında istatistiksel olarak önemli bir artış gözlemlendi. Şekil 4.8’de kontrol ile karşılaştırılarak, farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besin ortamlarında büyüyen eksplantların sürgün başına ortalama yaprak sayısının sütun grafiği gösterilmektedir.



Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda kinetin, BAP ve kitosan içeren besin ortamlarında büyüyen eksplantların sürgün başına ortalama yaprak sayısının sütun grafiği

Bu çalışma esas olarak *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* bitkisinin büyümesi üzerinde kitosanın uyarıcı etkilerini incelemek için yapıldı. Bu bitkinin *in vitro* çoğaltılmasının sonuçlarına göre, kullanılan tüm kitosan konsantrasyonlarının, kültür ortamına eklendiğinde *Origanum vulgare* tohumlarının çimlenme yüzdesini arttırdığı gözlemlendi. Buna ek olarak, bazı konsantrasyonlarda kitosan içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların sürgünlerinin uzunluğu, köklerinin sayısı ve uzunluğu ve yaprak sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Bu sonuçlar, kitosanın, *Origanum vulgare* bitkisinin büyümesini uyarabilen ve bitki büyüme düzenleyicilerine iyi ve daha güvenli doğal bir alternatif olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca, kinetin veya BAP içeren ortamlarda büyüyen eksplantlara kıyasla, kitosan içeren ortamlarda büyüyen eksplantlar kontaminasyona karşı daha fazla direnç gösterdiler. Bu, üç şekilde açıklanabilir; birincisi, kitosanın anti-fungal ve antimikrobiyal aktiviteleri kontaminasyonu engellemiş olabilir, ikincisi, kitosanın *Origanum vulgare* esansiyel yağının konsantrasyonunu ya da yağın antimikrobiyal aktivitesini arttırmıştır, ya da bitkinin bağışıklık sistemini ve savunma genlerini uyarılmış olabilir ve bu açıklamaların hepsinden veya daha fazla nedenlerden kaynaklı olabilir. Ek olarak, kinetin veya BAP içeren ortamlarda büyüyen bitkilerin yaprakları, uzun bir inkübasyon döneminden sonra, büyük olasılıkla bitkilerde ve kültür ortamındaki oksidan ve ikincil metabolitlerin birikmesinden dolayı, sarı veya kahverengi olmaya başladılar. Öte yandan kitosan içeren ortamda büyüyen bitkiler daha uzun süre taze ve yeşil kaldı. Bu sonuç, kitosanın antioksidan aktivitesinin bitkinin raf ömrünü uzattığını onaylar. Şekil 4.9'da Kinetin, BAP ve kitosan içeren ortamlarda iki aylık inkübasyonun sonunda bitkilerin görünümü gösterilmektedir.



Şekil 4.9. (A) Kinetin, (B) BAP ve (C) kitosan içeren ortamlarda iki aylık inkübasyonun sonunda bitkilerin görünümü

FT-IR spektroskopisinin sonuçlarına bağı olarak, kitosan içeren ortamlarda büyüyen eksplantlarda bazı esansiyel yağ bileşenlerinin konsantrasyonlarında büyük oranda bir artış olmuştur. Ancak FT-IR spektrumları oldukça karmaşık olduğu ve lipitler, karbonhidratlar ve proteinler gibi birçok molekülden kaynaklı değişik bantlar içerdiği için, bir bantın birçok fonksiyonel grubu temsil eder. Bu nedenle bazı bantların absorbansında gözlenen artışın, bitkinin esansiyel yağlarındaki artışın bir sonucu olarak kesin olarak tespit edilmez, çünkü aynı zamanda bu bantların bölgesine ait olan herhangi bir başka moleküldeki bir artışından kaynaklı olabilir. Kitosanın *Origanum vulgare* bitkisinin esansiyel yağları üzerindeki etkileri hakkında daha fazla bilgi elde etmek için, ilerdeki çalışmalarda Gaz Kromatografisi (GC), Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS), Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) gibi farklı teknikler kullanılarak bitkinin esansiyel yağı içerikleri ve konsantrasyonları hakkında daha ayrıntılı bilgi ve daha hassas ölçüm sağlanabilir. Ayrıca, *Origanum vulgare* esansiyel yağ bileşiklerinin biyosentezi hakkında henüz sınırlı bilgi mevcut olması, daha etkin ve hedefli bir yetiştirme programı oluşturulması için yararlı olacaktır.

Son olarak, yapılan gözlemlerde 4,0 mg/L kinetin içeren besi ortamlarında büyüyen eksplantların sürgünlerinin karmaşık bir şekilde bir araya toplandığı ve bu eksplantlarda kallus oluşumu gözlemlendi (Şekil 3.7 D). *Origanum vulgare* bitkisinin 4,0 mg/L kinetin ile muamele edildiğinde karmaşık agregasyonları oluşturma eğiliminin nedenlerini anlamak için daha fazla çalışmalar yapılabilir.

KAYNAKLAR

Acemi A., Farklı Konsantrasyonlardaki Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Amsonia orientalis Decne. Apocynaceae' in Doku Kültürü ile Çoğaltılmasına olan Etkilerinin Araştırması, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2011, 301645.

Adam K., Sivropoulos A., Kookini S., Lanaras T., Antifungal activities of *Origanum Vulgare* subs. hirtum, mentha spicata, lavandula angustifolia and salvia fruticosa essentials oils against human pathogenic fungi, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, **46**, 1739- 1745.

Akıllı M., Ratlarda pentaklorofenol zehirlenmesinde *Origanum vulgare* yağının oksidatif stres üzerine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji (Veterinerlik) Anabilim Dalı, 2014, 390851.

Altunayar Ç., Sterol – Lipit Etkileşiminin Spektroskopik ve Kalorimetrik Tekniklerle İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012, 315612.

Amborabé B.E., Bonmort J., Fleurat-Lessard P., Roblin G., Early events induced by chitosan on plant cells. *J. Exp. Bot.* 2008, **59**, 2317–2324.

Aydin S., Ozturk Y., Başer K. H. C., Ethno pharmacological investigations on *Origanum onites* L. growing in the Aegean region, *10th Symposium on Plant Drugs*, Izmir, Turkey, 20-22 May 1993.

Babacan O., Cengiz S., Akan M., Oregano bitkisinin bazı Salmonella serotipleri üzerine antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesi, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, DOI: 10.1501/Vetfak_0000002510.

Badawya M.E.I., Rabea E.I., Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 2009, **51**, 110–117.

Baker MJ, Trevisan J, Bassan P. ve diğ., Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature protocols*, 2014, **9**(8): 1771-1791.

Bakis Y., Babac M.T., Uslu E., Updates and improvements of Turkish Plants Data Service (TÜBİVES), http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=7885 (Ziyaret Tarihi: 19 Şubat 2018).

Bampidis V.A., Christodoulou V., Florou-Paneri P., Christaki E., Chatzopoulou P.S., Tsiligianni T. ve Spais A.B., Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys, *British Poultry Science*, 2005, **46** (5), 595-601.

Baricevic D., Bartol T., The biological/pharmacological activity of the *Origanum* Genus, Editors: Kintzios S. E., *Oregano: the genera Origanum and Lippia*, Taylor & Francis, London, 177-201, 2002.

Barreto TA., Andrade SC., Maciel JF, Arcanjo NM., Madruga MS., Meireles B., Cordeiro ÂM., Souza EL., Magnani M., A Chitosan Coating Containing Essential Oil from *Origanum vulgare* L. to Control Postharvest Mold Infections and Keep the Quality of Cherry Tomato Fruit. *Frontiers in Microbiology*, DOI: 10.3389/fmicb.2016.01724.

Başer K.H.C., Duman H., Composition of the essential oils of *Origanum boissieri* Ietswaart and *O. bargyli* Mouterde, *Journal of Essential Oil Research*, DOI: 10.1080/10412905.1998.9700841.

Başer K.H.C., Özek T., Tümen G., Essential oil of *Origanum rotundifolium* Boiss, *Journal of Essential Oil Research*, DOI: org/10.1080/10412905.1995.9698474.

Başer K.H.C., *The Turkish Origanum species*, Editors: Kintzios S. E., *Oregano: the genera Origanum and Lippia*, Taylor & Francis, London, 109-122, 2002.

Başer K.H.C., Essential oils from aromatic plants which are used as herbal tea in Turkey, *Proceedings of the 13th International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils*, Istanbul, Turkey, 15–19 October 1995, AREP Publ., AREP Publ., Istanbul, 67–79.

Başer K. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils, *Current Pharmaceutical Design*, 2008, **14**(29), 3106-3119.

Baydar H., Sagdic O., Özkan G., Karadogan T., Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey, *Food Control*, 2004, **15**, 169-172.

Baytop T., *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Geçmiste ve Bugün* (Therapy with Medicinal Plants in Turkey, Past and Present), Nobel Tıp Kitabevleri, Istanbul, 1999.

Baytop T., Başer K.H.C., On essential oils and aromatic waters used as medicine in Istanbul between 17th and 19th centuries, *Proceedings of the 13th International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils*, Istanbul, 15–19 October 1995, AREP Publ., Istanbul, 2, 99–107.

Benito M., Jorro G., Morales C., Pelaez, A., Fernandez A., Labiatae allergy: systemic reactions due to ingestion of oregano and thyme, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 1996, **76**(5), 416-418.

Bhaskara Reddy M.V., Belkacemi K., Corcuff R., Castaigne F., Arul J., Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit, *Postharvest Biology and Technology*, 2000, **20**(1), 39-51.

Bosabalidis A. M., Structural features of *Origanum* sp., Editors: Kintzios S. E., *Oregano: the genera Origanum and Lippia*, Taylor & Francis, London, 11-58, 2002.

Bouhdid S., Skali S.N., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Amensour M., Abrini J., Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil, *Afr. J. Biotechnology*, 2008, **7**, 1563-1570.

Chaudhry N.M.A., Saeed S., Tariq P., Antibacterial effects of oregano (*Origanum vulgare*) against gram negative bacilli, *Pakistan Journal of Botany*, 2007, **39** (2), 609-613.

Choi C.; Nam J.P.; Nah, J.W., Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials, *J. Ind. Eng. Chem.* 2016, **33**, 1–10.

Chookhongkha N., Miyagawa S., Jirakiattikul Y., Photchanachai S., Chiligrwth and seed productivity as affected by chitosan. *International Conference on Agriculture Technology and Food Sciences*, ICATFS, Nov. 17–18, 2012, 146–149

Coelho da Costa A., Cavalcanti dos Santos B. E., Santos F. L., Lima E. O., Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial patients, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, DOI: org/10.1590/S0102-695X2009000200010.

Czechowska-Biskup R., Jarosińska D., Rokita B., Ułański P., Rosiak J. M., Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparison of methods, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 2012, XVII, 5-20.

Çelen S., Türkiye’ de yayılış gösteren dört *Thymus* türünün uçucu yağ bileşimleri, antibakteriyel ve antifungal aktivite özelliklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, 2006, 177979.

Dadalioglu I., Evrendilek G. A., Chemical composition and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 2004, **52**, 8255-8260.

Davis P.H., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 7, Edinburgh University Press, Edinburgh, 1982.

De Falco E., Mancini E., Roscigno G., Mignola E., Tagliatela-Scafati O., Senatore F., Chemical composition and biological activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* L. under different growth conditions, *Molecules*, 2013, **18**, 14948-14960.

De Souza G.T., de Carvalho R.J., de Sousa J.P., Tavares J.F., Schaffner D., de Souza E.L., Magnani M., Effects of the Essential Oil from *Origanum vulgare* L. on Survival of Pathogenic Bacteria and Starter Lactic Acid Bacteria in Semihard Cheese Broth and Slurry. *J Food Prot.*, DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-15-172.

Demir A., Seventekin N., Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları, *Electronic Journal of Textile Technologies*, 2009, **3**(2), 92-103.

Desikan R., A-H-Macherness S., Hancock JT., Neill SJ., Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress, *Plant physiology*, 2001, **127**(1), 159-72.

Doares S. H., Syrovets T., Weiler E. W., Ryan C. A., Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, **92**(10), 4095-4098.

Doğan S., Arslan, O., Özen, F., Polyphenol Oxidase Activity of Oregano at Different Stages, *Food Chemistry*, 2005, **91**, 341-345.

Dos Santos N.S., Athayde Aguiar A.J., de Oliveira C.E., Veríssimo de Sales C., de Melo E. Silva S., Sousa da Silva R., Stamford T.C., de Souza E.L., Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.), *Food Microbiology*, DOI: org/10.1016/j.fm.2012.07.014.

Dragoeva A. P., Koleva N. P., Nanova Z. D., Kaseneva M. Z., Allelopathy of cold water extract from *Origanum vulgare* spp. *vulgare* L, *Natural of Agricultural Chemistry and Environment*, 2014, **3**(4),144-150.

El-Miniawy S., Ragab M., Youssef S., Metwally A., Response of strawberry plants to foliar spraying of chitosan, *Research Journal of Agriculture & Biological Sciences*, 2013, **9**(6), 366-372.

Faoro F., Iriti M., Callose synthesis as a tool to screen chitosan efficacy in inducing plant resistance to pathogens. *Caryologia* 2007, **60**, 121–124.

Ferri M., Dipalo S.C.F., Bagni N., Tassoni A., Chitosan elicits mono-glucosylated stilbene production and release in fed-batch bio reactor cultures of grape cells. *Food Chem.*, 2011, **124**, 1473–1479.

Ferri M., Tassoni A., Chitosan as elicitor of health beneficial secondary metabolites in in vitro plant cell cultures, *Handbook of Chitosan Research and Applications*, Mackay, R.G., Tait, J.M., Eds.: Nova Science Publishers Inc.: Hauppauge, NY, USA, 2011, 389–414.

Ferri M., Tassoni A., Franceschetti M., Righetti L., Naldrett M. J., Bagni N. Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics*, 2009, **9**, 610–624.

Franz C., Başer K.H.C., Windisch W., Essential oils and aromatic plants in animal feeding, a European perspective. A Review, *Flavour and Fragrance Journal*, 2010, **25**(5), 327-340.

García-Rincóna J., Vega-Pérez J., Guerra-Sánchez M.G., Hernández-Lauzardo A.N., Peña-Díaz A., Velázquez-Del Valle M.G., Effect of chitosan on growth and plasma membrane properties of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Pestic. Biochem. Phys.* 2010, **97**, 275–278.

Geisberger G., Gyenge E.B., Hinger D., Käch A., Maake C., Patzke G.R., Chitosan-thioglycolic acid as a versatile antimicrobial agent. *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 1010–1017.

Gill C., Herbs and plant extracts as growth enhancers. *Feed Int.*, 1999, **20** (4), 20-23.

Górnik K., Grzesik M., Romanowska-Duda B., The effect of chitosan on rooting of grapevine cuttings and on subsequent plant growth under drought and temperature stress, *Journal of Fruit Ornamental Plant Research*, 2008, **16**, 333-343.

Hadwiger L.A., Pea-Fusarium solani interactions contributions of a system toward understanding disease resistance. *Phytopathology*, 2008, **98**, 372–379.

Hamed I., Ozogu F., Regenstein, J.M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2016, **48**, 40–50.

Hamel L.-P., Beaudoin N., Chitooligosaccharide sensing and downstream signaling: Contrasted outcomes in pathogenic and beneficial plant-microbe interactions. *Planta* 2010, **232**, 787–806.

Harisha S., *Biotechnology Procedures and Experiments Handbook*, Infinity Science Press LLC, New Delhi, 2007.

Hembach L., Cord-Landwehr S., Moerschbacher B. M., Enzymatic production of all fourteen partially acetylated chitosan tetramers using different chitin deacetylases acting in forward or reverse mode, *Scientific Reports*, 2017, **7**(1), 17950-17956.

Hewajulige I.G.N., Wilson Wijeratnam R.S., Perera M.G.D.S., Fernando S.A., Extending storage life of commercially important tropical fruits using bio-waxes. *Acta Horticult.*, 2015, **1091**, 283–290.

Hristova R., Ristic M., Brkic D., Stefkov G., Kulevanova S., Comparative analysis of essential oil composition of *Origanum vulgare* from Macedonia and commercially available *Origanum herba*, *Acta Pharmaceutica*, 1999, **49**, 299-305.

Ietswaart J.H., *A taxonomic revision of the genus Origanum (Labiatae)*, 1st ed, Leiden Univ. Press, The Hague, 1980.

Illum L., Davis S., Polysaccharides. Structural Diversity and Functional Versatility, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, USA, 2005.

Iriti M., Faoro F., Abscisic acid mediates the chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV). *Plant Physiol. Biochem.* 2008, **46**, 1106–1111.

Iriti M., Faoro F., Chitosan as a MAMP searching for a PRR. *Plant Signal. Behav.* 2009, **4**, 66–68.

Iriti M., Varoni E.M., Chitosan-induced antiviral activity and innate immunity in plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015, **22**, 2935–2944.

Kaku H., Nishizawa Y., Ishii-Minami N., Akimoto-Tomiyama C., Dohmae N., Takio K., Minami E., Shibuya N., Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, **103**(10), 11086-11091.

Kamel KM., Khalil IA., Rateb ME., Elgendy H., Elhawary S., Chitosan-Coated Cinnamon/ Oregano-Loaded Solid Lipid Nanoparticles to Augment 5-Fluorouracil Cytotoxicity for Colorectal Cancer: Extract Standardization, Nanoparticle Optimization, and Cytotoxicity Evaluation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03093.

Kananont N., Pichyangkura R., Chanprame S., Chadchawan S., Limpanavech P., Chitosan specificity for the in vitro seed germination of two Dendrobium orchids (Asparagales: Orchidaceae). *Sci. Hortic.* 2010, **124**, 239–247.

Kardas I., Struszczyk M.H., Kucharska M., van den Broek L.A.M., van Dam J.E.G., Ciechańska D., Chitin and chitosan as functional biopolymers for industrial applications. Ed.; Springer-Verlag: Wien, *The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE). Research Initiatives and Results*, Narvard. P., Austria, 2012, 329–374.

Karousou R., Taxonomic studies on the Cretan Labiatae: Distribution, morphology and essential oils, PhD Thesis, University of Thessaloniki, Thessaloniki, 1995.

Kauss H., Jeblick W., Domard A., The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*, *Planta*, 1989, **178**(3), 385- 392.

Kerch G., Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2015, **46**, 159–166.

Kerch G., Sabovics M., Kruma Z., Kampuse S., Straumite E., Effect of chitosan and chitoooligosaccharide on vitamin C and polyphenols contents in cherries and strawberries during refrigerated storage. *Eur. Food Res. Technol.*, 2011, **233**, 351–358.

Khor E., Chitin: A biomaterial in waiting, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2002, **6**(4), 313-317.

Kim H., Chen F., Wang X., Rajapakse N.C. Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2005, **53**, 3696–3701.

Kokkini S., Vokou D., Karousou R., Morphological and chemical variation of *Origanum vulgare* L. in Greece, *Botanica Chronica*, 1991, **10**, 337-346.

Kokkini S., *Taxonomy, Diversity and Distribution of Origanum species*. Editors: Padulosi S., Oregano, IPGRI, Rome, 2–12, 1997.

Kordali Ş., Çakır A., Akcin T.A., Mete E., Akcin A., Aydın T., Kılıç, H., Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor and *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae), *Industrial Crops and Products*, 2009, **29**, 562-570.

Koyucu E., Mersin ilinden toplanan *Origanum vulgare*'nin biyoherbisidal aktivitesinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Mersin, 2014, 411412.

Lambert R. J., Skandamis P. N., Coote, P. J., Nychas G. J. E., Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol, and carvacrol, *Journal of Applied Microbiology*, 2001, **91**(3), 453-462.

Li T., Jiang Y., Li J., Hu W., An Investigation on Quality of Japanese Sea Bass (*Lateolabrax japonicus*) Using Chitosan Assisted with *Origanum vulgare* Oil and Allicin, *Food Processing and Preservation*, 2016, **41**(3), 1745-4549.

Liang C., Yuan F., Liu F., Wang Y., Gao Y., Structure and antimicrobial mechanism of "-polylysine-chitosan conjugates through Maillard reaction. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2014, **70**, 427–434.

Lindon, J.C., Tranter, G.E., Holmes, J.L., *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Academic Press, San Diego, 2000, CA, 2581p.

Liu J., Tian S., Meng X., Xu Y., Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 2007, **44**, 300–306.

Liu X.F., Guan Y.L., Yang D.Z., Li Z., Yao K.D., Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* 2001, **79**, 1324–1335.

Mahdavi B., Seed germination and growth responses of Isabgol (*Plantago ovata* Forsk) to chitosan and salinity. *Intl. J. Agric. Crop Sci.*, 2013, **5**, 1084–1088.

Malerba M. and Cerana R., Chitosan effects on plant systems, *Int. J. Mol. Sci.* 2016, **17**, 996.

Malerba M., Cerana R., Crosti P., Defense/stress responses activated by chitosan in sycamore cultured cells. *Protoplasma* 2011, **249**, 89–98.

Malerba M., Cerana R., Reactive oxygen and nitrogen species in defense/stress responses activated by chitosan in sycamore cultured cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, **16**, 3019–3034.

Mi F.L.; Lin Y.M.; Wu Y.B.; Shyu S.S.; Tsai Y.H., Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug-delivery system: Phase-separation, degradation and release behavior, *Biomaterials*, 2002, **23**(15), 3257-3267.

Mondal M.M.A., Malek M.A., Puteh A.B., Ismail M.R., Ashrafuzzaman M., Naher L., Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra, *Australian Journal of Crop Science*, 2012, **6**(5) 918-921.

Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiolgia Plantarum*, 1962, **15**(3), 473-497.

Netolitzky F., *Die Pflanzenhaare*, Editors: Linsbauer K., Handbuch der Pflanzenanatomie, Gebr. Bornträger Vlg., Berlin, 1932.

Novo J. M., Iriel A., Claudia M. M., Gabriela L. M., Spectroscopy, microscopy and fluorescence imaging of *Origanum vulgare* L. basis for nondestructive quality assessment. *Photochemical Photobiology*, 2013, **89**(6), 1383-90.

Nwe N., Furuike T., Tamura H., Production, Properties and Applications of Fungal Cell Wall Polysaccharides: Chitosan and Glucan, *Advances in Polymer Science*, 2011, **244**(1), 187-207.

Olivier G.W., *The world market of oregano*, Editors: Padulosi S., Oregano, Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, Rome, 142–146, 1997.

Orlita A., Sidwa-Gorycka M., Paszkiewicz M., Malinski E., Kumirska J., Siedlecka E.M., Application of chitin and chitosan as elicitors of coumarins and fluoroquinolone alkaloids in *Ruta graveolens* L. (common rue). *Biotech. Appl. Biochem.* 2008, **51**, 91–96.

Paparella A, Mazzarrino G, Chaves-López C, Rossi C, Sacchetti G, Guerrieri O, Serio A., Chitosan boosts the antimicrobial activity of *Origanum vulgare* essential oil in modified atmosphere packaged pork. *Food Microbial*, DOI: 10.1016/j.fm.2016.05.007.

Patil R. S., Ghormade V., Deshpande M. V., Chitinolytic enzymes: An exploration, *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, **26**(7), 473-483.

Pelissari F.M., Grossmann MV. Yamashita F., Pineda EA. Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, **57**(16), 7499-7504.

Pichyangkura R., Chadchawan S., Biostimulant activity of chitosan in horticulture, *Scienria Horticulturae*, 2015, **196**, 49-65.

Ravi Kumar M. N. V. ve diğ., Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives, *Chemical Reviews*, 2004, **104** (12), 6017–6084, DOI:10.1021/cr030441b.

Rhayour K., Bouchikhi T., Tantaoui-Elaraki A., Sendide K., Remmal A., The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components, *Journal of Essential Oil Research*, 2003, **15**(3), 286-292.

Rinaudo M., Chitin and chitosan: properties and applications, *Progress in Polymer Science*, 2006, **31**(7), 603–632.

Roland H., Preface to the series, Editors: Kintzios S. E., *Oregano: the genera Origanum and Lippia*, Taylor & Francis, London, ix-x, 2002.

Salachna P., Zawadzińska A., Effect of chitosan on plant growth, flowering and corms yield of potted freesia. *J. Ecol. Eng*, 2014, **15** (3).

Saraç N., Uğur A., Duru M. E., Varol Ö., Antimicrobial activity, antioxidant activity and chemical composition of *Origanum onites* L. and *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart from Mugla (Turkey), ISHS, DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.826.56.

Simon J. E., Chadwick A. F., Craker L. E., Herbs: An Indexed Bibliography 1971–1980. The Scientific Literature on Selected Herbs and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone. Archon Books, Hamden, CT., 1984.

Skoula M., Harborne J. B., The taxonomy and chemistry of *Origanum*, Editors: Kintzios S. E., *Oregano: the genera Origanum and Lippia*, Taylor & Francis, London, 66-103, 2002.

Souza E. L., Stamford T. L. M., Lima E. O., Trajano V. N., Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts, *Food Control*, 2007, **18**(5), 409-413.

Şahin F., Gulluce M., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M., Agar G., Ozer H., Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey, *Food Control*, 2004, **15**, 549-557.

Şahin, İ., Melatonin'in Model Ve Biyolojik Membranlarla Etkileşmesinin Fiziksel Yöntemlerle İncelenmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009.

Temel M., Tokur S., *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) Alttürlerinin Karşılaştırmalı Anatomisi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2014, **30**(3), 150-155.

Tkachenko K. G, Tkachev A. V, Koroljuk E. A, Component composition of essential oil from *Origanum vulgare* L, grown in Leningrad region, *Rastitel'nye Resursy*, 2002, **38**, 97–101.

Tommasi L., Negro C., Miceli A., Mazzotta F., Antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants grown in the Mediterranean area, *Journal of Essential Oil Research*, 2009, **21**(2), 185-189.

Tümen G., Başer K.H.C., Kirimer N. and Ozek T., Essential oil of *Origanum saccatum* P.H. Davis, *Journal of Essential Oil Research*, 1995, **7**(2), 175–176.

Türker S., Dogan M, Severcan F., The characterization and differentiation of higher plants by fourier transform infrared spectroscopy, *Applied spectroscopy*, 2007, **61**(3):300-308. DOI: 10.1366/000370207780220903.

Türker S., Molecular Investigation of PTZ-Induced Epileptic Activities in Rat Brain Cell Membranes and The Effects of Vigabatrin, Doktora tezi, MİTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2009, 255103.

Van S.N., Minh H.D., Anh D.N., Study on chitosan nanoparticles on biophysical characteristics and growth of Robusta coffee in green house. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 2013, **2**, 289–294.

Vardar-Ünlü G., Ünlü M., Dönmez E., Vural N., Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Origanum minutiflorum* O Schwarz & PH Davis, *Journal of Science Food Agriculture*, 2007, **87**, 255-259.

Vasil' ev L. A., Dzyubinskaya E. V., Zinovkin R. A., Kiselevsky D. B., Lobysheva N. V., Samuilov V. D., Chitosan-induced programmed cell death in plants. *Biochemistry*, 2009, **74**, 1035–1043.

Venter J. P., Kotze A. F, Auzely-Velty R., Rinaudo M., Synthesis and evaluation of the mucoadhesivity of a CD-chitosan derivative, *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, **313**(1), 36-42.

Vishu K.A.B., Varadaraj M.C., Gowda L.R., Tharanathan R.N., Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 2005, **391**, 167–175.

Vituro C. I., Molina A.C., Villa W.C., Heit C. I., Characterization of *Origanum* Species Grown in Quebrada de Humahuaca, Jujuy, Argentina, through the Study of the Essential Oils, *Molecular Medicinal Chemistry*, 2010, **21**, 73-79.

Vokou D., Kokkini S., Bessiere J. M., Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochemical. Systematics and Ecology*, 1993, **21**(2), 287- 295.

Vokou D., Kokkini S., Bessiere J. M, *Origanum onites* (Lamiaceae) in Greece: Distribution, volatile oil yield, and composition. *Economic Botany*, 1988, **42**(3), 407-412.

Walker-Simmons M., Hadwiger L., Ryan C. A., Chitosans and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the antifungal phytoalexin pisatin in pea pods and antinutrient proteinase inhibitors in tomato leaves, *Biochemical and Biophysical research Communications*, 1983, **110**(1), 194-199.

Wang W. X., Li S. G., Zhao X. M., Du Y. G., Lin B. C., Oligochitosan induces cell death and hydrogen peroxide accumulation in tobacco suspension cells. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2008, **90**, 106–113.

Werker E., Putievsky E., Ravid U., The essential oils and glandular hairs in different chemotypes of *Origanum vulgare* L, *Annals of Botany*, 1985, **55**(6), 793-801.

Xing K., Chen X.G., Liu C.S., Cha D.S., Park H.J., Oleoyl-chitosan nanoparticles inhibits *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by damaging the cell membrane and putative binding to extracellular or intracellular targets. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, **132**, 127–133.

Yang Yen, Basics of Plant Tissue Culture, Plant & Soil Sciences eLibrary, <http://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationmodule=956783940&topicorder=1&maxto=10&minto=1> (Ziyaret Tarihi: 1 Şubat 2018).

Yin H., Frette X. C., Christensen L. P., Grevsen K., Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*), *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2012, 60(1), 136-143.

Yin H., Zhao X., Bai X., Du Y., Molecular cloning and characterization of a *Brassica napus* L. MAP kinase involved in oligochitosan-induced defense signaling. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2010, **28**, 2292–2301.

Yin H., Zhao X. M., Du Y. G., Oligochitosan: A plant diseases vaccine, A review. *Carbohydr. Polym.* 2010, **82**, 1–8.

Younes I., Rinaudo M., Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications, *Mar Drugs*, 2015, **13**(3), 1133-1174.

Zhang H., Zhao X., Yang J., Yin H., Wang W., Lu H., Du Y., Nitric oxide production and its functional link with OIPK in tobacco defense response elicited by chitooligosaccharide, *Plant Cell Reports*, DOI: 10.1007/s00299-011-1024-z.

Zhao X., She X., Du Y., Liang X., Induction of antiviral resistance and stimulatory effect by oligochitosan in tobacco. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, DOI: 10.1016/j.pestbp-2006.06.006.

Ziani K., Ursúa B., Maté J.I., Application of bioactive coatings based on chitosan for artichoke seed protection. *Crop Prot.*, 2010, **29**, 853–859.

Zuppini A., Baldan B., Millioni R., Favaron F., Navazio L., Mariani P., Chitosan induces Ca²⁺ mediated programmed cell death in soybean cells. *New Phytol.* 2003, **161**, 557–568.

URL-1: Marjoram, Oregano, The Scotts Mirace-Gro Company. <https://www.lovethegarden.com/plant-finder/herbs/marjoram-oregano> (Ziyaret Tarihi: 10 Mart 2017).

URL-2: The National Data and Information Center on the Swiss Flora. Info flora, *Origanum vulgare* L., 22 July 2007. <https://www.infoflora.ch/en/flora/Origanum-vulgare.html> (Ziyaret Tarihi: 10 Mart 2017).

URL-3: *Origanum vulgare* subsp *vulgare*. http://www.apatita.com/herbario/Labiatae/Origanum_vulgare_subsp_vulgare.html (Ziyaret Tarihi: 18 Mart 2017).

UR- 4: The Basic Working Principle of a Spectrometer. <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=13364> (Ziyaret Tarihi: 20 Mayıs 2018).

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Özen F., **Premi N.**, Acemi A., The stimulant effect of chitosan on *in vitro* propagation of *Origanum vulgare*, in comparison with some plant growth regulators. *International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species*, Antalya, 3-5 April 2017.



ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında doğdu. 2008 yılında Ürdün'deki bulunan Elzehra lisesinden mezun oldu ve Ürdün Üniversitesi Fen Fakültesi Tıbbi Analizler Bölümü'nde lisans eğitimini başladı. 2012 yılında Ürdündeki Elmedinâ Eltabbiyâ (Tıbbi Şehir) Hastanesi'nde staj yaptı. 2013 yılında Ürdün Üniversitesi Hastanesi Tüp Bebek (IVF) laboratuvarında staj yaptı ve tıbbi laboratuvar teknoloğu olarak mezun oldu. Aynı yılda Kocaeli Üniversitesi TÖMER'de Türkçe eğitimine başladı ve 2014 yılında Türk dilinde C1 sertifikası aldı. 2015 yılında, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini başladı. 2016 yılında Erasmus+ değişim programı kapsamında İngiltere'deki bulunan Chester Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde bir proje üzerinde çalıştı. 2018 yılında Yüksek Lisans eğitimini tamamladı.