

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEKİK (*Thymus vulgaris* L.) BİTKİSİNİN *İN VİTRO* DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMLERİYLE
MİKROÇOĞALTIMI VE TEK AŞAMALI
DONDURMA YÖNTEMLERİYLE
KRİYOPREZERVASYONU

ERGUN KAYA

DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2011

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEKİK (*Thymus vulgaris* L.) BİTKİSİNİN *İN VİTRO* DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMLERİYLE
MİKROÇOĞALTIMI ve TEK AŞAMALI
DONDURMA YÖNTEMLERİYLE
KRİYOPREZERVASYONU

Ergun KAYA

DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tamer YAĞCI

GEBZE

2011



**GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ
ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...30.05.2011... tarih ve ...2011./...18... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından ...06...../07...../2011... tarihinde tez savunma sınavı yapılan Ergun Kaya'nın tez çalışması Malikiler..Biyoloji...ve...Genetik..Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Tamer Yağcı

ÜYE

: Prof. Dr. Şule Arı

ÜYE

: Doç. Dr. A. Filiz Gürel

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Saliha İşsever Öztürk

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Yelda Özden

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: KEKİK (*Thymus vulgaris* L.) BİTKİSİNİN *İN VİTRO* DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMLERİYLE MİKROÇOĞALTIMI VE TEK AŞAMALI DONDURMA YÖNTEMLERİYLE KRİYOPREZERVASYONU.

YAZAR ADI : ERGUN KAYA

Üç farklı *Thymus* türüne ait (*T. vulgaris*, *T. longicaulis*, *T. cariensis*) bitkilerinden alınan eksplantların mikroçoğaltımı için etkin bir protokol geliştirildi. *In vitro* sürgün gelişimi için farklı derişimlerde çeşitli sitokinler (6-benziladenin, kinetin, thidiazuron) denendi, en elverişli bulunan sitokinin çeşidi ve derişimi daha sonra oksinler ve/veya gibberelik asit ve gümüş nitrat ile kombine edilerek kullanıldı. En iyi sonuç 1 mg l⁻¹ kinetin ve 0,3 mg l⁻¹ gibberellik asit içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edildi. Gövdelerin köklendirilmesi, yeterli uzunluğa ulaşan gövdelerin bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen veya çeşitli derişimlerde oksinleri içeren (2,4-diklorofenoksiasetik asit, indol asetik asit, indol butirik asit, naftalen asetik asit) yarı-katı MS besiyerlerine transfer edilmesi yoluyla gerçekleştirildi. Köklenmenin en uygun olduğu besiyeri kompozisyonu 0.05 mg l⁻¹ 2,4-diklorofenoksiasetik asit içeren yarı-katı MS besiyeri olarak belirlendi. Köklenmenin ardından bitkicikler 250 ml plastik saksılara aktarılıp periyodik olarak havalandırılarak başarılı bir şekilde iklimlendirildi. Ayrıca, optimize edilen *in vitro* çoğaltım yönteminin, bitkilerin genetik kararlılığı üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla, tek bir tohumun çimlendirilmesiyle elde edilen fideden alınan yaprak örnekleri ile bu fideden alınan gövde uçlarının çoğaltılması yoluyla elde edilen bitkiciklerden 2., 4., 6., 8. ve 10. alt kültür periyotlarını takiben alınan yaprak örneklerinden genomik DNA' lar izole edildi ve RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) tekniği ile olası genetik değişiklikler incelendi.

Orta dereceli saklama yönteminin geliştirilmesi amacıyla, optimize edilen yöntemle *in vitro* olarak çoğaltılan *T. vulgaris* gövde kültürleri 4°C' ta, karanlıkta tutuldu ve bu şekilde kültürlerin periyodik transferlere gerek duyulmadan 12 ay boyunca saklanması başarıldı. Germplazm'ın kriyoprezervasyon yoluyla uzun süreli saklanması amacıyla ise, vitrifikasyon temelli, üç farklı tek aşamalı dondurma tekniği (PVS2 vitrifikasyon, enkapsülasyon vitrifikasyon ve damlacık dondurma), *T.*

vulgaris gövde uçları üzerinde denendi. Ayrıca, genellikle sıvı azota aktarımdan önce, örneklerin soğuk toleranslarının artırılması amacıyla uygulanan soğuğa alıştırma ve sukroz ön kültür aşamaları da optimize edildi. Buna göre, sıvı azotta saklama sonrası en yüksek bitki rejenerasyon oranı (%80), 2 hafta boyunca soğuğa alıştırılan ve 48 saat boyunca 0.25M sukroz içeren yarı-katı MS besiyerinde ön kültürlenen gövde uçlarının damlacık dondurma tekniği ile 90 dakika boyunca PVS2 ile muamelesi sonucu elde edildi.

Kriyoprezervasyon yönteminin optimizasyonunu takiben, *T. cariensis* gövde uçları da damlacık dondurma tekniği kullanılarak başarılı bir şekilde kriyoprezerve edildi. Buna göre, soğuğa alıştırma (4°C' ta 2 hafta) ve sukroz ön kültürünün (0,25M sukroz içeren yarı-katı MS besiyeri) ardından, gövde ucu eksplantları PVS2 ile 0°C ta 15-120 dakika muamele edilip sıvı azota daldırıldı. *T. vulgaris*' e benzer şekilde, *T. cariensis*' te de en yüksek bitki rejenerasyonu (%20 canlılık ve %18 rejenerasyon) 90 dakika PVS2 uygulaması ile kriyoprezerve edilen gövde ucu eksplantlarından elde edildi.

Anahtar Kelimeler: Genetik kararlılık, *in vitro* çoğaltım, kriyoprezervasyon, orta dereceli saklama, RAPD, *T. cariensis* Hub.-Mor. & Jalas, *T. longicaulis* C. Presl, *T. vulgaris* L., vitrifikasyon temelli tek aşamalı dondurma yöntemleri.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: MICROPROPAGATION OF THYME (*Thymus vulgaris* L.) AND ITS CRYOPRESERVATION BY ONE-STEP FREEZING TECHNIQUES

NAME OF THE AUTHOR: ERGUN KAYA

An effective protocol was developed for *in vitro* propagation of young and mature explants of three botanically distant *Thymus* species, i.e., *T. vulgaris*, *T. longicaulis*, and *T. cariensis*. Optimizations for *in vitro* shoot proliferation included use of different concentrations of cytokinins (6-benzyladenine, kinetin and thidiazuron), followed by the use of selected cytokinin type and concentration in combination with auxins and/or gibberellic acid and silver nitrate. Best shoot proliferation was obtained when semi-solid MS medium was supplemented with 1 mg l⁻¹ kinetin and 0,3 mg l⁻¹ gibberellic acid. Rooting of the shoots was obtained on semi-solid MS medium that was either hormone-free or supplemented with auxins. However, the best root apparatus developed on MS medium supplemented with 0.05 mg L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Following rooting, the plantlets were transferred to 250-mL plastic pots and successfully acclimatized by gradually reducing the relative humidity. In addition to *in vitro* propagation, the effect of optimized protocol on genetic fidelity of the obtained plantlets was also investigated by isolating genomic DNAs of both the mother plant (seedling developed by germination of a seed), as well as the shoots (developed by culturing *in vitro* the shoot tips of the mother plant) that underwent two, four, six, eight, or ten cycles of *in vitro* subculturing were isolated and genetic stability was confirmed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis.

Slow growth storage was achieved by keeping the *in vitro* shoot cultures of *T. vulgaris*, obtained according to the optimized protocol of *in vitro* propagation, at 4°C and in darkness up to 12 months. As for the long-term storage of the germplasm, three different vitrification-based one-step freezing techniques (PVS2 vitrification,

encapsulation-vitrification and droplet-freezing) were tested by using *T. vulgaris* shoot tips. However initially all the preliminary steps of cryoprotection (i.e., cold-hardening, sucrose preculture) were also optimized. The best cryopreservation procedure for *T. vulgaris* was achieved with the droplet-vitrification method, based on a 2-week cold hardening of shoot cultures, followed by 48-h preculture of shoot tips on MS medium supplemented with 0.25 M sucrose, and a 90-min PVS2 treatment in droplets. This way, after direct immersion in LN, thawing and plating, 80% shoot-tip recovery rate was obtained.

Following optimizations of the protocols, *T. cariensis* was also successfully cryopreserved using the droplet vitrification method. After cold adaptation (two weeks at +4°C) and sucrose preculture (MS medium with 0.25M sucrose, 48 hours), shoot tips were dehydrated with PVS2 at 0°C for 15-120 minute and immersed liquid nitrogen. Best vitality (%20) and regeneration (%18.3) result were obtained when PVS2 was applied at 0°C for 90 minute.

Keywords: Cryopreservation, genetic stability, *in vitro* propagation, RAPD, slow growth storage, *T. cariensis* Hub.-Mor. & Jalas, *T. longicaulis* C. Presl, *T. vulgaris* L., vitrification-based one-step freezing techniques.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında, maddi ve manevi elinden gelen her türlü desteği benden esirgemeyen, en zor zamanlarımda, çıkmaza düştüğüm her anımda bana hep umut ışığı yakan, beni asla yalnız bırakmayan GYTE'nin bana kazandırdığı en büyük dostum, sırdaşım, gerçek arkadaşım danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Elif Aylın Özüdoğru'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bir adım bile yaklaşmadığım hayallerime kavuşmamı sağlayan, üzerimdeki emeğini, hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fusun Gümüşel'e çok teşekkür ederim.

Tez danışmanlığımı üzerine alan ve değerli zamanını bana ayırarak ihtiyaç duyduğum kritik anlarda yardımcı olan hocam Prof. Dr. Tamer Yağcı'ya, Doktora programına kayıt yaptırdığım günden itibaren uzunca bir süre danışmanlığımı üstlenen ve pek çok konuda üzerimde emeği olan Yrd. Doç. Dr. Saliha İşsever Öztürk'e, altı aylık tez gelişme dönemlerinde, yorucu iş yüküne rağmen bizleri kırmadan, değerli zamanını ayırarak büyük bir özveriyle tezime katkılarda bulunan Doç. Dr. Filiz Gürel'e, bilgi ve tecrübesini esirgemeyen, gerek maddi gerekse manevi her konuda elinden geldiğince yardımcı olmaya çalışan, ayrıca her ortamda bizi gözetip koruyan Yrd. Doç. Dr. Yelda Özden'e, tez savunmam esnasında bilgi ve tecrübeleriyle tezime katkılarda bulunan hocam Prof. Dr. Şule Arı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında, gereksinim duyduğum her an bana yardımcı olan, hep yanımda olan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Emrah Kırdök ve Arş. Gör. Hülya Akdemir'e, bilgisayar konusunda engin bilgisiyle her başım sıkıştığında imdadıma yetişen arkadaşım Veysel Süzerer'e, ellerinden geldiğince çalışmama katkıda bulunan arkadaşlarım Arş. Gör. Doğa Gümüşel ve Arş. Gör. İbrahim Koç'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımın moleküler analizler bölümünü gerçekleştirmem için gerek cihaz kullanımı gerekse kimyasal malzeme temini konusunda yardımcı olan GYTE Enzim Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı'nda çalışan hocalarıma ve arkadaşlarıma, *Thymus vulgaris* L. bitkisine ait tohumları temin etmemde yardımcı olan Prof. Dr. Maurizio Lambardi'ye teşekkür ederim.

Varlıklarıyla her zaman güven veren ve bana hep destek olan anneme ve babama teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xxi
1. GİRİŞ	1
1.1. Bitki Gen Kaynaklarının Korunmasında Biyoteknolojik Yaklaşımlar	1
1.2. Bitki Doku Kültürü	4
1.2.1. <i>In vitro</i> Çoğaltım	7
1.2.2. Bitki Büyüme Düzenleyicileri	9
1.2.3. Sentetik Tohum Teknolojisi	9
1.2.4. <i>In vitro</i> Doku Kültürlerinde Somaklonal Varyasyon	11
1.2.4.1. Genetik Kararlılığın RAPD Belirteçleri ile Belirlenmesi	12
1.3. Germplazmanın Orta Dereceli Saklanması	13
1.4. Germplazmanın Uzun Süreli Saklanması (Kriyoprezervasyon)	15
1.4.1. Suyun Fiziksel Özellikleri	17
1.4.2. Su ve Buzun Termal Özellikleri	20
1.4.3. Buz Çekirdekleşmesi	20
1.4.4. Geleneksel Kriyokoruma Tekniği (Yavaş Soğutma – Kontrollü Soğutma)	22
1.4.5. Geliştirilmiş Kriyokoruma Teknikleri (Hızlı Soğutma – Tek Aşamalı Dondurma Teknikleri)	25
1.4.5.1. Dehidratasyon	26
1.4.5.2. Enkapsülasyon – Dehidratasyon	27
1.4.5.3. Vitrifikasyon	30
1.4.5.4. Enkapsülasyon – Vitrifikasyon	33
1.4.5.5. Damlacık Dondurma Tekniği	34
1.5. <i>Thymus</i> L. (Kekik)	35
1.5.1. <i>Thymus vulgaris</i> L.	37
1.5.2. <i>Thymus longicaulis</i> C. Presl	40

1.5.3.	<i>Thymus cariensis</i> Hub.-Mor. & J alas	41
1.6.	Tezin Amacı	42
2.	GEREÇ ve YÖNTEMLER	43
2.1.	GEREÇLER	43
2.1.1.	Bitki Materyali	43
2.1.2.	Kimyasal Malzemeler	43
2.1.2.1.	Mikroçoğaltımda Kullanılan Kimyasal Maddeler	43
2.1.2.2.	Moleküler Analizlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	45
2.1.2.3.	Kriyoprezervasyonda Kullanılan Kimyasal Maddeler	47
2.1.3.	Cihazlar	48
2.2.	YÖNTEMLER	50
2.2.1.	Mikroçoğaltım Yöntemleri	50
2.2.1.1.	<i>T. longicaulis</i> ve <i>T. cariensis</i> Bitkilerine Ait Eksplantların Dekontaminasyonu	50
2.2.1.2.	<i>T. vulgaris</i> L. Tohumlarının (Genç Materyal) Dekontaminasyonu	51
2.2.1.3.	<i>T. vulgaris</i> L. Tohumlarının Çimlendirilmesi	52
2.2.1.4.	En Uygun Mikroçoğaltım Besiyerinin Belirlenmesi	52
2.2.1.5.	Köklendirme Besiyerinin Belirlenmesi	53
2.2.1.6.	İklendlendirme ve Toprağa Adaptasyon	53
2.2.1.7.	Ölçme Yöntemleri ve Verilerin Değerlendirilmesi	54
2.2.2.	Moleküler Analizler	54
2.2.2.1.	CTAB Yöntemi ile Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) Bitkisinden Genomik DNA İzolasyonu	54
2.2.2.2.	Agaroz Jel Elektroforeziyle DNA Görüntülenmesi	57
2.2.2.3.	2.2.2.4. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR) Yöntemi	57
2.2.2.4.	RAPD-PCR Ürünlerinin Jel Elektroforeziyle Görüntülenmesi	58
2.2.3.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) Bitkisinin Orta Dereceli Saklanması	58
2.2.4.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) Bitkisinin Kriyoprezervasyon Yoluyla Uzun Süreli Saklanması	58
2.2.4.1.	+4 °C Sıcaklıkta Ön Koşullandırma	58
2.2.4.2.	Sukroz Ön Koşullandırma	59
2.2.4.3.	PVS2 Vitrifikasyon Tekniği İle Kriyoprezervasyon	59
2.2.4.4.	Enkapsülasyon-Vitrifikasyon Tekniği İle Kriyoprezervasyon	60
2.2.4.4.1.	Sentetik Tohum Eldesi	60
2.2.4.5.	Enkapsülasyon-Vitrifikasyon Tekniğinin Uygulanması	61

2.2.4.6.	Damlacık Dondurma Tekniği ile Kriyoprezervasyon	62
3.	BULGULAR	64
3.1.	KEKİK (<i>Thymus vulgaris</i> L.) BİTKİSİNİN MİKROÇOĞALTIMI	64
3.1.1.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) Bitkisinin Dekontaminasyonu	64
3.1.1.1.	<i>Thymus vulgaris</i> L. Tohumlarının Dekontaminasyonu ve Çimlendirilmesi	64
3.1.1.2.	<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl bitkisinin dekontaminasyonu	66
3.1.1.3.	<i>Thymus cariensis</i> Hub.-Mor. & Jalas bitkisinin dekontaminasyonu	69
3.1.2.	KEKİK (<i>Thymus vulgaris</i> L.) BİTKİSİ İÇİN EN UYGUN REJENERASYON BESİYERİNİN BELİRLENMESİ	70
3.1.2.1.	Sitokinin Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) Bitkisinin <i>İn vitro</i> Gelişimi Üzerindeki Etkileri	70
3.1.2.2.	Kinetin ile Çeşitli Oksin Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) Bitkisinin <i>İn vitro</i> Gelişimi Üzerindeki Etkileri	76
3.1.2.3.	Gibberelik Asit (GA ₃)'in <i>Thymus vulgaris</i> L. Bitkisinin Rejenerasyonu Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	80
3.1.2.4.	Gümüş Nitrat (AgNO ₃)'ın <i>Thymus vulgaris</i> L. Bitkisinin Rejenerasyonu Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	82
3.1.3.	KEKİK (<i>Thymus vulgaris</i> L.) BİTKİSİ İÇİN EN UYGUN KÖKLENME BESİYERİNİN BELİRLENMESİ	87
3.1.3.1.	<i>T. vulgaris</i> Bitkisinde Bitki Büyüme Düzenleyicisi İçermeyen Yarı-Katı MS Besiyerlerinde Elde Edilen Köklenme Oranları	87
3.1.3.2.	Çeşitli Derişimlerde Farklı Oksin Bitki Büyüme Düzenleyicilerini İçeren Yarı-Katı Ms Besiyerlerinde Elde Edilen Köklenme Oranları	88
3.1.4.	KEKİK (<i>Thymus vulgaris</i> L.) BİTKİSİNİN TOPRAĞA AKTARILMASI VE İKLİMLENDİRİLMESİ	91
3.2.	<i>İN VİTRO</i> ÇOĞALTILAN KEKİK (<i>Thymus vulgaris</i> L.) BİTKİSİNİN MOLEKÜLER BELİRTEÇLERLE GENETİK KARARLILIĞININ BELİRLENMESİ	92
3.2.1.	Jel elektroforezi ve Spektrofotometre ile DNA Miktarı Tayini	93
3.2.2.	RAPD Analizleri	93
3.3.	KEKİK (<i>Thymus vulgaris</i> L.) BİTKİSİNİN <i>İN VİTRO</i> YÖNTEMLER VE TEK AŞAMALI DONDURMA YÖNTEMLERİYLE ORTA VE UZUN SÜRELİ SAKLANMASI	97
3.3.1.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) Bitkisinin <i>in vitro</i> Yöntemlerle Saklanması	97
3.3.2.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) Bitkisinin Kriyoprezervasyon Öncesi Soğuğa Alıştıırılması	99

3.3.3.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) Bitkisinin Kriyoprezervasyon Öncesi Sukroz Ön Kültürü	101
3.3.4.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) Bitkisinin PVS-2 Vitrifikasyon Tekniği ile Kriyoprezervasyonu	102
3.3.5.	<i>T. vulgaris</i> Bitkisinin Enkapsülasyon-vitrifikasyon Yöntemiyle Kriyoprezervasyonu	106
3.3.6.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) Bitkisinin Damlacık Dondurma Tekniği ile Kriyoprezervasyonu	107
3.3.6.1.	<i>T. cariensis</i> Bitkisinin Damlacık Dondurma Tekniği ile Kriyoprezervasyonu	109
4	TARTIŞMA	111
5	SONUÇLAR	128
6	KAYNAKLAR	133
7	ÖZGEÇMİŞ	157
8	EKLER	158
EK 1.	“THE SIVB 2010 İN VİTRO BIOLOGY MEETING” ADLI KONGREDE SUNULAN BİLDİRİNİN ÖZETİ	158
EK 2.	“THE SIVB 2010 İN VİTRO BIOLOGY MEETING” ADLI KONGREDE KAZANILAN ÖDÜLÜ BELGELEYEN YAZI	159
EK 3.	“28 th INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS (IHC)” ADLI KONGREDE SUNULAN BİLDİRİNİN ÖZETİ	160
EK 4.	“THE SIVB 2011 İN VİTRO BIOLOGY MEETING” ADLI KONGREDE SUNULAN BİLDİRİNİN ÖZETİ	161
EK 5.	“THE SIVB 2011 İN VİTRO BIOLOGY MEETING” ADLI KONGREDE KAZANILAN ÖDÜLÜ BELGELEYEN YAZI	162
EK 6.	<i>In vitro</i> propagation from young and mature explants of thyme (<i>Thymus vulgaris</i> and <i>T. longicaulis</i>) resulting in genetically stable shoots.	163

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Biyoçeşitliliğin koşullu etki alanı ağacı.	2
1.2. Kriyoprezervasyon çalışmalarında kullanılan, vitrifikasyon tekniğine dayalı geleneksel (iki aşamalı dondurma-yavaş soğutma) ve geliştirilmiş (tek aşamalı dondurma- hızlı soğutma) yöntemler.	16
1.3. Suyun özellikleri ve suyun kriyokoruma sırasında önemi: (A) vitrifiye durumun kararlılığının belirlenmesinde, cama geçiş sıcaklıklarında (T _{gs}), çözme ve soğutmada buz çekirdekleşmesi oluşumunda termal analizlerin kullanılması; (B) Hüresel yıkımın en aza indirgenmesi için soğutma oranlarının optimizasyonu ve Mazur (2004) tarafından önerilen kriyohasarların iki faktörü teorisi ve ters çevrilmiş “U” ile ifade edilen canlılığın artırılması; (C) biyolojik bir çözücü olarak suyun, T _g , erime ve buz çekirdekleşmesi üzerindeki kriyokoruyucu derişiminin etkileri bir faz diyagramı ile örneklendirilmiştir; (D) suyun kimyasal özellikleri, bipolar karakteristikleri, kendi arasında ve diğer moleküllerle hidrojen bağları.	19
2.1. Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövde ucu ve nodal eksplantlar. (A) Muallimköy arazisinde yetişen ve denemelerde olgun bitki materyali olarak kullanılan <i>T. longicaulis</i> bitkisi, (B) alkolden arındırılması amacıyla laminar akımlı kabinde bekletilen, gövde ucu ve nodları içeren kekik gövde parçaları.	51
2.2. <i>T. vulgaris</i> tohumlarının dekontaminasyonu. Tohumların, %70’ lik EtOH (A), %10’ luk H ₂ O ₂ (B) ve %20’ lik çamaşır suyu (C) çözeltileri ile muamele edilmesi.	52
2.3. PVS-2 vitrifikasyon tekniğiyle kriyoprezervasyon yönteminin aşamaları.	60
2.4. Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarını içeren sentetik tohumların eldesi.	61
2.5. Damlacık Dondurma tekniği ile kriyoprezervasyon tekniğinin aşamaları.	62
3.1. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> yöntemlerle çimlendirilen kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) tohumları. (A) Tohumların dekontamine su veya sıvı MS.0 besiyeri ile ıslatılmış iki kat pamuk arasında çimlendirilmesi. (B) Tohumların yarı-katı MS.0 besiyerine aktarılarak <i>in vitro</i> olarak çimlendirilmesi.	64
3.2. Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) tohumlarının çimlendirilmesi sonucunda elde edilen fideler. (A) Tohumların 45 gün boyunca yarı-katı MS.0 besiyerinde, veya (B) dekontamine su ile ıslatılmış iki kat pamuk arasında çimlendirilmesi sonucunda elde edilen fideler. (C ve D) Tohumların toprağa aktarılmasından yaklaşık 100	65

- gün sonra elde edilen fideler.
- 3.3. A, B. % 2,5'lik çamaşır suyu çözeltisinin 30 dakika uygulanması yoluyla dekontamine edilen *T. longicaulis* bitkisinin gövde ucu eksplantlarında, 30 günlük kültür sonucunda elde edilen gövdeler. 67
- 3.4 (A) *Thymus cariensis* bitkisi ana materyalin genel görünüşü; (B) Dekontaminasyon için bitkiden alınan gövde parçaları; (C-F). %2,5' lik çamaşır suyu çözeltisinin 30 dakika uygulanması ve (G-H) %1,5' lik çamaşır suyu çözeltisinin 60 dakika uygulanması yoluyla dekontamine edilen gövde ucu eksplantlarında 30 günlük kültür sonucunda elde edilen gövde gelişimleri. 69
- 3.5. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından (A) 2 mg/l BA içeren; (B, C) 2,5 mg/l BA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen gövdeler. 71
- 3.6. (A) Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının 2 mg/l TDZ içeren yarı-katı MS besiyerinde rejenerasyonun genel görünümü; (B, C) elde edilen gövdeler. 74
- 3.7. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının (A) 0,5 mg/l KIN; (B) 1 mg/l KIN içeren yarı-katı MS besiyerinde rejenerasyonlarının genel görünümü; (C, D) 1 mg/l KIN içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen gövdeler. 75
- 3.8 A, B. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının 1 mg/l KIN ve 0,1 mg/l IAA içeren yarı-katı MS besiyerinde rejenerasyonları. 77
- 3.9. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının (A) 1 mg/l KIN ve 1 mg/l NAA; (B) 1 mg/l KIN ve 0,1 mg/l NAA içeren yarı-katı MS besiyerlerindeki rejenerasyonları. 78
- 3.10. *Thymus vulgaris* L. bitkisinin 1 mg/l KIN ile (A) 0,1 mg/l; (B) 0,3 mg/l; (C) 0,6 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerlerinde rejenerasyonu. 81
- 3.11. *Thymus vulgaris* L. bitkisinin 1 mg/l KIN ve 0,1 mg/l NAA ile (A) 0,1 mg/l; (B) 0,3 mg/l; (C) 0,6 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerlerinde rejenerasyonu. 82
- 3.12. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, 1 mg/l KIN ile (A) 1 mg/l; (B) 2 mg/l; (C) 4 mg/l; (D) 6 mg/l; (E, F) 8 mg/l AgNO₃ içeren yarı-katı MS besiyerlerinde elde edilen rejenerasyonlar. 84
- 3.13. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, 1 mg/l KIN ve 0,1 mg/l NAA ile (A, B) 1 mg/l; (C) 2 mg/l; (D) 4 mg/l; (E) 6 mg/l; (F) 8 mg/l AgNO₃ içeren yarı-katı MS besiyerlerinde elde edilen rejenerasyonlar. 85
- 3.14. *T. vulgaris* bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından 1 mg/l KIN ile 0,3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen gövdeler. 85
- 3.15. 1 mg/l KIN ile 0,3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerinde, (A, B) *T. longicaulis* ve (C, D) *T. cariensis* bitkilerine ait gövde ucu eksplantlarından elde edilen gövdeler. 86

- 3.16 A-C. Yarı-katı MS.0 besiyerinde *T. vulgaris* bitkisinin gövdelerinde gelişen kökler. 87
- 3.17. 0,05 mg/l 2,4-D içeren yarı-katı MS besiyerinde, (A, B) *T. vulgaris*; (C, D) *T. longicaulis*; (E, F) *T. cariensis* gövdelerinde elde edilen köklenmeler. 91
- 3.18. *In vitro* ortamda köklendirilip toprağa aktarılarak iklimlendirilen (A) *T.vulgaris*; (B) *T. longicaulis*; (C) *T. cariensis* türlerine ait bitkiler. 92
- 3.19. Moleküler analizlerde kullanılmak üzere, *in vitro* çimlendirilen *T. vulgaris*'e ait tohumlardan elde edilen ve 1 mg/l KIN ve 0,3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerinde klonlanan(A, B) T1 klonu ; (C) T2 klonu; ve (D) T3 klonuna ait gövdeler. 92
- 3.20. *Thymus vulgaris* L. bitkisinden İzole edilen genomik DNA' ların jel görüntüsü (soldan sağa sırasıyla, 0-2-4. alt kültürler sonucu elde edilen bitkilerden izole edilen genomik DNA' lar; *Hind*III ile kesilmiş λ DNA; 6-8-10. alt kültürler sonucu elde edilen bitkilerden izole edilen genomik DNA' lar.) 93
- 3.21. (A) F03; (B) F05; (C) F08; (D) F09 (E) F10; (F) F11; (G) F13; (H) F14 primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen bantlar. Kuyuların yerleşimi soldan sağa doğru, 1. kuyu belirteç (100 bp); 2-7. kuyular sırasıyla 0-2-4-6-8-10. alt kültürlerde elde edilen kekik bitkilerine ait genomik DNA' nin kalıp olarak kullanıldığı RAPD PCR ürünleri; 8. kuyu - kontrol; 9. kuyu + kontrol (ayvalık çeşitine ait zeytin bitkisinin genomik DNA' sı kullanılarak yapılan RAPD PCR ürünü. 95
- 3.22. (A) F15; (B) F16; (C) K01; (D) K02 (E) K03; (F) K06; (G) K07; (H) K08 primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen bantlar. Kuyuların yerleşimi soldan sağa doğru, 1. kuyu belirteç (100 bp); 2-7. kuyular sırasıyla 0-2-4-6-8-10. alt kültürlerde elde edilen kekik bitkilerine ait genomik DNA' nin kalıp olarak kullanıldığı RAPD PCR ürünleri; 8. kuyu - kontrol; 9. kuyu + kontrol (ayvalık çeşitine ait zeytin bitkisinin genomik DNA' sı kullanılarak yapılan RAPD PCR ürünü. 96
- 3.23. (A) K09; (B) K10; (C) K11 primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen bantlar. Kuyuların yerleşimi soldan sağa doğru, 1. kuyu belirteç (100 bp); 2-7. kuyular sırasıyla 0-2-4-6-8-10. alt kültürlerde elde edilen kekik bitkilerine ait genomik DNA' nin kalıp olarak kullanıldığı RAPD PCR ürünleri; 8. kuyu - kontrol; 9. kuyu + kontrol (ayvalık çeşitine ait zeytin bitkisinin genomik DNA' sı kullanılarak yapılan RAPD PCR ürünü. 97
- 3.24. +4°C' ta, karanlık koşullarda (A) 1 ay; (B) 2 ay; (C) 5 ay; (D) 10 ay; ve (E) 12 ay saklanan *T. vulgaris* gövde kültürleri. 98
- 3.25. (A, B) 2 ay; (C) 6 ay; (D) 8 ay; (E) 10 ay; ve (F) 12 ay boyunca +4°C' ta, karanlık koşullarda orta dereceli saklanan *T. vulgaris* gövde kültürlerinden izole edilen gövde ucu eksplantlarında gözlenen bitki rejenerasyonları. 99

- 3.26. (A) 1; (B) 2; (C) 3; (D) 4 hafta süreyle soğukta tutulan *T. vulgaris* bitkilerinden izole edilen gövde ucu eksplantlarında gözlenen bitki rejenerasyonları. 100
- 3.27. 2 hafta boyunca soğuga alıştırılan *T. vulgaris* bitkisinden izole edilen gövde ucu eksplantlarında gözlenen gövde rejenerasyonları. 101
- 3.28. 0,25M sukroz içeren yarı-katı MS besiyerinde 48 saat inkübe edilen *T. vulgaris* gövde uçlarında gözlenen gövde rejenerasyonları. 102
- 3.29. *Thymus vulgaris* bitkisinden alınan gövde ucu eksplantlarının (A, B)75 dakika; (C, D) 30 dakika; (E, F, G) 60 dakika PVS2 çözeltisi ile muamesinden sonraki dört haftalık gelişme periyodunda oluşturdukları çoklu gövdeler. 104
- 3.30. A-C. 15 dakikalık PVS2 ardından sıvı azotta saklanan *T. vulgaris* eksplantlarının rejenerasyon besiyerinde dört haftalık kültürlenmesi sonucu oluşturdukları çoklu gövdeler. 105
- 3.29. (A, B) 30 dakikalık; ve (C, D) 60 dakikalık PVS2 muamesinin ardından sıvı azotta saklanan *T. vulgaris* gövde ucu eksplantlarının rejenerasyon besiyerinde dört haftalık kültür sonucu oluşturdukları çoklu gövdeler. 105
- 3.30. (A, B, C) PVS2 ile muamele edilmeden yarı-katı MS besiyerine aktarılan sentetik tohumların çimlenmesi ve oluşturdukları çoklu gövdeler 106
- 3.31. A-B. *Tymus vulgaris* bitkisinin damlacık dondurma tekniğiyle kriyoprezervasyonunda, kontrol grubu gövde uçlarından rejenere olan gövdeler 108
- 3.32. (A-F) *Tymus vulgaris* bitkisinin damlacık dondurma tekniğiyle kriyoprezervasyonunda, sıvı azotta saklanan gövde uçlarından rejenere olan gövdeler. 109
- 3.33. *Thymus cariensis* bitkisinin 90 dakikalık PVS2 uygulaması ile damlacık dondurma tekniği kullanılarak kriyoprezervasyonu, (A) kontrol; (B-E) sıvı azot grubuna ait eksplantlardan elde edilen gövdeler. 110

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Bitki doku kültürünün gelişiminde etkili olan bazı çalışmalar (Kung, 1993; Pierik, 1993; Endress, 1994).	6
1.2. Bitki büyüme düzenleyicilerinin gruplandırılması, fonksiyonları ve en yaygın kullanılanları (Gaspar ve ark., 1996; Haberer ve Kieber, 2002; Johri ve Mitra, 2001; Smith, 1992)	10
1.3. Enkapsülasyon-dehidratasyon tekniği ile gövde ucu eksplanti kullanılarak kriyoprezerve edilen bazı bitki örnekleri	28
1.4. PVS2 vitrifikasyon tekniğiyle kriyoprezerve edilen bazı bitki örnekleri. (Engelmann ve ark, 2008).	32
1.5. Enkapsülasyon-vitrifikasyon tekniği kullanılarak kullanılarak kriyoprezerve edilen bazı bitki örnekleri.	34
1.6. Damlacık Dondurma tekniği kullanılarak kriyoprezerve edilen bazı bitki örnekleri. (Panis, 2008).	35
1.7. <i>Thymus vulgaris</i> L. bitkisinin uçucu yağ bileşenleri üzerinde yapılan bazı çalışmalar sonucu elde edilen sonuçların özeti (Stahl-Biscup ve Sáez, 2002).	39
1.8. <i>Thymus longicaulis</i> C. Presl bitkisinin içerdiği uçucu yağ bileşenleri (Jovanovic, 2009).	41
2.1. Olgun ve genç bitki materyalinin dekontaminasyonunda ve mikroçoğaltım aşamalarında kullanılan kimyasallar.	44
2.2. MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiyeri içeriği	45
2.3. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler	46
2.4. RAPD PCR reaksiyonlarında, ayrıca izole edilen genomik DNA ve elde edilen PCR ürünlerinin görüntülenmesi sırasında kullanılan kimyasal maddeler.	46
2.5. RAPD PCR reaksiyonlarında kullanılan oligonükleotid primer listesi.	47
2.6. Kriyoprezervasyon aşamasında kullanılan kimyasal maddeler.	47
2.7. Tez çalışması sırasında kullanılan cihazlar.	48
2.8. CTAB yöntemiyle genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler	55
3.1. <i>In vitro</i> veya <i>in vivo</i> çimlendirilen kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) tohumlarında görülen fide gelişimleri.	66
3.2. Olgun kekik (<i>T. longicaulis</i>) bitkisinden alınan gövde ucu	67

	eksplantlarının çeşitli derişimlerde ve sürelerde çamaşır suyu (domestos) ile muamelesini takiben elde edilen dekontaminasyon ve rejenerasyon sonuçları.	
3.3.	Olgun kekik (<i>T. longicaulis</i>) bitkisinden alınan nod eksplantlarının çeşitli derişimlerde ve sürelerde çamaşır suyu (domestos) ile muamelesini takiben elde edilen dekontaminasyon ve rejenerasyon sonuçları.	68
3.4.	<i>T. cariensis</i> bitkisine ait dekontaminasyon sonuçları	70
3.5.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, çeşitli derişimlerde BA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen bitki rejenerasyonları.	70
3.6.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait nod eksplantlarından, çeşitli derişimlerde BA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen bitki rejenerasyonları.	72
3.7.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövde ucu ve nod eksplantlarından, çeşitli derişimlerde BA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen gövde oluşturma kapasite indeksi.	72
3.8.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, çeşitli derişimlerde TDZ içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen bitki rejenerasyonları.	73
3.9.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, çeşitli derişimlerde KIN içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen bitki rejenerasyonları.	74
3.10.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının, çeşitli derişimlerde sitokinin içeren yarı-katı MS besiyerinde gövde oluşturma kapasiteleri.	75
3.11.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, 1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde IBA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen bitki rejenerasyonları.	76
3.12.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, 1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde IAA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen bitki rejenerasyonları.	77
3.13.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, 1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde NAA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen bitki rejenerasyonları.	78
3.14.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, 1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde 2,4-D içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen bitki rejenerasyonları.	79
3.15.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, 1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde oksin içeren yarı-katı MS besiyerlerinde elde edilen gövde	80

	oluşturma kapasitelerinin (G.O.K.) karşılaştırılması.	
3.16.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının, 1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde GA ₃ içeren yarı-katı MS besiyerindeki rejenerasyonları.	81
3.17.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, 1 mg/l KIN + 0.1 mg/l NAA ve çeşitli derişimlerde GA ₃ içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen rejenerasyonlar.	82
3.18.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının, 1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde AgNO ₃ içeren yarı-katı MS besiyerindeki rejenerasyonları.	83
3.19.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının, 1 mg/l KIN, 0,1 mg/l NAA ve çeşitli derişimlerde AgNO ₃ içeren yarı-katı MS besiyerlerindeki rejenerasyonları.	84
3.20.	1 mg/l KIN ve 0,3 mg/l GA ₃ içeren yarı-katı MS besiyerinin <i>T. longicaulis</i> ve <i>T. cariensis</i> bitkilerinden alınan gövde ucu eksplantlarının rejenerasyonu üzerindeki etkileri.	86
3.21.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövdelerin çeşitli derişimlerde IBA içeren yarı-katı MS besiyerlerinde elde edilen köklenme oranları.	88
3.22.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövdelerin çeşitli derişimlerde NAA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen köklenme oranları.	89
3.23.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövdelerin çeşitli derişimlerde IAA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen köklenme oranları.	89
3.24.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövdelerin çeşitli derişimlerde 2,4-D içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen köklenme oranları.	90
3.25.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i> L.) bitkisine ait gövdelerin çeşitli derişimlerde oksin içeren yarı-katı MS besiyerinde kök oluşturma kapasitelerinin (K.O.K.) karşılaştırılması.	90
3.26.	0,05 mg/l 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisi içeren yarı-katı MS besiyerinde <i>T. longicaulis</i> ve <i>T. cariensis</i> gövdelerinden elde edilen köklenme sonuçları.	91
3.27.	<i>Thymus vulgaris</i> L. bitkisinin T1 klonundan altkültürlenerek çoğaltılan bitkilerden izole edilen genomik DNA' ların spektrofotometrik analiz sonuçları.	93
3.28.	PCR için kullanılan oligonükleotid primer dizileri ve RAPD PCR sonucu her bir primerden elde edilen bant sayısı.	94
3.29.	<i>T. vulgaris</i> bitkisin +4°C' ta orta dereceli saklaması sonucu elde edilen bitki rejenerasyonları.	98
3.30.	1-4 hafta boyunca soğuğa alıştırılan <i>T. vulgaris</i>	100

- bitkilerindenizole edilen gövde ucu eksplantlarının rejenerasyonları.
- 3.31. *T. vulgaris* bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının sukroz önkültür aşamasından sonra rejenerasyon besiyerindeki gelişimleri. 102
- 3.32. Farklı PVS2 uygulama sürelerinin, vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezerve edilen *T. vulgaris* gövde uçlarının rejenerasyonu üzerindeki etkisi. 103
- 3.33. Farklı PVS2 uygulama sürelerinin, Enkapsülasyon-vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezerve edilen *T. vulgaris* bitkisine ait gövde uçlarının rejenerasyonu üzerindeki etkisi 107
- 3.34. Farklı PVS2 uygulama sürelerinin, damlacık dondurma tekniği ile kriyoprezerve edilen *T. vulgaris* bitkisine ait gövde uçlarının rejenerasyonu üzerindeki etkisi. 108
- 3.35. *Thymus cariensis* Droplet-vitrifikasyon tekniğiyle kriyoprezervasyon kontrol ve sıvı azot sonuçları. 110

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2,4-D	2,4 diklorofenoksi asetik asit
μg	Mikro gram
μl	Mikro litre
ABA	Absisik asit
AgNO_3	Gümüş Nitrat
BA	Benzil adenin
CaCl_2	Kalsiyum klorür
CoCl_2	Kobalt klorür
CTAB	Setil trimetil amonyum bromid
CuSO_4	Bakır sülfat
dH_2O	Deiyonize su
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EtOH	Etil alkol
FeSO_4	Demir sülfat
GA_3	Gibberellik asit
GOK	Gövde oluşturma kapasitesi indeksi
HCl	Hiroklorik asit
H_3BO_3	Borik asit
H_2O_2	Hidrojen peroksit
IAA	İndol asetik asit
IBA	İndol bütirik asit
KH_2PO_4	Potasyum fosfat
KI	Potasyum iyodür
KIN	Kinetin
KNO_3	Potasyum nitrat
KOK	Kök oluşturma kapasitesi indeksi
LS	Yükleme solüsyonu
MgSO_4	Magnezyum sülfat
MnSO_4	Mangan sülfat
MS	Murashige ve Skoog
NAA	Naftalen asetik asit

NaCl	Sodyum klorür
Na ₂ EDTA	Sodyum etildiamintetraasetik asit
Na ₂ MoO ₄	Molibdik asit
NH ₄ NO ₃	Amonyum nitrat
NN	Nitsch ve Nitsch
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PEG	Polietilen glikol
PVP	Polivinilprolidon
PVS2	Bitki vitrifikasyon solüsyonu
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
SA	Sıvı azot
SH	Standart hata
TDZ	Thidiazuron
TE	Tris EDTA
WHO	Dünya Sağlık Organizasyonu
ZnSO ₄	Çinko sülfat

*Bana koşulsuz güvenen ve her zaman hayallerime inanan
Anneme...*

*“Bir anne yüreği, dibinde daıma af bulunan bir uçurumdur.”
BALZAC*

1. GİRİŞ

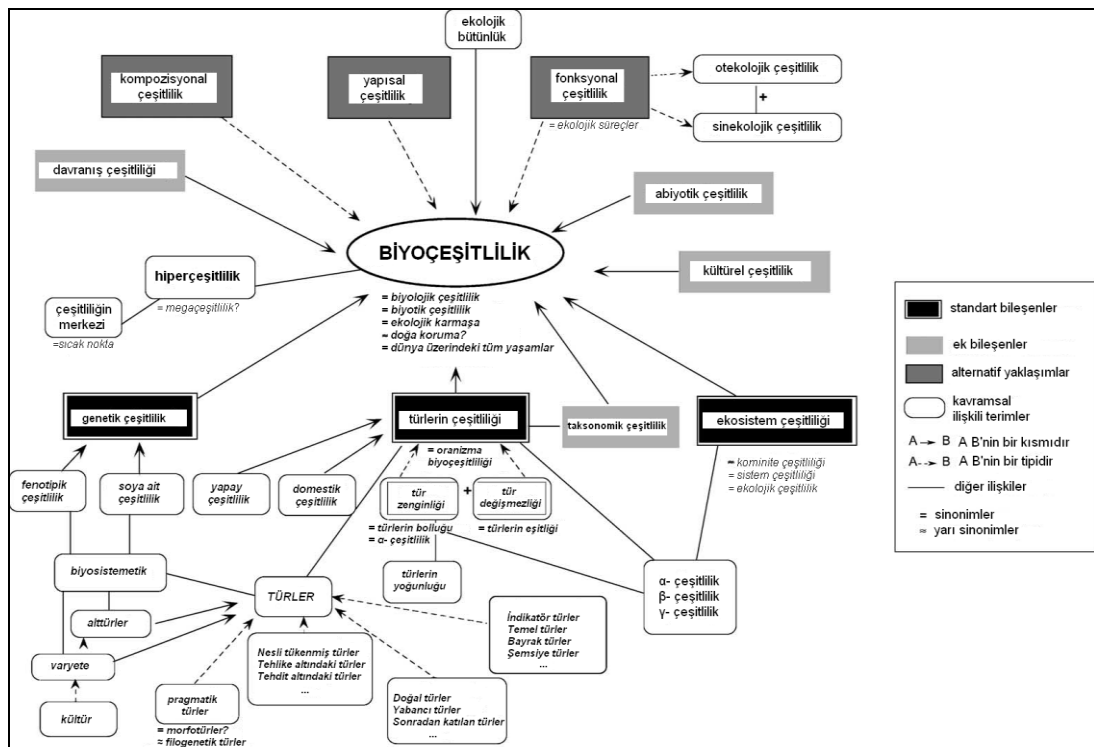
1.1. Bitki Gen Kaynaklarının Korunmasında Biyoteknolojik Yaklaşımlar

Çok eski yıllardan günümüze kadar beslenme ve tedavi amaçlı kullanılmakta olan bitkiler dünya nüfusunun büyük bir çoğunluğu için en önemli yaşam kaynağıdır. Bir başka deyişle bitkiler ‘yaşam’ demektir. Diğer bütün hayat formlarının canlılığını sürdürebilmesi için birincil üreticilerdir (Benli ve Yiğit, 2005).

Bitkiler sadece hava ve su kalitesini düzenlemek, ekosistemi biçimlendirmek ve iklim şartlarını kontrol etmekle kalmaz, aynı zamanda da gıda, ilaç, giysi ve barınma gibi temel ihtiyaçlarımızı karşıladığımız sayısız hammaddenin kaynağını oluştururlar. Tıbbi amaçlı bitkilerin en eski kullanımına ait veriler, 5000 yıldan daha öncesine dayanan Sümerler’e ait yazıtlarda belgelenmiştir. Üstelik bitkilerden elde edilen kimyasal maddeler uzun yıllar boyunca tıbbi ilaçların tek kaynağı olmuştur (Raskin ve Ripoll, 2004).

Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO)’nun belirttiğine göre insanların % 80’den fazlası hala geleneksel ilaç yapımında bitkilerden yararlanmakta, yaprak ve meyvelerden özütlenen biyoaktif bileşenler (“sekonder metabolitler”), tıp, kozmetik, boya yapımı, parfüm eldesi gibi endüstrinin pek çok alanında yaygın olarak değerlendirilmektedir (Balandrin ve Klocke, 1988). Ayrıca, Dünya Sağlık Organizasyonu’nun 91 ülkenin tıbbi bitkileri üzerinde gerçekleştirilmiş olan bazı çalışmalara dayanarak yaptığı bir araştırmaya göre, tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin 20.000 kadar olduğu belirlenmiştir (Mahindru, 1992). Ayrıca bitkilerin gövde, yaprak, tohum ve köklerinden birçok mikroorganizmanın büyümesini inhibe edebilecek maddeler izole edilmiş, bu maddeler mikroorganizmalar üzerinde denenmiş ve aktiviteleri rapor edilmiştir (Rashit ve ark., 1996). Son yıllarda tıbbi bitkiler içermiş oldukları çeşitli aktif maddelerden dolayı dünyada olduğu gibi ülkemizde de birçok bilim insanının ilgisini çekmektedir. Örneğin halk ilacı olarak birçok bitkisel drog farklı açılardan incelenmiş ve oldukça önemli sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle bitkiler, insan hayatı için temel ekonomik bir kaynak ve dünya biyoçeşitliliğinin önemli bir parçasıdır (Dülger ve ark., 1997).

Wilson'a (1988) göre biyoçeşitlilik 'mevcut türlerin sayısı' olarak tanımlanmaktadır ve bu basit tanım genellikle yeterlidir. Ayrıca, çeşitliliğin, her bir türe ait populasyon büyüklüğünü ve türlerin dağılımını kapsayan teori bazında bilgiler veren tanımları da mevcuttur (örneğin geniş dağılım gösteren türler = yüksek çeşitlilik). Yakın zamanlarda yapılan tanımlamalarda biyoçeşitlilik, sadece tür zenginliğiyle kısıtlanmamış, aynı zamanda varyete, ırk, yaşam formu ve genotiplerin yanı sıra çevre bileşenleri, habitat tipleri, yapısal elementlerle de (örneğin, çalılar, kayalar, göletler) ilişkilendirilmiştir. Bunun için, biyoçeşitliliğin genel terimi, farklı büyüklükteki birimler (populasyon, tür, biyosenöz, habitat, çevre), farklı kompozisyonlar (genom, populasyon, tür, ekosistem veya çevre elementlerinin toplamı) ve fonksiyonlar (hiyerarşik sistem içinde farklı ölçekli seviyelerde gerçekleşen süreçler) ile bağlantılı olarak bir hiyerarşik sistemden biçimlenmiştir (Noss, 1990). Tüm yönleriyle biyoçeşitlilik teriminin bileşenleri Şekil 1.1'de verilmiştir. Şekilde biyoçeşitlilik için geliştirilebilmiş tek bir belirteç olmadığı açıkça görülmektedir. Biyoçeşitliliğin her bir elemanı, kendi belirtecine gereksinim duymaktadır.



Şekil 1.1. Biyoçeşitliliğin koşullu etki alanı ağacı, 125 doküman incelenerek hazırlanmıştır. Farklı yazarlar tarafından biyoçeşitliliği tanımlamak için, kavramlar kare kutulara, bağlantılı kavramlar yuvarlatılmış kutulara yazılmıştır. Çeşit ve kavramsal ilişkilerin yönü oklarla gösterilmiştir. Eş anlamlı ve yarı eş anlamlı kavramlar italik yazılmıştır (Duelli ve Obrist, 2003).

Günümüzde bitki biyoçeşitliliği ciddi anlamda tehlike altındadır. Dünya üzerindeki tüm bitki türlerinin 1/3'üne karşılık gelen yaklaşık 100.000 bitki türünün doğada çoktan kaybolduğu veya kaybolma tehlikesi taşıdığı tahmin edilmektedir (Tan, 1996). 6000'den fazla endemik tür ve 360'dan fazla kültüre alınmış türle çok büyük bir bitki zenginliğine sahip olan Akdeniz havzasında da ciddi bir genetik erozyon riski bulunmaktadır. Akdeniz bölgesindeki ülkeler içinde özellikle Türkiye, Avrupa ve Asya kıtaları arasında köprü görevi gören benzersiz yerleşimi ve ekolojik faktörlerin çok kısa mesafelerde bile oldukça büyük farklılıklar gösterebildiği topografik ve iklim özelliklerine sahiptir. Bu özelliklere bağlı olarak pek çok cins ve seksiyonun orijin ve farklılaşım merkezinin Anadolu' da oluşu, ekolojik ve fitocoğrafik farklılaşmanın sonucu olarak tür endemizminin yüksek olmasını sağlamıştır (Tan, 1996; Dağcı ve ark., 2002).

Ancak ne yazık ki, Vavilov'un orijin merkezlerinden ikisine (Vavilov, 1992), ayrıca ekonomik açıdan tüm dünya için oldukça önemli olan pek çok yabancı ve kültüre alınmış türün (örneğin ladin, sedir, arpa, buğday, mercimek, nohut, elma, erik, ceviz, antepfıstığı gibi) orijin merkezine sahip olan Türkiye'de bulunan 2600'den fazla endemik türün % 22'den fazlası ciddi anlamda genetik erozyon veya kaybolma riski taşımaktadır (Vural, 2003). Oysa, büyük bir sekonder metabolit potansiyeli taşıyan bu değerli bitki çeşitliliğinin korunması ve devamlılığının sağlanması oldukça önemlidir. Bu anlamda, kültür bitkileri ve onların yabancı ırklarına ait genetik çeşitliliğin geniş bir çerçevede *in situ* veya *ex situ* germplazma koleksiyonları olarak korunması ve sürekliliğinin sağlanması zorunludur (Benson, 1999).

Bitki koruma biyoteknolojisi, modern biyoteknolojik uygulamaları içeren disiplinler arası bir kavramdır. Günümüzde bitki doku kültürü teknikleri, kriyoprezervasyon, moleküler genom analizleri gibi biyoteknolojik yaklaşımlardan, (i) *in situ* ve/veya *ex situ* germplazma koleksiyonlarının oluşturulması, (ii) moleküler karakterizasyon, (iii) hastalıkların tanı ve tedavisi, (iv) mikroçoğaltım, (v) patent altına alma, (vi) kısa, orta veya uzun süreli saklama, (vii) belgeleme, (viii) bitki

genetik kaynaklarının değiştirilmesi gibi amaçlarla faydalanılmaktadır (Benson, 1999).

1.2. Bitki Doku Kültürü

1900'lü yılların başlarında geliştirilmiş olan bitki doku kültürü yöntemi, aseptik şartlarda, yapay bir besi ortamında, hücre, doku veya organ gibi çeşitli bitki kısımlarından, kontrollü sıcaklık ve ışık şartlarında yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin eldesini amaçlamaktadır (Thorpe, 2007). Hedef bitkinin çok kısa bir zaman aralığında ve çok yüksek miktarlarda çoğaltılmasını ("*in vitro* çoğaltım") mümkün kılan yöntem, günümüzde, germplazma korunmasında, bitki neslinin devamlılığını sağlamada, fizyoloji çalışmalarında ve gen mühendisliğinde kullanılan oldukça büyük öneme sahip biyoteknolojik çalışmalardandır (Wang ve Ha, 2007).

Bugüne kadar pek çok bitki türünün, *in vitro* kültür şartlarına aktarımı gerçekleştirilmiştir. Bitki doku kültürünün gelişmesinde etkili olan çalışmalar Çizelge 1.1'de verilmiştir. Günümüzde de doku kültürü çalışmaları her geçen gün artarak devam etmektedir. Üretimdeki son modern teknikler, gelecek yüzyıldaki tarımsal endüstrinin artan talebini karşılamaya yönelik olarak geliştirilmektedir (Gürel, 1997).

Yeni çeşitlerin geliştirilmesi, mevcut çeşitlerde genetik farklılıkların oluşturulması, kaybolmakta olan türlerin korunması ve geleneksel yöntemlerle üretilmeleri zor olan türlerin rutin olarak çoğaltılmasında yararlanılan *in vitro* çoğaltım yöntemlerinden "organogenez" yönteminde, bitki gelişimi çeşitli oksin ve sitokininler kullanılarak, yaprak veya kotiledon gibi meristematik tomurcuk içermeyen çeşitli bitki parçaları üzerinde, doğrudan ("direkt organogenez") veya kallus (organize olmamış hücre kümeleri) oluşumunu takiben dolaylı olarak ("indirekt organogenez") teşvik edilir. Bu şekilde elde edilen bitkilerde, yüksek derişimlerde bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak, hücre ve dokulara baskı uygulanarak gövde oluşturmak üzere yeniden organize olmaya zorlanma nedeniyle, genetik farklılıklar oluşabilmektedir (Gürel, 1997). Buna karşılık, "mikroçoğaltım" yönteminde tam bir bitki oluşturma potansiyeline sahip olan gövde ucu ve tomurcuk

gibi meristematik büyüme bölgelerinde, bitki büyüme düzenleyicileri varlığında, çoklu gövdelerin gelişimleri ve çoğalmaları teşvik edilir ve böylece elde edilen gövdelerde genetik kararlılık yüksek oranda korunur. Bu şekilde elde edilen kültürlerin 4-5 haftalık periyodik alt kültürleri yoluyla, laboratuvar ortamında, çok kısa sürede, yüzlerce klon bitki eldesi mümkün olur (Gürel ve Uçar-Türker, 2001).

Bitki hücrelerinden embriyo elde edilmesi sadece döllenmiş yumurta hücreleriyle değil *in vitro* kültür şartlarının uygun hale getirilmesiyle, somatik hücre, doku veya organlarla da mümkündür. Vejetatif hücrelerden gelişen bu embriyolar somatik embriyo olarak isimlendirilirler. Somatik doku hücreleri genellikle yüksek oranlarda oksin içeren besi ortamlarında kültüre alınıp sonrasında oksin içermeyen yeni bir ortama aktarılarak embriyo üretme yeteneği kazanırlar (Monnier, 1990).

Somatik ve zigotik embriyogenez arasındaki en önemli fark elde edilmiş yöntemlerinden kaynaklanmaktadır. Zigotik embriyo döllenmiş bir yumurta hücresinden geliştiği için, elde edilen bitkiler genetik farklılıklara açıktır. Diğer taraftan somatik embriyolardan elde edilen bitkiler genetik olarak klondurlar (Bourman, 1994). Somatik embriyogenez bitkilerin hızlı çoğaltılmasında, sentetik tohum üretiminde ve transformasyon çalışmalarında önemli bir potansiyele sahiptir. Ancak eksplant kaynağı, genotip, bitki büyüme düzenleyicileri, azot kaynağı ve çevre somatik embriyogenezi önemli ölçüde etkileyen faktörlerdir.

Bitki doku kültürünün, *in vitro* çoğaltıma ek olarak, pek çok uygulama alanı vardır. Örneğin, özellikle kendine döllen bitkilerde yapılan klasik bitki ıslahı melezleri sonrası hatların saflaştırılması uzun zaman almaktadır. Haploit bitki üretiminde anter (polen) ve yumurtalık (ovül) kültürü kullanılarak % 100 homozigot bitkiler elde edilebilmektedir (Maheswari ve ark., 1995). Türler arası melezlemelerden sonra ortaya çıkan uyumsuzluklar *in vivo* melezlemelerde embriyo oluşumunu veya oluşan embriyoların yaşamalarını engelleyebilmekte, bu sorun embriyo kültürü ile aşılabilmektedir. *In vitro* seleksiyon yöntemiyle, tek hücre seviyesinde, tuzluluk, herbisitler, patojenler gibi çeşitli biyotik ve abiyotik faktörlere karşı dayanıklı hücreler seçilebilir ve *in vitro* ortamda bu hücrelerden ilgili faktörlere

karşı dirençli bitkiler yetiştirilebilir. Ayrıca totipotent hücrelerin *in vitro* kültürü, kallus veya süspansiyon şeklinde uzun süreli olarak veya belli aralıklarla yeniden oluşturularak saklanabilir ve ihtiyaç duyulduğunda bu hücrelerden yeni bitkiler elde edilebilir. Böylelikle *in vitro* germplazm korunması sağlanmış olur.

Çizelge 1.1. Bitki doku kültürünün gelişiminde etkili olan bazı çalışmalar (Pierik, 1993).

Tarih	Yapılan Çalışmalar	Araştırmacılar
1902	İlk izole edilmiş hücrelerin kültürü	Haberlandt
1904	Olgun embriyoların kültürü	Hanning
1917	Biyoteknoloji teriminin ilk defa kullanımı	Karl Ereky
1920	Oksinin tanımlanması	Went ve ark.
1922	Kök ve sürgün uçlarının laboratuvarında çoğaltımı	Kotte ve Robins
1924	İlk embriyo kurtarma tekniği (mısır)	Dieterich
1934	İlk sürekli kök kültürleri (domates)	White
1934	İlk kallus kültürleri	Gautheret
1942	İlk kallus kültürlerinden sekonder metabolit eldesi	Gautheret
1946	Sürgün uçlarından (apikal meristem) ilk bitki eldesi	Ball
1953	DNA'nın yapısının belirlenmesi	Watson ve Crick
1954	Hücre süspansyonlarından ilk bitki eldesi	Muir ve ark.
1957	İlk sitokin tanımlanması ve organ oluşumunda sitokin/oksin oranının önemini ortaya konulması	Skoog ve Miller
1958	İlk somatik embriyogenez (havuç)	Steward ve ark.
1960	Enzimler kullanılarak ilk canlı protoplast izolasyonu	Cocking
1962	MS besi ortamının geliştirilmesi	Murashige ve Skoog
1965	Tek hücreden bitki rejenerasyonu	Vasil ve Hilderbrandt
1967	İlk haploit bitkinin üretimi (anter polan kültürü)	Bourgin ve Nitsch
1968	B5 ortamının geliştirilmesi	Gamborg ve ark.
1970	HEPA filtrelerinin kullanılmaya başlaması	-
1971	Protoplastlardan ilk bitki rejenerasyonu	Nagata ve Takabe
1978	Cinsler arası ilk somatik melezleme	Melchers ve ark.
1983	Transgenik ilk bitkinin elde edilmesi (tütün)	Murai ve ark.
1986	Transgenik ilk bitkinin tarla testleri (tütün)	-
1990	Sentetik tohum geliştirme ve hızlı dondurma yöntemiyle germplazm muhafazası çalışmalarının başlaması	-
1995	İlk rekombinant insan gıdası	Flavr Savr (domates)

Doku kültürünün bitkilerin iyileştirilmesinde en önemli ve yaygın olarak kullanılan uygulamalarından birisi de, gen transfer tekniğidir. Bitkilerde transformasyon çalışmaları 1982-1983 yıllarında başlamış ve transgenik bitkilerde aktarılan genin ifadesi, genlerin yapı ve fonksiyonlarının analizi, düzenlenme

mekanizmalarının aydınlatılması gibi temel biyolojik konuların araştırılmasında yeni ve güçlü bir yöntem olarak yerini almıştır (Lamb ve Beachy, 1989). En genel anlamıyla bitkilerde gen aktarımı, fonksiyonel olarak belirlenmiş doğal ya da sentetik nükleik asit dizilerinin bitki hücrelerine genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak (*Agrobacterium tumefaciens* ile transformasyon; kimyasal yöntemler ve elektroporasyon yöntemiyle transformasyon; mikro enjeksiyon ve ya biyolistik ile transformasyon) aktarılmasıdır. Genetik transformasyon, nükleik asit molekülün hücreye girişi (insersyon), genoma bağlanması (entegrasyon), genin ifadesi ve yavru döllere aktarılması aşamalarından oluşur (Hiei ve ark. 1994). Bunlara ek olarak, hastaliksız ('virustan arı') bitki elde edilmesinde meristem kültürleri, sentetik tohum üretimi, sekonder metabolit üretimi gibi doku kültürü temelli pek çok teknik bulunmaktadır (Brown ve Thorpe, 1995).

1.2.1. *In vitro* Çoğaltım

In vitro çoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki parçalarının (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen vb), yapay besi ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanabilir. Eğer bitkilerin uygun besin maddeleri ihtiyacı, hormon ve kültür istekleri yeterince biliniyorsa, *in vitro* çoğaltım tekniği kullanılarak tüm bitki türlerinin üretilmesi mümkündür (Hartman ve Kester, 1975).

Mikroçoğaltım alanında yapılan ilk çalışma 1902 yılında, tek bir hücreden tekrar tam bir bitki oluşturulabileceğini ispatlamaya çalışan botanikçi Haberlandt tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada yalnızca hacim artışı sağlanmış fakat çoğaltım gerçekleşmemiştir. İleri dönemlerde yapılan çalışmalarda bunun nedeninin hücre bölünmesi, gelişmesi ve farklılaşması için gerekli olan bitki büyüme düzenleyicilerinin o yıllarda bilinmeyişiine bağlı olduğu düşünülmüştür. 1934 yılında White adlı araştırmacı, *in vitro* koşullarda B vitaminlerini içeren maya özütü içerisinde domates köklerini geliştirmeyi başarmıştır. 1939 yılında Fransa'da Nobecourt ve Gautheret, Amerika'da ise White birbirlerinden bağımsız olarak kallus dokusunun sürekli olarak kültür ortamında üretilbildiğini göstermişlerdir (Hartman ve Kester, 1975).

In vitro çoğaltım yöntemi, hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal eldesi, kitlesel olarak çoğaltılan bitkilerde fenotipik ve genotipik kararlılık, kısa sürede üretim, zor ve problemlili türlerin daha kolay üretilebilmesi gibi pek çok avantaj sağlayabilmektedir. Bunun yanında, eğitimli personel ve özel laboratuvar koşullarına gereksinim duyulması gibi ekonomik yönden bazı sınırlamaları da beraberinde getirmektedir (Babaoğlu ve ark, 2001).

In vitro çoğaltım, hazırlık, kültür başlangıcı, sürgün çoğaltımı, sürgün gelişimi ve köklendirilmesi, iklimlendirme olmak üzere beş aşamada gerçekleştirilir. Hazırlık aşamasında, sağlıklı bir *in vitro* çoğaltım için, anaç bitkinin genotipi, sağlık durumu ve yetiştirme koşulları (beslenme, ışık, sıcaklık, bitki büyüme düzenleyicilerin uygulanması, yetiştirme mevsimi) dikkate alınmalıdır. Ayrıca bitkinin, bulaş riskini en aza indirmek amacıyla hijyenik koşullar altında yetiştirilmesi, olası fungus ve bakteri bulaşının önlenmesinde etkilidir (Debergh ve Read, 1993).

İkinci aşama kültür başlangıç aşamasıdır. Eksplant seçiminde dikkat edilmesi gereken hususlar şu şekilde sıralanabilir; (i) Bitkilerin toprak üstü organları toprak altı organlarından, bitki içi parçaları bitki dışındaki parçalardan daha az bulaş içerir, (ii) eksplant ne kadar küçükse o kadar az bulaş riski taşır, (iii) eksplantın rejenerasyon yeteneği büyüklüğüne ve yaşına bağlıdır, (iv) eksplantler gelişme döneminin başlangıcında aktif büyüyen sürgünlerden alındığında başarılı sonuçlar elde edilmektedir, (v) anaç bitkinin yetiştirme ortamındaki ışık ve sıcaklık koşulları, beslenme durumu ve yaşı eksplantın büyüme ve gelişmesine etki etmektedir (Werbrouck ve Debergh, 1994).

Üçüncü aşama, sürgün çoğaltım aşamasıdır. Başlangıç aşamasında kullanılan besi ortamına (bazen başlangıç aşamasında kullanılan besi ortamından farklı bir ortam da kullanılabilir) alınan eksplantlar, uygun koşullar altında, yapılan çalışmaya ve eksplantın türüne bağlı olarak kallus, adventif veya aksiller tomucuk oluşturarak gelişmelerini sürdürürler. Bir sonraki aşama sürgün gelişimi ve köklendirme aşamasıdır. *In vitro* çoğaltılan bitki gövdeleri köklenmeyi teşvik edici bitki büyüme düzenleyicileri (İndol butirik asit, indol asetik asit vb. oksin büyüme düzenleyicileri) içeren farklı bir besi ortamına alınırlar. Burada belli bir süre köklenme sağlandıktan

sonra iklimlendirme aşamasına geçilir. Steril koşullarda, düşük ışık yoğunluğunda, yüksek nem içeren ve tüm besin maddelerinin bulunduğu bir ortamda geliştirilen bitkilerin, daha düşük nem, daha yüksek ışık düzeyi ve steril olmayan koşullara sahip dış ortama aktarılması çok dikkat gerektiren bir işlem olup, bunun aşamalı olarak yapılması gerekmektedir (Preece ve Sutter, 1993).

1.2.2. Bitki Büyüme Düzenleyicileri

İn vitro bitki doku, hücre ve organ kültürlerinin besi ortamlarında, çalışmanın amacına (doku farklılaşması ve gelişmesi, klonal çoğaltım, kallus oluşturma, köklendirme, sekonder metabolit üretimi, patojenden arındırılmış bitki eldesi, germplazmanın uzun veya orta süreli saklanması vb.) bağlı olarak farklı bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmaktadır.

Bitki büyüme düzenleyicileri, düşük moleküler ağırlığa sahip bileşenlerdir ve bitkilerde büyüme, gelişme ve üreme gibi olayların düzenlenmesinden sorumludur. Bunlar bir dokuda sentez edilip ilgili dokuya taşınabilen ve çok küçük derişimlerde etkili olabilen maddelerdir. Temel olarak, bitki büyüme düzenleyicileri hücre bölünmesi, hücre uzaması ve hücre farklılaşması gibi faaliyetlerin düzenlenmesini içerir. İlk keşfedilen bitki büyüme düzenleyicileri oksinlerdir. Daha sonra, gibberellinler, sitokininler, absisik asit ve etilen tanımlanmıştır. Bu beş bitki büyüme düzenleyici grubu en çok bilinenlerdir. Bunlara ek olarak, poliaminler, oligosakkarinler, salisilatlar, jasmonatlar listeye yeni eklenenlerdir ve yenileri de eklenmeye devam etmektedir (Çizelge 1.2). Birkaç bitki büyüme düzenleyicisi, ilk olarak mantarlarda keşfedilmesine rağmen, daha sonra az ya da çok miktarda da olsa kriptogamlar da dahil bitkilerin çoğunda tespit edilmiştir (Gamborg ve ark., 1976; Vasil ve Thorpe, 1994).

1.2.3. Sentetik Tohum Teknolojisi

Sentetik tohum teknolojisi ilk olarak 1977 yılında Murashige adlı araştırmacı tarafından 'doğal tohumların yerine geçebilecek bir sistem olarak, somatik embriyoların bir matriks ('kapsül') içinde enkapsüle edilerek kullanılması' şeklinde öne sürülmüştür (Redenburg ve ark., 1988).

Çizelge 1.2. Bitki büyüme düzenleyicilerinin gruplandırılması, fonksiyonları ve en yaygın kullanılanları (Gaspar ve ark., 1996; Haberer ve Kieber, 2002)

Bitki Büyüme Düzenleyicisi	Fonksiyonu	En Yaygın Kullanılanlar
Sitokininler	<ul style="list-style-type: none"> - Hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma, rejenerasyon ve sürgün çoğaltımı - Çiçeklenmenin geciktirilmesi - Yaprak dökülmesinin engellenmesi - Sürgünlerde köklenme ve embriyogenezin engellenmesi - Çimlenmenin artırılması - Yaşlanmanın geciktirilmesi 	<ul style="list-style-type: none"> - BAP/BA (benzilaminopürin/benziladenin) - KIN (kinetin) - Adenin Sülfat - 2iP (izo pentil adenin) - TDZ (thidiazuron) - Zeatin
Oksinler	<ul style="list-style-type: none"> - Köklenmenin teşvik edilmesi - Apikal dominans - Işığa yönelme - Yan sürgün gelişiminin baskılanması - Hücre gelişimi - Kallus oluşumunun uyarılması, hücre süspansiyonlarının eldesi ve somatik embriyo oluşumu - Kallus oluşumu, organogenez ve somatik embriyo oluşumu (sitokininlerle birlikte) 	<ul style="list-style-type: none"> - IBA (indol butirik asit) - IAA (indol asetik asit) - 2,4-D (2,4-diklorofenoksi asetik asit) - NAA (naftalen asetik asit)
Gibberellinler	<ul style="list-style-type: none"> - Meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılması - Sürgün boyunun uzaması - Kallus gelişimini, organogenez ve adventif kök oluşumunun engellenmesi - Bitkilerde çiçeklenmenin artırılması 	<ul style="list-style-type: none"> - GA₃ (Gibberellik asit)
Absisik Asit	<ul style="list-style-type: none"> - Somatik embriyoların olgunlaşması - Yaprak ve meyve dökülmesi (absisyon), - Dormansi - Stomaların kapanması 	<ul style="list-style-type: none"> - ABA (Absisik asit)
Etilen	<ul style="list-style-type: none"> - Meyve olgunlaşması, senesens ve yaprak absisyonunun teşvik edilmesi - Yüksek derişimlerde, mikrotübül ve mikrofibrillerin yerleşimlerini etkileyerek, hücre uzamasının azaltılıp, hücre genişlemesinin artırılması - <i>İn vitro</i> kültürlerde, alt kültür sonrasında zamana bağlı olarak, büyüme ve organogenezin inhibe edilmesi - Kallus ve süspansiyon kültürlerinde büyümede, gövde ve kök uzaması, aksillar ve adventif tomurcuk oluşumu, embriyogenez 	
Diğer	<ul style="list-style-type: none"> - Poliaminler (polen olgunlaşması, vejetatif sürgün formasyonu, köklenme ve somatik embriyogenez). - Oligosakkarinler (oksin varlığında kallus oluşumunun teşvik edilmesi, oksin yokluğunda yan kök sayısında artış sağlanması (örneğin, buğday embriyo kültürlerinde) - Salisilatlar (çiçeklenme ve tuber oluşumunun uyarılması, bazı patojenlere karşı hastalık direncinin oluşturulması için sistemik sinyaldir, çimlenmenin inhibe edilmesi) - Jazmonatlar (patates meristem kültürlerinde tomurcuk formasyonunun teşvik edilmesi, rizogenezin uyarılması ve kallus oluşumunun geciktirilmesi) 	

Buna göre, yöntem, klonal çoğaltım ve tohumla çoğaltımın avantajlarını birleştiren bir yaklaşımdır. Sentetik tohum, kısır ya da kararsız genotipe sahip, genetik yapısı değiştirilmiş bitkilerde, tohum verimliliği indirgenmiş, elle

tozlaştırılan hibritlerde ve seçkin germplazmaların kurtarılması gibi pek çok alanda potansiyel kullanıma sahiptir. Sentetik tohumun büyüklüğü ve somatik embriyoyu çevreleyen kapsülün kalınlığı, saklama, taşıma, aktarma ve ekim için avantajlar sağlamaktadır (Redenburg ve ark., 1988).

Embriyoların kaplanmasında kullanılan materyal, taşıma ve ekim sırasında embriyoyu koruyacak nitelikte olmalı ve çimlenme ve bitki gelişimini engellememelidir. Ayrıca, kaplama materyali, besin maddelerini ve diğer kimyasalları tutma ve gerektiği zaman bırakma özelliğine de sahip olmalıdır (Redenburg ve ark., 1986). Somatik embriyoların enkapsüle edilmesinde kullanılan en yaygın hidrojel sodyum aljinattır. Sodyum aljinat uygun viskozite ve hızlı jelleşme özelliğine sahiptir, ayrıca bitki için toksik değildir (Onishi ve ark., 1994).

1.2.4. *İn vitro* Doku Kültürlerinde Somaklonal Varyasyon

Somaklonal varyasyon, somatik doku kökenli kallus, hücre ve protoplast kültürlerinden rejenere olan bitkiler arasında ortaya çıkabilen, genetik kökenli değişikliklerdir (Evans, 1988). Somaklonal varyasyon, sitolojik anomaliler, kalitatif ve kantitatif fenotipik mutasyon sıklığı, dizi değişimi, gen aktivasyon ve susturulması sonucunda görülebilir. (Kaeppeler ve ark., 2000). Somatik hücrelerin *in vitro* rejenerasyonu mitoz bölünme ile gerçekleşmektedir ve bu bir eşeysiz üreme şeklidir. Klonal çoğaltım amacı ile kullanılan teknikler *in vitro* çoğaltım teknikleri olarak ifade edilmektedir. Amaç, aynı genetik yapıda bitkileri üretmektir. Ancak, bu tekniklerde beklenmeyen ve kontrol edilemeyen varyasyonlar da ortaya çıkabilmektedir. Bu tür varyasyonlar doğal olarak meydana gelmektedir ve bunlar ya hücrelerdeki genetik değişimler ya da hücre ve dokulardaki geçici değişimler olarak ifade edilmektedir. *İn vitro* çoğaltım amaçlı yürütülen çalışmalarda varyasyonlar genellikle istenmez. Bu nedenle *in vitro* çoğaltımda en güvenilir doku kültürü tekniklerinin kullanılması (örneğin, mikroçoğaltım) büyük önem taşımaktadır. Fakat yine de hangi teknik kullanılırsa kullanılsın, *in vitro* çoğaltım süresince genetik değişimin ortaya çıkma olasılığı her zaman bulunmaktadır. Kültüre alınan hücrelerde yaygın olarak görülen ve *in vitro* çoğaltımda istenmeyen bu fenotipik ve genotipik varyasyonlar bitki ıslahında büyük önem taşımaktadır. Bitki ıslahında doğal varyasyonun daraldığı veya varyasyon meydana getirmenin zor olduğu durumlarda

avantajlı olarak değerlendirilen bu varyasyon, yeni bir kaynak olarak görülmekte ve doku kültürlerinde ortaya çıkan bu kalıtsal değişikliklerin tümü “somaklonal varyasyon” olarak tanımlanmaktadır (George, 1993).

1.2.4.1. Genetik Kararlılığın RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) Belirteçleri ile Belirlenmesi

Bitkiler arasındaki akrabalık derecelerinin belirlenmesi için giderek artan modern biyoteknolojik çalışmalar, bitki koruma programlarında önemli bir role sahiptir. Günümüzde moleküler belirteçler kullanılarak yapılan genetik yapı ve çeşitlilik analizi çalışmaları, ayrı coğrafik bölgelerdeki populasyonlar arasında genetik benzerlik derecelerinin, yakın akraba populasyonlar arasında herhangi bir genetik varyasyon olup olmadığının, bir kültür ortamında türün korunması için hangi kaynaklardan yararlanılabileceğinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Dittbrenner ve ark, 2005).

Biyolojik ve farmasötik karakterleri oluşturan morfolojik farklılıklar, çevresel ve/veya genetik faktörlerin etkisi altındadır (Hay ve Waterman, 1993). Son yıllarda, DNA temelli moleküler belirteçler, pek çok bitki türünün germplazmalarındaki genetik farklılıklarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. İzoenzim veya allozimlere (İzoenzim bir veya birden fazla lokus tarafından kodlanan enzimlerin fonksiyonel olarak benzer fakat ayrılabilen formlarıdır. Aynı lokusta farklı allellerin ürünü ise alloenzim olarak isimlendirilir) göre daha fazla sayıda belirteç sağladıkları için, çeşitli DNA belirteçlerinin bitki araştırmalarında kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'na dayanan RAPD tekniğinde, türler arası farklılıkların belirlenmesi için çoğunlukla özgül olmayan primerler kullanılır. Hedef türlerde dizi bilgisi gerektirmediği için tercih edilen bu yöntem, özellikle üzerinde daha önceden hiçbir moleküler çalışma yapılmamış ya da oldukça az bir araştırmanın yapıldığı bitki çeşitlerinin genetik analizleri için uygundur. Laboratuvarlar arasında tekrar edilebilirliğinin zor olmasına karşın, çabuk sonuç vermesi, maliyetinin düşük olması, az iş gücü gerektirmesi, az miktarda ve göreceli düşük kalitede DNA' nın yeterli olması, ayrıca elde edilen polimorfizm oranının yüksek olması gibi üstünlükleri nedeniyle, RAPD tekniği yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisidir (Walton, 1993).

Bitki doku kültürü çalışmalarında, özellikle de kallus fazını takip eden indirekt organogenez gibi doğrudan olmayan bitki rejenerasyonun teşvik edildiği yöntemlerde, genetik olarak farklılaşmış bitkilerin üretilmesine neden olan ve “farklılaşmamış hücre proliferasyonu sırasında *de novo* olarak ortaya çıkan değişiklikler (Munthali ve ark., 1996)” şeklinde tarif edilen somaklonal varyasyonların oluştuğu iyi bilinen bir gerçektir (Kaeppeler ve ark., 2000). Geliştirilen çeşitli bitki doku kültürü yöntemleri içinde aksiler tomurcukların doğrudan rejenerasyonuna dayanan “mikroçoğaltım” yöntemi, nispeten daha düşük oranda genetik değişiklik riski taşıdığından, günümüzde en önemli bitki çoğaltım tekniği olarak kabul edilmektedir (Sciioofs, 1992). Bununla beraber, kültürlerin uzun süreli alt kültürlenmesinin strese bağlı mutasyonları teşvik edebileceği ve bunun sonucunda da somaklonal varyasyonların gözlenebileceği göz ardı edilmemelidir (Kawiak and Lojkowska, 2004).

Sunulan tez çalışmasının başlıca amaçlarından biri, kekik bitkisinin mikroçoğaltılmasında elverişli ve genetik olarak kararlı yöntemlerin optimize edilmesi ve elde edilen klon bitkilerde genetik kararlılığın doğrulanmasıdır. Olası somaklonal varyasyonların belirlenmesi, bitki materyalinin klonlanması ve germplazmasının uzun süreli saklanmasında oldukça önemlidir. Tez çalışması kapsamında, mikroçoğaltım sonucu elde edilen klon bitkilerde genetik kararlılık, RAPD moleküler belirteçleri kullanılarak incelenmiştir. Ulaşabildiğimiz güncel literatür bilgisine göre *in vitro* çoğaltılan kekik bitkisinin genetik kararlılığının RAPD moleküler belirteçleri ile doğrulandığı bir çalışma bulunmadığından, sunulan tez önerisi bu anlamda da bir ilk olacaktır.

1.3. Germplazmanın Orta Dereceli Saklanması

Orta dereceli saklama terimi, düşük sıcaklık ya da suni osmotik basınç altında büyümenin gözle görülür derecede indirgenmesi anlamına gelir. Orta süreli saklamada temel amaç, kültür ortamında (besiyeri içeriği) ve kültür şartlarında (sıcaklık, ışık) yapılan birtakım değişikliklerle, kültürlerin canlılıklarında ve genetik kararlılıklarında herhangi bir kayıp olmadan, besiyeri gereksinimlerini azaltarak, alt kültür sürelerini uzatmaktır. Dolayısıyla yöntem yavaş büyütme olarak da tarif edilir. (Lambardi ve ark., 2009).

Besiyeri içeriğindeki tuz konsantrasyonlarını azaltarak (White, 1934) bitki büyümesi yavaşlatılacağı gibi, içeriği indirgenmiş (besiyerindeki mikro ve makro element konsantrasyonları azaltılmış) besiyerleri ile şeker miktarında yapılan değişiklikler, genellikle tercih edilen sukroz yerine mannitol gibi ozmotik aktif şeker alkollerinin kullanılması (Staritsky ve Zandvoort, 1985), büyüme düzenleyicisi miktarlarının azaltılması (Dussert ve ark., 1997), bu amaca yönelik yaklaşımlara örnek teşkil etmektedir. Besiyeri değişimleri dışında kültürlerin sıcaklığın düşürülmesi de orta süreli saklama yöntemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Orta dereceli saklamaya yönelik çalışmalardan bir diğeri de eksplantların sentetik tohum oluşturularak saklanması şeklindedir. Örneğin, eksplantlar %2 veya %3 sodyum aljinat içeren çözeltilerle enkapsüle edilerek besiyeri ihtiyaçları azaltılabilir ve düşük sıcaklıklara karşı toleransları artırılabilir. *Cedrela fissilis* bitkisinin sentetik tohumları, 25°C' ta ve 25 µmol ışık şiddetinde 9 aya kadar saklanabilmiştir (Nunes ve ark., 2003). Bir başka çalışmada, *Photinia fraseri* ve *Nerium oleander* sentetik tohumlarının petrilere, 3 farklı koşulda orta süreli saklanması denenmiştir. Birinci sette sentetik tohumlar boş petrilere, ikinci sette, steril distile suyla ıslatılmış steril filtre kağıtlarına ve üçüncü sette bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı-katı MS besiyeri üzerine yerleştirilmiştir. 3 ay boyunca +4°C' ta saklanan kültürlerde, saklama sonrası en yüksek çimlenme oranının yarı-katı MS besiyerinde saklanan örneklerden elde edildiği görülmüştür (Özden-Tokatlı ve ark. 2008).

Orta dereceli saklama için kullanılan kültür kapları da önemli bir faktördür. Kullanılan farklı tipteki kültür kaplarının gaz geçirgenlik oranları, kültürlerin hava ile teması ve alt kültür periyodunda açığa çıkan gazlar açısından, orta süreli saklama üzerinde etkilidir. Rosa Sant'Antonia di Padova ve Domenica adlı iki farklı gül varyetesi ile yapılan çalışmada, hava geçirgenlikleri farklı seviyelerde olan 3 farklı kültür kabının (gaz geçirgen olmayan 500 ml hacimli cam kültür kapları, 80 cc hacimli yarı geçirgen plastik silindirler ve gaz geçirgen Starpac[®] plastik torbalar), kültürlerin orta süreli saklanmasına etkileri gözlenmiştir. +4°C' ta 6 ay orta süreli saklamanın ardından standart kültür şartlarına aktarımdan sonra, en yüksek geri kazanımın %80 ile cam kültür kaplarında olduğu ve gelişen gövde kültürlerinin de sağlıklı olduğu gözlemlenmiştir. Starpac[®] ve plastik silindirlerde ise düşük geri

kazanım ve kültürlerde anormallikler göze çarpmıştır. Ayrıca orta dereceli saklama sırasında cam kültür kaplarında birikmiş olan CO₂ seviyeleri incelendiğinde % 0,4' ün üzerine çıkmadığı görülmüştür. Bu da, CO₂ seviyesi solunum belirteci olduğundan, gövde kültürlerinin büyüme hızlarının yavaşladığını gösteren en belirleyici kanıttır (Previati ve ark. 2008).

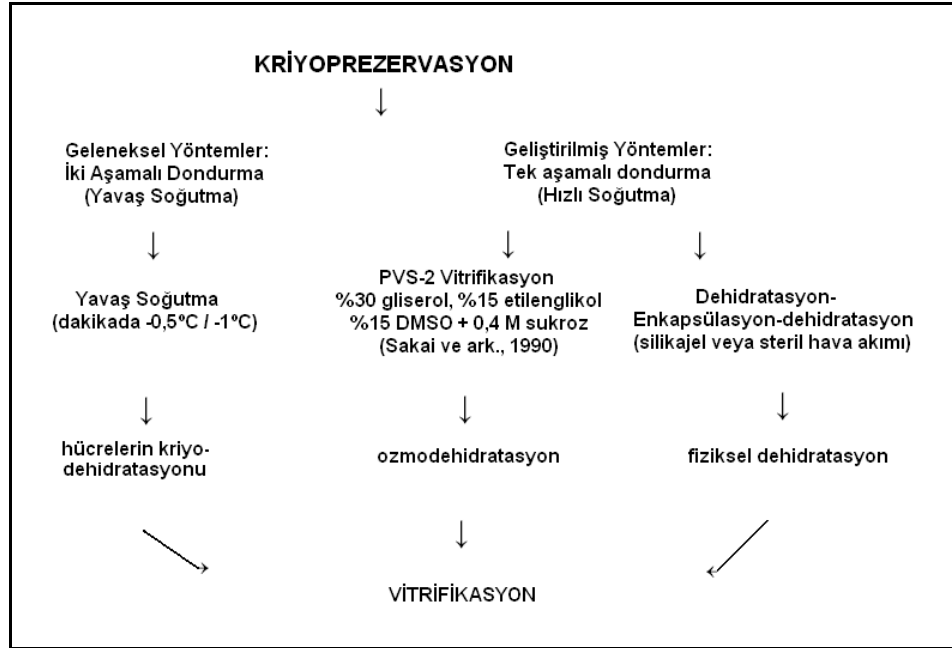
1.4. Germplazmanın Uzun Süreli Saklanması (Kriyoprezervasyon)

Bitki biyolojik çeşitliliğinin korunması, “genetik erozyon” veya kaybolma riski taşıyan bitki tür, form ve çeşitlerinin güvence altına alınması işlemidir. Nispeten kısa süreli bir saklama sağlayan in vitro koruma yöntemlerinde, stokların korunmasının ekonomik olmaması, görece geniş alanlar gerektirmesi, kontaminasyon ve somaklonal varyasyon riski gibi problemlerle karşılaşılabilir. Buna karşılık, 1900'lü yılların sonlarında geliştirilmiş olan ve bitki parçalarının ultra düşük sıcaklıklarda (-196°C), sıvı azot içinde saklanması anlamına gelen “kriyoprezervasyon” yöntemi bitki germplazmasının uzun süreli korunması için günümüzdeki en uygun yöntemdir. Kriyoprezervasyon, sıvı azot içindeki ultra düşük sıcaklıklarda biyolojik materyallerin neredeyse tüm metabolik fonksiyonlarının yavaşlatılması temeline dayanır ve gövde ucu, nodal tomurcuklar, tohumlar, sentetik tohumlar, somatik veya zigotik embriyolar ve kallus gibi pek çok doku ve organ tipine uygulanabilir (Lambardi ve De Carlo, 2003). Bununla beraber, yöntemin başarılı olabilmesi için, denenen her yeni bitki türü, hatta her yeni çeşit için optimize edilmesi gerekmektedir (Charoensub ve ark., 2004).

Tekniğin ilk geliştirildiği yıllarda, oldukça pahalı ve karmaşık, kontrollü soğutma cihazlarının kullanımını gerektiren, iki-aşamalı dondurma teknikleri kullanılmaktaydı. Bu yöntemde örnekler hücre içi homojen buz oluşumunun gerçekleştiği -35/-40°C' a kadar, dakikada yaklaşık 0.5-1°C soğutulmayı takiben sıvı azota aktarılmaktadır (Reed ve Uchendu, 2008). Ancak günümüzde, kriyoprezervasyon konusundaki gelişmeler sonucunda, nispeten daha kolay uygulanabilir ve pahalı dondurucular gerektirmeyen, vitrifikasyona dayalı tek-aşamalı dondurma tekniklerinin kullanımı mümkündür (Engelmann, 2004). Yöntem, örneklerin sıvı azota doğrudan aktarımı yoluyla sıcaklığın oldukça hızlı düşürülmesi sırasında, hücre vitrifikasyonunun teşvik edilmesi, diğer bir deyişle bitki hücre ve

dokuları için ölümcül olabilen hücre içi buz oluşumunun engellenmesi amacıyla sitozolün, çeşitli yöntemlerle camı, amorf bir hale dönüştürülmesi temeline dayanır (Şekil 1.2).

Tek aşamalı dondurma yöntemlerinde vitrifikasyon başlıca iki şekilde indüklenebilir: (i) yüksek derişimde kriyokoruyucu çözeltilerle (örneğin PVS2) muamele yoluyla kimyasal olarak (vitrifikasyon/tek aşamalı dondurma; Sakai ve ark., 1990), veya (ii) bitki parçalarının (çıplak veya sentetik tohumlar halinde enkapsüle edilmiş olarak) laminar akımlı kabin içinde hava akımına maruz bırakılması veya silika jel üzerinde kurutulması yoluyla fiziksel olarak (dehidratasyon/tek aşamalı dondurma; Fabbre ve Dereuddre, 1990). Su içerikleri iki yöntemden biri ile azaltılan örnekler daha sonra doğrudan sıvı azota aktarılır. En az bir saat sıvı azot içinde tutulan örnekler (1 saat sıvı azotta tutulma sonucunda, hücre içindeki tüm metabolik reaksiyonların neredeyse tamamen baskılandığı belirlenmiştir (Chang ve ark., 2000). Buna göre, 1 saatin üzerindeki tüm saklama süreleri aynı kabul edilir. Daha sonra önceden ısıtılmış (38-40°C) su banyosunda hızla çözüldükten sonra bitki gelişiminin teşvik edilmesi için rejenerasyon besiyerine aktarılarak standart kültür şartlarına alınır.



Şekil 1.2. Kriyoprezervasyon çalışmalarında kullanılan, vitrifikasyon tekniğine dayalı geleneksel (iki aşamalı dondurma-yavaş soğutma) ve geliştirilmiş (tek aşamalı dondurma- hızlı soğutma) yöntemler (Benson, 2008).

Bitkilerde germplazma koruma çalışmaları, sadece yiyecek, kağıt, odun ve tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin değil, aynı zamanda nadir ve tehlike altındaki bitki türlerinin de korunmasını hedefler. Pek çok önemli zirai bitkinin kriyoprezervasyon teknikleriyle, germplazmalarının koruma altına alınması, tüm dünyada yaygınlaşmaya başlamıştır. Kriyoprezervasyon teknikleriyle koruma altına alınan bu bitkilerden bazıları ve kullanılan yöntemler Çizelge 4'te verilmiştir. Diğer pek çok bitki türünün germplazmalarının kriyoprezervasyon teknikleriyle koruma altına alınmasına yönelik çalışmalar ise halen devam etmektedir (Reed, 2002).

Kriyoprezervasyon için seçilebilecek her bir yöntemin başarılı olmasını sağlayacak bazı temel basamaklar bulunmaktadır. Genellikle laboratuvarın sahip olduğu imkanlar, personel, cihaz, tecrübe ve çalışmada kullanılacak bitki materyalinin özellikleri, hangi tekniğin en elverişli olduğunun belirlenmesinde etkili olur.

Kriyoprezervasyon, donma sırasında hücre için olümcül olabilen, hücre içi su içeriğinin mümkün olduğunca uzaklaştırılması temeline dayandığından, kriyoprezervasyon yöntemlerine değinmeden önce, suyun bazı fiziksel özelliklerin bilinmesi önemlidir.

1.4.1. Suyun Fiziksel Özellikleri

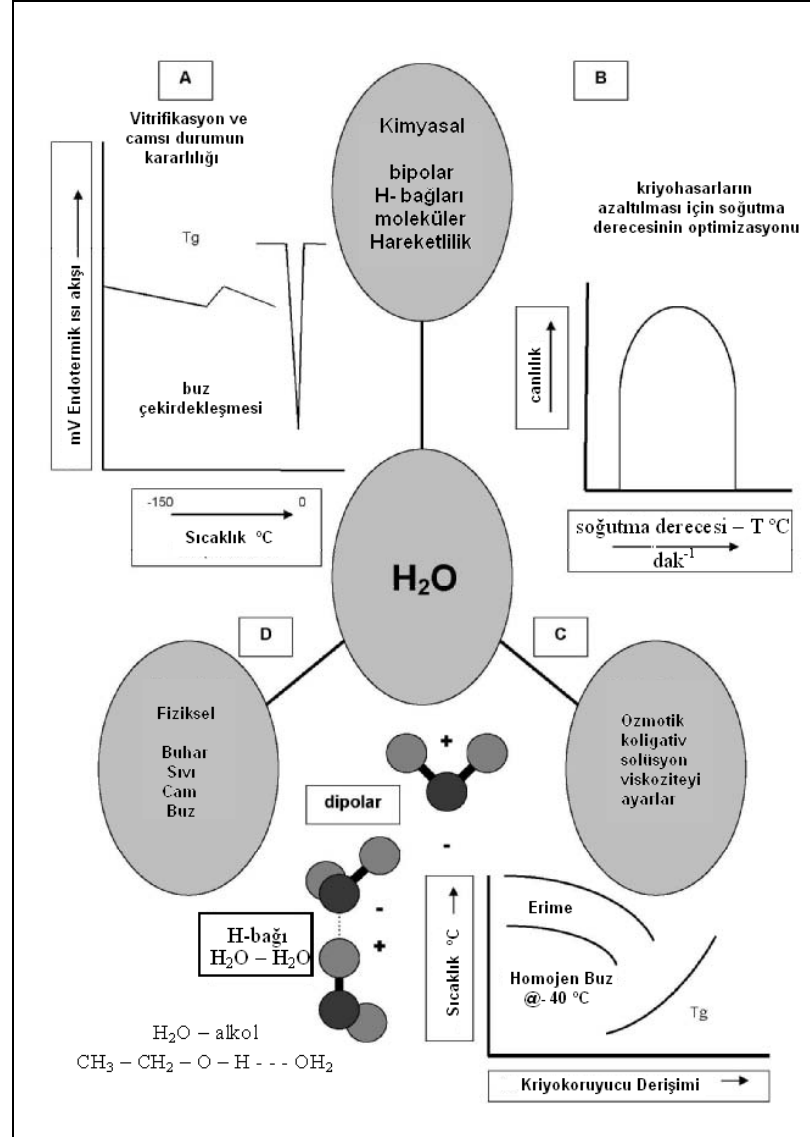
Doğal çözücü olan suyun, dokuların ve hücrelerin sıvı azotla etkileşiminden sonra, canlılık üzerindeki etkisi oldukça önemlidir. Çok küçük bir molekül olmasına rağmen su, davranış ve yapı bakımından çok karmaşık ve anormal özellikler sergiler ve bu yapısı suyun yaşam üzerindeki rolünün oldukça önemli olmasını sağlar. Bu durum, suyun polar, elektrostatik, birbirine bağlı, solvent, tampon ve termal sabitleme özellikleriyle ilgilidir. Suyun sıvı ve donmuş hallerinin davranışları büyük ölçüde suyun bipolar kimyası tarafından belirlenir. Sudaki hidrojen atomları hafif bir net pozitif yük taşır ve suyu iki kutuplu yapmak için eşleştirilmemiş "negatif yüklü" oksijen elektronları ile beraber hareket eder. Bu tetrahedron geometrinin farklı bölümlerinde hem pozitif hem de negatif yüklü bölgeler yer alır. Suyun oksijen atomundaki yalın elektron çiftleri ve ikili kutuplaşmış hidrojenler, arada hidrojen bağının kurulmasını sağlar. Su moleküllerinin birbirleriyle nasıl ilişkilendirileceği H-

bağından etkilenir. Komşu moleküllerin yönlendiğiyle, kısmen pozitif yüklü H atomları kısmen negatif yüklü oksijen atomu ile aynı hizaya geçer. Sıvı formundaki su diğer komşu su molekülleri ile elektrostatik etkileşime girdiğinde, birçok sıvıdan daha az düzensizdir (Benson, 2008).

Suya çekilen moleküller hidrofilik yapıdayken, itilen moleküller ise hidrofobiktir. Membranlardaki hidrofobik lipid oluşumu, hücrelerin bölümlere ayrılmış yapısını belirler. Su kitleleri H-bağları nedeniyle son derece tutarlı, gerilim altında kırılmaya karşı direnebilecek sağlam bir kapasiteye sahiptir. Bitkilerdeki bu uyumlu kuvvetler bütünlüğü ve suyun hareketi vasküler dokulara destek olur; bunlar, terleme ve yüzeyden buharlaşma yoluyla topraktan bitkiye besini ulaştıran biyolojik kanallardır. Elektriksel yapısı nedeniyle, bireysel iyonlar ya da moleküller etrafında "hidrasyon kabukları"nın içindeki su kümelenir. Bu hidrasyon durumu, H₂O moleküllerinin çözelti ile ilişkili sayısını belirtir. Su böylece sıvı haldeki çözülmüş maddeleri tutar (Benson, 2008).

Su ve çözünen madde arasındaki ilişki, bir sistemin kolligatif özellikleri ve özellikle hücredeki çözülmüş çözelti konsantrasyonunu tanımlar. Bununla birlikte, bir sistemin osmotik özellikleri, çözücünün yarı geçirgen zardan geçişi (ama çözülmüş maddenin değil) ile tanımlanır. Osmotik basınç, yarıgeçirgen zardan çözücünün akışını önlemek için uygulanması gereken basınçtır. Bu şekilde ayrıştırılan solüsyonları moleküler konsantrasyon açısından dengelemek gerekir. Su daha zayıf bir solüsyondan güçlü olana doğru akar, denge kurulduğunda, çözeltiler izotonik olarak adlandırılır. Yıkama solüsyonu hücreden daha düşük çözünen içeriğine (çözüntü içeriği) sahip olacağından, hücrelerin şişmesine neden olan solüsyonlar hipotoniktir. Bitkilerde hücresel şişme, turgor basıncı sonucu, bu şekilde oluşur. Bu durum merkezi vakuolün su alarak şişmesinden etkilenir ve sitoplazmanın genişlemesiyle ve plazma zarının katı hücre duvarına bastırmasıyla gözlemlenir. Hayvan hücrelerinin aksine, hücre duvarının tutması nedeniyle hipotonik bitki hücreleri genelde patlamaz. Aksine, bitkileri dik tutması nedeniyle turgor basıncı bitkilerin önemli bir yapısal özelliğidir. Hücrelerin küçülmesine neden olan çözeltiler ise hipertonic yapıdadır, yani hücreden daha yüksek çözünen düzeyine sahiptir. Bir bitki hücresi hipertonic bir çözeltinin içine konduğunda hücre zarı ortadan kaybolur. Özetlemek gerekirse su, hücre işlevi için temel olan, benzersiz fizyo-

kimyasal özelliklere sahiptir. Kriyobiyojik manipülasyonlar suyun değişik hallerini etkileyerek, kriyoprezervasyon ve saklama kararlılığında önemli bir görev üstlenmesini sağlar (Şekil 1.3; Benson, 2008).



Şekil 1.3. Suyun özellikleri ve suyun kriyokoruma sırasında önemi: (A) vitrifiye durumunun kararlılığının belirlenmesinde, cama geçiş sıcaklıklarında (T_g), çözme ve soğutmada buz çekirdekleşmesi oluşumunda termal analizlerin kullanılması; (B) Hüresel yıkımın en aza indirgenmesi için soğutma oranlarının optimizasyonu ve Mazur (2004) tarafından önerilen kriyohasarlardan iki faktörü teorisi ve ters çevrilmiş “U” ile ifade edilen canlılığın artırılması; (C) biyolojik bir çözücü olarak suyun, T_g , erime ve buz çekirdekleşmesi üzerindeki kriyokoruyucu derişiminin etkileri bir faz diyagramı ile örneklendirilmiştir; (D) suyun kimyasal özellikleri, bipolar karakteristikleri, kendi arasında ve diğer moleküllerle hidrojen bağları (örneğin kriyokoruyucuya eklenen poliöl, alkol ve şekerler gibi) (Benson, 2008).

1.4.2. Su ve Buzun Termal Özellikleri

Belirli bir maddenin sıcaklığı onun moleküler hareketinin ya da "enerjisinin" bir ölçüsü olarak düşünülebilir. Sıvı haldeki suda bulunan çok sayıdaki H-bağları, hücre içindeki büyük ısı dalgalanmalarını dengeler ve sucul ortamlarda yaşayan organizmalarda sıcaklığın etkilerini kararlı kılar. Sıvı haldeki su dinamik bir yapıya sahiptir ve diğer moleküller ile ortak yüzeylerde, H-bağları sürekli kırılır ve tekrar oluşturulur. Eğer büyük miktarda enerji sistemi etkilerse veya diferansiyel nem oranına maruz kalırsa (örneğin, güçlü kurutucular ve havayla kurutma), H-bağları kırık hallerinde kalır ve moleküller buharlaşma yoluyla dışarı atılır. Uygulanan enerji, sıvı haldeki suyu buhara dönüştürür ve moleküller dışarı çıktığında, açığa çıkan enerjiyi beraberlerinde götürürler, bu da yüzey sıcaklığını düşürür.

Bunun aksine 0°C veya 0°C' in altındaki sıcaklıklarda, H₂O H-bağlarının kırılmasına direnç gösterir ve moleküller birbirine kafes benzeri bir simetri içinde kilitlenir. Bu yapının daha sıkı bölümleri arasında "açık alan" cepler oluşturur. Buzun yoğunluğu sıvı sudan daha düşüktür. Bu da, buz tabakalarının sucul alanların yüzeye yakın kısımlarında oluşmasına neden olur. Bu buz tabakasının altı, suyun sıvı faz yalıtımı görevi görür ve sucul organizmaları donmaya karşı korur (Benson, 2008).

1.4.3. Buz Çekirdekleşmesi

Buz kristallerinin oluşmaya başladığı noktaya "çekirdekleşme" noktası da denir. Bu durum, bir sistemin termal özellikleri H ve O moleküllerinin öncül buz kristali oluşumunu başlatarak yeterli miktarda H-bağı kurmak için biraraya gelmesiyle gerçekleşir. Suyun 0°C' ta donduğuna inanılmaktadır, ancak aslında bu nadiren görülen bir durumdur (Benson, 2008).

H ve O moleküllerinin biraraya gelmesini sağlayan etkenlerin yokluğunda, su hızla sıfırın altındaki donma noktasına erişir. Biyolojik sistemlerin çoğunda, homojen buz çekirdekleşmesi noktası için mümkün olan en düşük süper soğuma sıcaklığı yaklaşık -40°C' tir. Bu sıcaklıkta su molekülleri, kristal oluşturabilmek için termodinamik olarak büyüme kapasitesine sahip kritik boyutta bir "öncü buz"

oluşturur. Bu, düzenli bir matriks oluşturur ve buz oluşurken açığa çıkan enerji nedeniyle ortama ısı verilir. Buz oluşturmak için, sıvı su sistemden çıktıkça, katılar daha derişik hale gelir. Bu da daha fazla buz oluşturmak için gerekli olan sıcaklığın daha da düşmesine neden olur (Şekil 3 A, C; Benson, 2008).

Homojen buz oluşumu sıcaklığının üstündeki sıcaklıkta suyun donma sıcaklığı giderek artarak ötektik (maksimum erime yeteneği olan) olarak adlandırılan bir noktaya düşer. Bu aşamada, tüm sistem katılaşı ve mevcut suyun tümü donmuş olduğu için başka bir değişiklik görülmez. İki veya daha fazla katının karışımının (mesela bir alaşımın) erime noktası, karışımı oluşturan unsurların görece oranlarına bağlıdır. Bir ötektik veya ötektik karışım erime noktasının olabildiğince düşük olduğundaki karışım oranlarıdır ve ayrıca karışımı oluşturan tüm unsurlar bu sıcaklıkta sıvılaşımış akıcı solüsyondan eş zamanlı olarak kristalleşir. Ötektik bir karışımın böylesi eş zamanlı kristalleşmesi ötektik reaksiyon (tepkime), bunun gerçekleştiği sıcaklık ötektik sıcaklık ve bunun meydana geldiği bileşim ve sıcaklık ötektik nokta olarak adlandırılır. Ötektik, sıcaklık ve konsantrasyon için koordinatlara sahiptir ve bu durum katı çözeltiler oluşturma özelliğine sahip iki veya daha fazla maddenin diğlerinin donma noktasını düşürmesiyle ilişkilidir. Başlangıçtaki buz çekirdeklenmesinden sonra, buz kristalleri karmaşık kümeler oluşturma yeteneğine sahip olur ve su molekülleri birbiriyle gruplaşarak giderek daha karmaşık bir ağ oluşturur. Hücre içi ve dışındaki buz çekirdeklenmesinin olası etkileri Muldrew ve ark. (2004) ve Mazur (2004) tarafından tartışılmıştır. Buna göre, buz çekirdeklenmesi yapısal, ozmotik, fiziksel ve mekanik yaralanmalara neden olur ve hücre bütünlüğünü olumsuz etkiler. Aşırı çözünme derişimlerinde, hücre fonksiyonu tehlikeye düşüren koligatif (hücre içine girebilen) hasar meydana gelir (Benson, 2008).

Kriyoprezerve edilmiş olan bitkilerde, hücre içi ve hücre dışındaki bileşenlerin buz kristali oluşturma yeteneğinde görülen farklılıklar kriyo-hasarların oluşmasında rol oynayan faktörlerdir. Donma genellikle enerjik ve fiziksel olarak (buz kalıplarının mevcut olması bakımından) daha uygun olduğunda gerçekleşir. Çok hızlı dondurucu dereceler dışında, buz tercihen hücre dışında oluşur. Bu modelde,

hücrenin kısmen donmuş dış kısmıyla, donmamış iç kısmı arasında bir açık oluşur ve su molekülleri ozmotik denge kurmak için dışarıya göç eder. Sürekli olarak bu işleme maruz kalan hücreler küçülür ve su kaybının oranı hücrenin fonksiyonu olarak ifade edilebilir. Ozmotik değişim ve plazma zarının geçirgenliği de difüzyon yoluyla ve su moleküllerinin aquaporin gözeneklerinden geçişiyle suyun hareketini etkiler (Tyerman ve ark. 2002).

1.4.4. Geleneksel Kriyokoruma Tekniği (Yavaş Soğutma – Kontrollü Soğutma)

Yavaş soğutma (Kontrollü soğutma) yöntemi, dokuların kriyoprezervasyonu için geliştirilen ilk yöntemdir. Bu yöntemde koligatif kriyokoruyucular (DMSO - Dimetilsülfoksit, Etilen Glikol) ile muamele edilen hücrelerin, yavaş soğutma yöntemleriyle kriyodehidratasyonu amaçlanmaktadır. Bu sayede hem koligatif kriyokoruyucuların toksik etkileri azaltılır hem de hücre içi buz oluşumu engellenir. Sıcaklığın kontrollü olarak azaltılması sırasında ozmotik olarak hücre içindeki suyun hücre dışına doğru akımı gerçekleşir. Oluşan bu hareket, etkin bir kriyokoruyucu mekanizma olarak işlev görür. Bu da, buz kristali oluşumunun hücre dışında gerçekleşmesini sağlar. Böylelikle, hücre içinde buz oluşumu engellenir.

Yöntemde soğutma oranı çok iyi kontrol edilmelidir. Genellikle sıcaklık, programlı bir soğutucu yardımıyla dakikada $0,5^{\circ}\text{C}$ ile 1°C soğutma oranıyla homojen buz oluşumun gerçekleştiği -40°C ' a kadar indirilir. Bu sayede su hücre içinden hücre dışına doğru hareket eder ve sitoplazmanın derişimini arttırır. Sıcaklık aşağıya doğru inerken; yaklaşık -9°C ' ta, buz çekirdekleşmesi oluşmaya başlar, ancak sitoplazmanın yoğunluğu arttığından hücre içinde buz oluşumu gerçekleşmez. Bunun tam tersi olarak, su oranı artan hücre dışı bölgelerde ise buz çekirdekleri oluşumu başlar. Gerçekleştirilecek çok hızlı bir soğutma, hücrelerin hem hızlı bir şekilde ve çok fazla miktarda su kaybetmelerine, hem de koligatif solüsyonlar yüzünden hasara uğramasına sebep olacaktır. Bu da hücrelerin canlılıklarını olumsuz etkiler. Çok yavaş bir soğutma oranında ise, hücreler yeteri kadar dehidrate olamayacakları için hücre içinde buz kristali oluşumu gerçekleşecektir. Yani, soğutma oranının başarılı bir şekilde optimize edilmesi, hücrelerin canlılığı açısından oldukça önemlidir. Yavaş

soğutma gövde uçları, kallus, embriyojenik kültürler gibi birçok farklı eksplantın kriyoprezervasyonunda başarıyla kullanılmıştır (Benson, 2004; Ozudoğru ve ark., 2009; Reed ve Uchendu, 2008; Sakai, 1986).

Yavaş soğutma tekniğinde ilk olarak ön koşullandırma gerçekleştirilir. Ön koşullandırma işlevi eksplantların kriyokoruma aşamalarına hazırlanmaları için gerekli koşulları tanımlamaktadır. Ayrıca bu adımlar, sıvı azot sonrasında canlılığın artması için de çok önemli olmaktadır. Eksplantları soğuğa alıştıurma, ozmotik aktif kimyasallarla muamele etme ve stres önleyici ajanların kullanımı, eksplantların kriyodehidratasyonuna hazırlık aşamasında oldukça önemlidir. Soğuğa alıştıurma aşaması, ılıman ve tropik iklimlerde yaşayan bitkilerin kriyoprezervasyon sonrasında hem canlılık (Sakai 1960; Sakai ve Nishiyama, 1978) hem de rejenerasyonun artışı açısından çok etkili olmuştur (Reed, 1988).

Ön koşullandırma için bir başka yöntem ise eksplantların stres önleyici ajanlarla muamele edilmesini içermektedir. Örneğin, prolin, absisik asit (Bravo ve ark., 1998) veya trehaloz gibi stres önleyici ajanlar bu amaçla kullanılabilirler. Özellikle absisik asidin hücre içindeki su dengesini düzenleme rolü (Tanino ve ark., 1990) ve donmayı engelleyici kimyasalların salınımını indüklemesi (Lee ve ark., 1991) kültürlerin geri kazanımı için önemli rol oynamaktadır.

Ön koşullandırmayı takiben eksplantların, sıvı azota daldırılma öncesinde kriyokoruyucu solüsyonlarla muamele edilirler. Bu adım, kriyoprezervasyon sonrasında eksplantların canlılığını sürdürmesi için temeldir. Burada asıl amaç, kriyoprezervasyon sırasında hücrelerde oluşabilecek hücre içi buz oluşumunun kriyokoruyucu kimyasallarla muamele edilerek engellenmesidir. DMSO, kontrollü soğutma protokolleri için en fazla kullanılan kriyokoruyucu çözeltilerden biridir. Belirli bir oran olmamakla birlikte, DMSO genelde besiyeri miktarının %10-15' i kadar kullanılır. DMSO'nun bitkilerde ilk kullanımı, Quatrano tarafından *Linum usitatissimum* kültürlerinin kriyoprezervasyonunda görülmektedir. Yapılan çalışmada, -50°C' ta DMSO ile muamele edilen kültürlerden, %14 oranında canlılık elde edilmiştir (Quatrano, 1968). Lovelock ve Bishop' a göre DMSO, geçerli donma

sıcaklığını aşağıya çekmekte ve böylece buz kristali oluşumunu engellemektedir (Lovelock ve Bishop, 1959). Olumlu etkileri gözlenen diğer bir yaklaşım, hızlı bir şekilde hücre içine nüfuz eden kriyokoruyucularla, yavaş yavaş hücre içine giren kriyokoruyucuların birlikte kullanılmasıdır. Örneğin *Saccharum* sp.'nin kallus kültürlerinde uygulanan bir protokolda %10 PEG, %8 Glikoz ve %10 DMSO karışımından oluşan bir kriyokoruyucu solüsyon, kriyoprezervasyon sonrası canlılığın elde edilmesinde etkili olmuştur (Ulrich ve ark., 1979). Farklı kriyokoruyucuların düşük konsantrasyonlarda bir arada kullanılması, toksik etkilerin azaltılması açısından da önemlidir (Chen ve ark., 1984). Ayrıca PVS2 (Sakai ve ark., 1990) kriyokoruyucu çözeltisinin kullanımı *Prunus* sp. kriyoprezervasyonunda olumlu sonuçlar sağlamıştır (Brison ve ark. 1995).

Hücre süspansiyon kültürleri için, genel olarak, -30°C ' a kadar $1^{\circ}\text{C}/\text{dak}$. kademeli soğutma kullanılmaktadır (Withers, 1979a,b). Ayrıca -40°C ' a kadar $0,1^{\circ}\text{C}/\text{dak}$.' lık bir soğutma oranı; armut ve nane bitkileri için optimal bir dehidratasyon sağlamaktadır. Buna benzer olarak, *Rubus* germplazmasının korunmasında $0,3^{\circ}\text{C}/\text{dak}$. ' lık bir soğutma oranı kullanılırken, nane gövde uçlarının kriyodehidratasyonunda $0,25^{\circ}\text{C}/\text{dak}$. ' lık bir soğutma oranı kullanılmıştır. Ayrıca enkapsülasyon gibi diğer bitki doku kültürü tekniklerinin de kontrollü soğutmayla birlikte kullanılması iyi sonuçlar verebilmektedir. Enkapsüle edilmiş üzüm aksiller tomurcuklarının -100°C ' a kadar $0,1^{\circ}\text{C}/\text{dak}$. kademeli soğutulması, kriyoprezervasyon sonrasında, enkapsüle edilmeyenlere oranla daha yüksek canlılığın elde edilmesini sağlamıştır. Kriyokoruyucu solüsyonlarla muamelenin ardından, eksplantlar uygun saklama kaplarına alındıktan sonra sıvı azota daldırılır ve en az 1 saat süre ile bekletilirler. Bir sonraki aşama, kriyoprezervasyon için bir diğer önemli kritik nokta olan çözme aşamasıdır. Buz kristallerinin yeniden oluşmalarını engellemek için çözme olabildiğince hızlı yapılmalıdır. Yapılan ilk çözme çalışmalarında, 20°C ' ta çözme en iyi sonuçları vermiştir (Plessis ve ark, 1993).

Daha önce de belirtildiği gibi, iki aşamalı soğutma yönteminde kriyodehidratasyon aşaması dokuların ve hücrelerin programlanabilir soğutucu

yardımıyla, belirli oranlarda kademeli olarak soğutulmasını içermektedir. Günümüzde, son yıllarda bu amaç için geliştirilmiş olan, haznesine eklenen isopropanol gibi alkoller sayesinde $-70^{\circ}\text{C}/-80^{\circ}\text{C}$ ' ta $1^{\circ}\text{C}/\text{dak}$ oranında soğutma sağlayan özel kaplar da (Mr. Frosty[®]) kullanılabilir.

1.4.5. Geliştirilmiş Kriyokoruma Teknikleri (Hızlı Soğutma – Tek Aşamalı Dondurma Teknikleri)

Tek aşamalı dondurma yöntemleri hücre içeriğinin vitrifikasyonu temeline dayanmaktadır. Bunu gerçekleştirmek için fiziksel dehidratasyon, enkapsülasyon-dehidratasyon, vitrifikasyon, enkapsülasyon-vitrifikasyon ve damlacık dondurma gibi yöntemler uygulanmaktadır.

Tek aşamalı dondurma yöntemlerinde dokuların, vitrifikasyon çözeltileri ile yeteri kadar dehidrate edilmeleri ve bu sayede ölümcül buz oluşumunun engellenmesi amaçlanmaktadır. Dokuların vitrifikasyon çözeltileri olmadan soğutulmaları buz kristallerinin oluşumuna, bu da dokuların ölmesine neden olacaktır. Bu nedenle etilen glikol ve gliserol tabanlı vitrifikasyon çözeltileri [(PVS2 ve PVS-3 (Nishizawa ve ark., 1993) gibi] kullanılmaktadır. PVS2 (%30 gliserol, %15 etilen glikol, %15 DMSO, büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besiyeri ve 0,4 M sukroz) ve PVS-3 (%40 gliserol, %40 sukroz ve MS besiyeri) çözeltileri, sahip oldukları -100°C ' a kadar süper soğutulma yetenekleri nedeniyle, düşük sıcaklıklarda, dokularda vitrifikasyona neden olmaktadır. Dolayısıyla vitrifikasyon, sıvıların yüksek konsantrasyonlu kriyokoruyucu çözeltiler sayesinde, buz kristalleri oluşturmadan camsı bir yapıya geçmelerine verilen isimdir (Fahy ve ark. 1984). Sonuçta, buz kristallerinin oluşumu engellenecek ve dokuların canlılığı korunacaktır. Ayrıca vitrifikasyon esnasında, metabolik tepkimeler en alt seviyeye inecek ve bunun doğal bir sonucu olarak doku yıkımı engellenerek, genetik kararlılığın korunması sağlanacaktır (Burke 1986). Ayrıca bu kriyokoruyucu çözeltilere ilave olarak, 0,4 M sukroz ve 2 M gliserol içeren LS (Loading Solution – Yükleme Solüsyonu) çözeltisi de, dokuların vitrifikasyon süreçlerine hazırlanmasında ozmokoruyucu olarak kullanılmaktadır. Bu çözeltinin dokulardaki dehidratasyon ve soğuk toleransının artırılması açısından oldukça önemli olduğu

daha önceki çalışmalarda açıklanmıştır (Nishizawa ve ark., 1992; Sakai ve ark., 1991).

1.4.5.1. Dehidratasyon

Suyun yaşam için en temel ihtiyaç olduğu bilinen bir gerçektir. Tüm aktif hücrelerde en çok bulunan yapıtaşı sudur ve metabolizmanın işlev görebilmesi için tüm canlı organizmaların su alması gerekir. Kuru ağırlık bazında ölçülen su içeriği dokulardaki suyla kuru ağırlık arasındaki kütle oranını ölçer ve genellikle gr kuru ağırlık başına olan gr su ($g\ g^{-1}$ kuru ağırlık) şeklinde ifade edilir. Bu, su içeriğinin doğrusal bir ifadesidir ve dehidratasyon sürecindeki su içeriği kaybı dokulardaki su kaybı ile orantılıdır. Suyun biyolojik alanlarla etkileşimleri bitki dokularının desikasyona toleransında, özellikle de düşük nem içeriklerinde, oldukça önemlidir. Bu etkileşimlerin dokularda su potansiyeli üzerindeki etkilerine genellikle “matriks” potansiyel denir. Kuru tohumların çimlenmenin başlangıç aşamalarında hızlı bir şekilde su alması matriks potansiyeli sebebiyledir (Reed, 2008).

Örneklerin kurutulması sırasında su molekülleri dokulardan ayrılarak etraflarındaki havaya difüz olurlar. Bu difüzyonun hangi oranda olacağı, dolayısıyla da dokuların ne oranda kuruyacağı bazı faktörlere göre değişiklik gösterir. Bu faktörlerden bazıları şunlardır: (i). Havanın buhar basıncı: Hava ile su arasındaki serbest enerji miktarını, dolayısıyla da kuruma oranını değiştirir. Dokular kuru havada nemli havaya göre çok daha hızlı kururlar. (ii). Sıcaklık: Serbest enerji farkını değiştirir ve yüksek sıcaklıkta bu fark daha büyük olur. Bununla beraber, dehidratasyon sırasında sıcaklığın artırılması kuruma ile ilgili olamayan farklı olumsuz sonuçlar doğurabilir. (iii) Doku boyunca oluşan hava hareketinin hızı: Bağlantı tabakasının kalınlığını ve su buharının ondan uzaklaşma yeteneğini etkiler. Hava akım hızının artırılması durağan havaya göre daha hızlı bir kuruma sağlar. (iv) Dokunun şekli ve boyutu: Yüzey alan-hacim oranını ve dokunun içinden yüzeye ve oradan da havaya difüz olmak için su molekülünün kat edeceği mesafeyi etkiler. Küçük doku parçaları büyüklere göre daha hızlı kurur. Benzer şekilde, düzgün yüzeyli dokular da daha büyük olanlara göre daha hızlı kurur. (v) Dokunun dış yüzeyinin kimyasal ve fiziksel kompozisyonu: Dokunun hem sıvı hem de gaz formundaki suya olan geçirgenliğini etkiler. Bol ligninli ve mumsu tabakaya sahip

olan dokularda kuruma daha yavaş gerçekleşir. (vi). Kurutulacak materyal miktarı: Yüzey alanı-hacim oranı ve bağlantı tabakası gibi faktörleri etkiler. Genellikle daha az miktardaki örnekler daha hızlı kurur (Reed, 2008).

Tüm bu faktörler araştırmacının kontrolündedir. Dolayısıyla araştırmacı bu etkenlerden birini veya birkaçını değiştirerek örneklerin daha hızlı veya daha yavaş kurumasını ve kuruma oranını ayarlayabilir. Kullanılabilecek olan her bir kurutma yönteminde sıcaklık ve ortam nem oranının kontrol edilebilme oranı değişiklik gösterir. Genellikle kurutulacak olan örneğin miktarına, laboratuvar imkanlarına ve kurutma nedenine göre hangi yöntemle kurutma yapılacağına karar verilir. Kurutma yöntemlerinden bazıları sadece tohumlar için uygundur, ancak yöntemlerden çoğu tüm dokular için kullanılabilir (Reed, 2008).

Tohumların veya vejetatif dokuların kriyoprezervasyon amaçlı dehidratasyonunda en yaygın kullanıma sahip iki yöntem bulunmaktadır. (i) Laminar hava akımlı kabinlerde dehidratasyon: Bu yöntemde, soğuğa alıştırma ve sukroz ön kültür aşamalarından gelen eksplantlar steril petri kabı veya steril kesme kapları içerisine alınarak kriyoprezervasyon aşamasında hücre ve dokular için ölümcül olabilecek fazla suyun uzaklaşması sağlanır. Uzaklaştırılacak olan su miktarı, dokuya, dokunun alındığı ana materyale, bitki türüne vb. bağlı olarak dokunun hasar görmemesi için optimize edilir. (ii) silika jel ile dehidratasyon: bu yöntemde aktif silika jel kullanılarak kriyoprezervasyon sırasında, hücre içi ölümcül su içeriğinin uzaklaştırılması sağlanır (Gonzalez-Arno ve Engelmann, 2006).

1.4.5.2. Enkapsülasyon – Dehidratasyon

Bu teknikte dehidratasyon tekniği sentetik tohum teknolojisi ile birlikte kullanılmış (Redenbaugh ve ark., 1986). Teknik ilk olarak armut ve patates gövde uçlarının kriyoprezervasyonu için geliştirilmiştir (Fabre ve Dereuddre 1990) ve enkapsüle edilmiş eksplantların yüksek derişimde sukroz içeren sıvı veya katı besiyerlerinde kültürlenmesi ve dehidrate (yatay akımlı kabin veya silika jel üzerinde) edilerek sıvı azota aktarılması aşamalarını içermektedir. Eksplantların

enkapsüle edilmeleri canlı kalabilecekleri en düşük nem seviyesine kadar desike edilmelerine olanak tanır.

Desikasyon nedeniyle eksplantlardaki su içeriği azalacak ve bu da hücre içindeki ölümcül buz oluşturabilecek su içeriğini azaltacağından, eksplantların sıvı azota aktarımında vitrifikasyon gerçekleşecektir (Engellmann, 1997). Bu teknik günümüzde okaliptüs (Poissonnier ve ark. 1991), üzüm (Plessis ve ark 1991), armut, havuç (Dereuddre ve ark 1991) gibi birçok farklı bitki çeşidi üzerinde uygulanmıştır (Çizelge 1.3). Enkapsülasyon – dehidratasyon tekniği genel olarak vitrifikasyon protokolleriyle benzerlik göstermektedir. Bu tekniğin genel vitrifikasyon protokolünden ayrıldığı en önemli kısım ise enkapsüle edilmiş eksplantların desikasyona maruz bırakılmalarıdır. Bu protokolün aşamalarını: (i) önkültürleme (ii) enkapsülasyon, (iii) ozmokoruma, (iv) dehidratasyon ve (v) sıvı azota aktarma şeklinde özetlenebilir.

Çizelge 1.3. Enkapsülasyon - dehidratasyon tekniği ile gövde ucu eksplanti kullanılarak kriyoprezerve edilen bazı bitki örnekleri.

Bitki Türü	Referans
<i>Amygdalus communis</i> L. (Badem)	Al-Ababneh ve ark. 2003
<i>Camellia sinensis</i> L. (Çay) O. Kuntze	Aoshima 1997
<i>Citrus aurantium</i> (Portakal)	Al-Ababneh ve ark. 2002
<i>Cocos nucifera</i> (Hindistan cevizi)	Hornung ve ark. 2001
<i>Coffea racemosa</i> (Kahve)	Mari ve ark. 1995
<i>Dianthus caryophyllus</i> L. (Karanfil)	Tannoury ve ark. 1995
<i>Iris nigricans</i> (Süsen)	Shibli 2000
<i>Populus tremula x alba</i> (Kavak)	Accart ve ark. 1993
<i>Solanum tuberosum</i> (Patates)	Grospietch ve ark. 1999
<i>Rubus idaeus</i> L. (Böğürtlen)	Wang ve ark. 2005
<i>Vitis vinifera</i> L. (Asma)	Plessis ve ark. 1991
<i>Vitis vinifera</i> L. (Asma)	Zhao ve ark. 2001

Soğuğa alıştırma ve önkültürleme süreçleri, dehidratasyon aşaması için büyük bir önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalar, bitki materyalinin fizyolojik durumunun dehidratasyonla olan ilişkisini göstermiştir. Sürekli alt kültürlenmiş bitkilerin meristemlerinin su içeriğinin sürekli alt kültürlenmeyenlere oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalar kriyoprezervasyon sonrasındaki canlılığın sağlanmasının eksplantların su içeriği ile bağlantılı olduğunu göstermektedir.

Önkoşullandırma sırasında soğuk ortamda kültürlenme sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Zhao ve ark., 2001).

Yüksek sukroz konstrasyonunda kültürlenme de yine farklı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Grospecht 1999). Bitkilerden alınan eksplantlar yüksek sukroz konstrasyonlarında önkültürlemek süretiyle kısmen dehidrate edilirler. *Citrus madurensis* bitkisinin gövde uçları sırasıyla önce 0,1 M sukroz besiyerinde ardından 0,3 M sukroz ve 0,5 M gliserol ile birlikte kültürlenmişlerdir (Cho ve ark., 2002).

Enkapsülasyon için bitki materyalinin sodyum aljinatla (genel olarak %3 oranında) kaplanması ve 100 mM CaCl₂ içeren MS besiyerinde polimerizasyonu sağlanır (Gonzales-Arno ve Engelmann, 2006). Bu süreç sonunda eksplantlar desikasyona karşı bir korumaya sahip olurlar.

Ozmokoruma sürecinde sentetik tohumlar desikasyon ve kriyoprezervasyon öncesinde yüksek sukroz konsantrasyonlarında bir süre kültürlenirler. Yapılan farklı çalışmalar, sentetik tohumların 0,5 ve 0,75 M sukroz içeren sıvı besiyerlerinde 16 – 17 saat kültürlenebildiklerini göstermiştir (Gonzalez – Arno ve ark., 1993). Bazı türlerde sukroz kültürünün canlılık ve rejenerasyon üzerindeki olumsuz etkileri görülse de, sukroz konsantrasyonun kademe kademe arttırılmasıyla bu sorun çözülebilir. Üzüm bitkisinde 0,25 M – 1 M sukroz konsantrasyonundaki kademeli artış sonucunda % 80 oranında canlılık elde edildiği raporlanmıştır (Plessis ve ark., 1991).

Dehidratasyon aşaması ise; sentetik tohumların yatay akımlı kabin içerisinde veya silika jel üzerinde desike edilmesine dayanmaktadır. Yatay akımlı kabinde yapılan desikasyon ortamının nem içeriği ve sıcaklıkla doğrudan bağlantılı olduğu için elde edilen sonuçlar değişken olabilmektedir. Bu yüzden silika jel üzerinde yapılan dehidratasyon süreci tercih edilmektedir. Desikasyon sürecinde sentetik tohumun içerisindeki su içeriğinin yaklaşık olarak %20' ye düşürülmesinin canlılığı sağladığı raporlanmıştır (Gonzales-Arno ve Engelmann 2006). Ancak bu oran türden türe değişiklik gösterir. Armut gövde uçlarında %27' lik su içeriği canlılık sağlarken (Scottez ve ark., 1992) elma bitkisinde bu oran %33' tür (Niino ve Sakai, 1992).

Kriyoprezervasyon ise sentetik tohumların 1,2 mL polipropilen kriyovialler içerisinde sıvı azota daldırılması ile gerçekleşir.

Çözme süreci genelde oda sıcaklığında yavaş olarak gerçekleştirilir (Gonzales-Arno ve Engelmann, 2006). Ancak 40°C su banyosunda 2-3 dakika süreyle çözme de farklı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Matsumo ve Sakai 1995). Ayrıca bazı araştırmacılar tomurcukların rehidrate olmaları için, 5-10 dakika boyunca sıvı besiyerinde yıkama da kullanmışlardır (Reed ve ark., 2006).

1.4.5.3. Vitrifikasyon

Vitrifikasyon prosedürlerinde de (ön koşullandırma), ozmokoruma, sıvı azota aktarım ve çözme aşamaları mevcuttur. Bitkiden alınan eksplantlar normal bitki büyütme koşullarında, bitki türüne ve/veya alınan eksplantın çeşidine (gövde ucu, nod vb.) göre en uygun derişimde sukroz içeren besiyerinde önkültürlenirler. Önkültür aşamaları odunsu ve otsu bitkilerde farklılık göstermektedir. Odunsu bitkilerde, +4 ile +5°C koşullarında 3 haftalık önkültür süreci, elma ve armut bitkilerinde sıvı azot sonrasında canlılığı arttıran bir etken olarak raporlanmıştır (Niino ve ark., 1992a,b). Yine elma bitkisinde yapılan başka bir çalışmada ise, 8 günlük soğuğa alıştırmaya süreci ardından 0,7 M sukroz içerisinde 1 gün süreyle kültürlenmiş gövde uçlarında yüksek seviyede canlılık elde edilmiştir.

Önkültür aşamalarında sukroz dışında başka kimyasalların da kullanılmasının kriyoprezervasyon sonrasında canlılığı arttırdığı rapor edilmiştir. Örneğin *Ribes* germplazmasının, 1 hafta soğuğa alıştırılmasının ardından %5 DMSO ile 2 gün boyunca kültürlenmesi kriyoprezervasyon sonrasında en iyi canlılığı sağlamıştır (Luo ve Reed, 1997; Reed, 1992). Otsu bitkilerde ise, sadece ozmotik aktif şekerler ile yapılan önkültürleme süreçleri rahatlıkla kullanılabilir. 0.3 ve 0.7 M sukroz ilave edilmiş besiyerlerinde 1 veya 2 gün süreyle önkültürlenmiş gövde uçlarının sıvı azot sonrasında yüksek canlılık gösterdikleri raporlanmıştır (Dereuddre ve ark., 1988). Önkültür sürecinin, şeker ve şeker alkollerini gibi endojen kriyokoruyucuların hücre içinde birikimini teşvik ettiği ve membran kararlılığını arttırdığı da bildirilmiştir (Crowe ve ark. 1984a,b). Kriyoprezerve edilen tütün gövde uçlarıyla

yapılan bir çalışmada ise, 0.3 M mannitol ile 1 gün boyunca kültürlenmiş hücrelerde ozmotik stresin yaptığı etkiler incelenmiştir. Önkültür sürecinde, absisik asit, prolin ve embriyogenezin son aşamalarında sentezlenen bazı proteinlerin varlığı tespit edilmiş ve hücrelerin bu süreç içerisinde besiyerindeki mannitolu kullandıkları anlaşılmıştır (Reinoud, 1996). *Solemostemon rotundifolius* bitkisinin tomurcukları ile yapılan çalışmada ise, 25°C' ta 0,3 M sukroz ile 3 gün boyunca önkültürlemenin en iyi rejenerasyonu verdiği tespit edilmiştir (Niino ve ark., 2000).

Ön koşullandırmanın ardından eksplantlar LS çözeltisi ile 20-30 dakika ozmokokorumaya tabi tutulurlar. Bu adımda hücrelerde vitrifikasyon solüsyonlarının neden olacağı hasarların engellenmesi ve dokuların dehidratasyona karşı dirençlerini arttırmak amaçlanmaktadır. Çünkü bazı otsu ve odunsu bitkilerde sadece şeker alkollerini kullanılarak yapılan önkültürleme süreçleri kriyoprezervasyon sonrasında istenilen canlılığı sağlamamaktadır. Örneğin, LS kullanımıyla birlikte %50 PVS2 uygulanmasının wasabi gövde uçlarının sıvı azot sonrasındaki canlılıklarını arttırdığı görülmüştür (Matsumo ve ark., 1994).

Dehidratasyon aşamasında LS çözeltisinden arındırılan eksplantlar farklı sürelerde ve sıcaklıklarda (0°C - 25°C) 1-2 ml vitrifikasyon solüsyonlarıyla (PVS2 gibi) muamele edilirler. Ancak, bu süre içerisinde kriyokoruyucuların toksik etkileri de göz ardı edilmemelidir. Bu nedenle vitrifikasyon çözeltilerinin eksplantlar üzerindeki uygulama süresi çok iyi optimize edilmelidir. En uygun etkileşim süresi hem eksplantları sıvı azota girmeden vitrifiye edebilmeli hem de onların canlı kalmalarını sağlamalıdır (Çizelge 1.4). Wasabi bitkisinin yaklaşık 1 mm boyutlarındaki meristemleri, 0.3 M sukroz ile önkültürlenmiş ve ardından LS ile 20°C' ta 25 dakika inkübe edilmiştir. Ardından eksplantlar, PVS2 ile hem 0°C' ta hem de 25°C' ta farklı sürelerde inkübe edilerek kontrol ve sıvı azot grupları oluşturulmuştur. Meristemlerin rejenerasyon sonuçlarına bakıldığında PVS2'nin meristemler üzerindeki toksik etkileri rahatlıkla görülebilmektedir. 25°C' ta 10 dakika uygulama süresi sonunda sıvı azot gruplarında en yüksek rejenerasyon elde edilmiştir. Ancak kontrol gruplarındaki rejenerasyon 10 dakika sonra azalmaya başlamıştır. Bu sürenin üzerindeki PVS2 uygulamaları ise, sıvı azot gruplarındaki canlılığın hızlı bir şekilde azaltılmasına neden olmuştur. Aynı etki kontrol gruplarında da 20 dakikanın ardından gözlenmektedir. PVS2'nin 0°C' ta uygulandığı diğer

meristemelerde ise farklı sonuçlar elde edilmiştir. Sıvı azot gruplarında en yüksek gövde oluşum oranı 30 dakika PVS2 uygulaması ile alınmıştır (Matsumoto ve ark. 1994).

Çizelge 1.4. PVS2 vitrifikasyon tekniğiyle kriyoprezerve edilen bazı bitki örnekleri. (Engelmann ve ark, 2008).

Bitki Türü	Uygulamalar	Rejenerasyon (%)	Referans
<i>Allium porum</i>	SA, PC, LD, PVS2, RF	80	Niino ve ark. 2003
<i>Allium sativum</i>	PC, PVS2, RF	100	Makowska ve ark. 1999
<i>Ananas comosum</i>	PC, LD, PVS2, RF	35.7	Thinh ve ark. 2000
<i>Atropa belladonna</i> (K)	PC, PVS2, RF	50	Kamiya ve ark. 1995
<i>Beta vulgaris</i>	PC, LD, PVS2, RF	60-100	Vandenbussche ve ark. 2000
<i>Bletilla striata</i> (ZE)	PC, LD, PVS2, RF	60	Ishikawa ve ark. 1997
<i>Camellia sinensis</i>	SA, PC, PVS2, RF	60	Kuranuki ve Sakai 1995
<i>Castanea sativa</i> (SE)	PC, PVS2, RF	68	Corredoira ve ark. 2004
<i>Citrus madurensis</i> (EA)	PC, LD, PVS2, RF	85	Cho ve ark. 2002
<i>Colocasia esculenta</i>	PC, LD, PVS2, R	80	Takagi ve ark. 1997
<i>Daucus carota</i> (HS)	PC, LD, PVS2, RF	83.3	Chen ve Wang 2003
<i>Fragaria x ananassa</i>	SA, PC, LD, PVS2, RF	93	Niino ve ark. 2003
<i>Ipomoea batatas</i>	PC, LD, PVS2, RF	93	Pennycooke ve Towill 2001
<i>Lilium japonicum</i>	PC, LD, PVS2, RF	80	Matsumoto ve ark. 1995
<i>Macropidia fuliginosa</i> (SE)	PC, PVS2, RF	90.6	Turner ve ark. 2000
<i>Manihot esculenta</i>	PC, LD, PVS2, RF	75	Charoensub ve ark. 1999
<i>Morus bombycis</i>	SA, PC, PVS2, RF	65	Niino ve ark. 1992b
<i>Nicotiana tabacum</i> (HS)	PC, PVS2, RF	55	Reinhoud 1996
<i>Oryza sativa</i> (HS)	PC, LD, PVS2, RF	45	Huang ve ark. 1995
<i>Panax ginseng</i> (K)	PC, PVS2, RF	69	Yoshimatsu ve ark. 1996
<i>Populus alba</i>	SA, PC, LD, PVS2, RF	60	Lambardi ve ark. 2000
<i>Prunus domestica</i>	PC, LD, PVS2, RF	57	De Carlo ve ark. 2000
<i>Prunus dulcis</i>	SA, PC, LD, PVS2, RF	10	Shatnawi ve ark. 1999
<i>Quercus robur</i> (EK)	PC, PVS2, RF	70	Martinez ve ark. 2003
<i>Quercus suber</i> (SE)	PC, PVS2, RF	88-90	Valladares ve ark. 2004
<i>Trifolium repens</i>	PC, PVS2, RF	80	Yamada ve ark. 1991
<i>Wasabia japonica</i>	PC, LD, PVS2, RF	85	Matsumoto ve ark. 1998

CS: Hücre süspansyonu; EA: Embriyonik sürgün; EC: Embriyojenik kültürler; LD: Osmokoruyucu; PC: Ön kültür; PVS2: Kriyokoruyucu solusyon; R: Kök; RF: Hızlı dondurma; SA: Soğuğa alıştıрма; SE: Somatik embriyo; ZE: Zigotik embriyo.

Kriyoprezervasyon ise, polipropilen kriyoviallerdeki meristemlerin, örneklerin doğrudan sıvı azota aktarılmalarıyla gerçekleştirilir. Sıvı azotta en az 1 saat süreyle bekletilirler. Çözme aşamasında eksplantlar 1-2 dakika boyunca 40°C su banyosunda tutulurlar (ısınma oranı yaklaşık: 250°C/dak.). PVS2'nin dokulardan dışarı atılmasını sağlamak için eksplantlar 1,2 M gibi yüksek sukroz konsantrasyonu içeren çözeltide yıkanarak rejenerasyon besiyerine aktarılırlar. Ancak çözme sürecinde dikkat edilmesi gereken nokta, dokuların devitrifiye olma ihtimalleridir. Bu nedenle, çözme hızı iyi optimize edilmelidir. Rejenerasyon besiyerinin içeriği de canlılığı indüklemesi açısından çok önemlidir. Örneğin besiyerine aktif kömür ilavesi (Scrijnemakers ve van Iren, 1995) veya amonyum iyonları içermeyen (Kuriyama ve ark, 1989) besiyerlerinin kullanımı, canlılığı tetiklemede etkindir. Çalışmalar başarılı bir çözme sonrasında yeşil olarak elde edilen meristemlerin bir süre canlılık belirtisi göstermeden bekledikleri ve ardından rejenerere olduklarını göstermiştir (Matsumoto ve ark., 1994; Niino ve ark., 1992). Bunlara ek olarak, histolojik analizler de dokulardaki canlılığın tespit edilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Suzuki ve ark., 2004).

1.4.5.4. Enkapsülasyon – Vitrifikasyon

Bu yöntem, enkapsülasyon ve PVS2 vitrifikasyon tekniklerinin avantajlarını birleştirmek amacıyla geliştirilmiştir (Matsumoto ve Sakai, 1995). Bu teknik yukarıda anlatılan vitrifikasyon tekniklerine uygun olarak; soğuğa alıştırılan ve ozmo aktif şekerlerle önkültürü yapılan eksplantların, %2 veya %3 sodyum aljinat içeren besiyerlerinde enkapsüle edilerek, PVS2 ile inkubasyonuna dayanmaktadır (Fabre ve Dereuddre 1990).

Bu teknik ile, deniz lavantası (Matsumoto ve ark. 1998), nane (Hirai ve Sakai, 1999a), patates (Hirai ve Sakai 1999b), büyük kantaron (Tanaka ve ark. 2004), çilek (Hirai ve ark. 1998) gibi birçok bitkinin kriyoprezervasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 1.5).

Çizelge 1.5. Enkapsülasyon-vitrifikasyon tekniği kullanılarak kullanılarak kriyoprezerve edilen bazı bitki örnekleri.

Bitki Türü	Uygulamalar	Rejenerasyon (%)	Referans
<i>Ananas comosus</i>	PC, LD, PVS3, RF	54 - 83	Gamez-Pastrana ve ark. 2004
<i>Fragaria x ananassa Duch</i>	SA, LS, PVS2, RF	70.3 - 90	Hirai ve ark. 1998
<i>Gentiana spp.</i>	SA, PC, LS, PVS2, RF	43.3 - 93.3	Tanaka ve ark. 2004
<i>Ipomoea batatas</i>	PC, LD, PVS2, RF	82 - 95	Hirai ve Sakai 2003
<i>Manihot esculenta</i>	PC, PVS2, RF	57 - 86	Charoensub ve ark. 2004
<i>Mentha spicata</i>	LD, PVS2, RF	73 - 97	Hirai ve Sakai 1999a
<i>Olea europaea</i> (SE)	LD, PVS2, RF	64	Shibli ve Al-Juboory 2000
<i>Poncirus trifoliata x Citrus sinensis</i>	LD, PVS2, RF	100	Wang ve ark. 2002
<i>Prunus domestica</i>	PC, PVS2, RF	47.5	De Carlo ve ark. 2000
<i>Solanum tuberosum</i>	PC, LD, PVS2, RF	41 - 71	Hirai ve Sakai 1999b
<i>Wasabia japonica</i>	LD, PVS2, RF	95	Matsumoto ve ark. 1995

CS: Hücre süspansyonu; EG: Etilen glikol; LD: Osmokoruyucu; PC: Ön kültür; PVS2-PVS3: Kriyokoruyucu solusyon; RF: Hızlı dondurma; SA: Soğuğa alıştırmaya; SE: Somatik embriyo; Sucr: sorbitol

1.4.5.5. Damlacık Dondurma Tekniği

Bu teknik, kriyoprezerve edilecek eksplantların alüminyum folyolar üzerinde PVS2 veya DMSO ile çeşitli sürelerde inkübasyonunu takiben, ultra hızlı bir şekilde dondurulmalarını tanımlamaktadır. İlk olarak patates gövde uçlarının kriyoprezervasyonunda (kriyokoruyucu olarak DMSO uygulanmıştır) kullanılmıştır (Schafer – Menhur ve ark., 1997). Daha sonra, kriyokoruyucu olarak PVS2 ozmo aktif çözelti kullanılarak muz (*Musaceae*) ve *Colocasia esculenta* var. *esculenta* bitkilerinde denenmiştir (Panis ve ark. 2005; Sant ve ark. 2008).

Teknik temel olarak vitrifikasyon prosedürleriyle aynıdır. Ancak diğer vitrifikasyon süreçlerinden ayrılan en temel özelliği, eksplantların yaklaşık 3-5 mm x 10-15 mm alüminyum folyolar üzerinde bulunan yaklaşık 4 µl PVS2 damlacıklarının içerisine yerleştirilmesi esasına dayanmaktadır.

Eksplantların 25°C' ta veya 0°C' ta belirli bir süre dehidratasyonunu takiben, folyoların, sıvı azot ile soğutulmuş kriyoviallerin içine aktarılması gerçekleştirilir ve kriyoviallerin de sıvı azot tankına daldırılmasıyla kriyoprezervasyon tamamlanır. Çözme işlemi ise 1,2 M sukroz içeren sıvı besiyerinde 25°C' ta ultra hızlı bir şekilde gerçekleştirilir ve ardından eksplantlar rejenerasyon besiyerine aktarılır.

Damlacık dondurma ve vitrifikasyon tekniğinin en önemli özelliği, geniş bir genotip aralığındaki bitkilere uygulanabilmesidir (Sakai ve Engelmann 2007; Sakai ve ark. 2008). Teknik günümüzde en çok kullanılan kriyoprezervasyon yöntemlerinden birisidir (Çizelge 1.6).

Çizelge 1.6. Damlacık dondurma tekniği kullanılarak kriyoprezerve edilen bazı bitki örnekleri. (Panis, 2008).

Bitki Türü	Referans
<i>Asparagus</i> (Kuşkonmaz)	Mix-Wagner ve ark. 2000
<i>Musa</i> L. (cv. Australian banana) (Muz)	Agrawal ve ark. 2004; Panis ve ark. 2005.
<i>Allium sativum</i> (Sarımsak)	Kim ve ark. 2004
<i>Colocasia esculenta</i> (Taro)	Takagi ve ark. 1997
<i>Helianthus tuberosus</i> (Yerelması)	Leunufna ve Keller 2003, 2005
<i>Solanum tuberosum</i> L. (Patates)	Halmagyi ve ark. 2005; Kryszczuk ve ark. 2006.

1.5. *Thymus* L. (Kekik)

Lamiaceace ailesinde bulunan yaklaşık 220 cinsin, tür sayısı bakımından en önemli 8 cinsinden (*Salvia*, *Hyptis*, *Scatellaria*, *Stachys*, *Teucrium*, *Nepeta*, *Plectranthus*) biri *Thymus*'tur (Stahl-Biskup ve Sáez, 2002). Kekik (*Thymus* spp.), tümü Asya ve Avrupa kökenli olan 400'den fazla tür içerir (Loziene ve ark, 2007). Boyu 50 cm'yi aşmayan, kurak ve sıcak alanlara iyi adapte olmuş, küçük çalı ya da

yastık formu, çok yıllık, otsu veya odunsu (en azından dip kısmında odunsu) bitkilerdir. Özellikle yapraklarında renksiz ya da parlak kırmızı renkli gland adı verilen uçucu yağ kesecikleri bulunur. Bu glandlar türe özgü uçucu yağların ve bazı fenolik bileşenlerin depolandığı ve salgılandığı keseciklerdir. Çiçek rengi mor, pembe, krem veya beyazdır (Davis, 1965; Stahl-Biskup ve Sáez, 2002).

Kekiğin kullanımına ait en eski kayıtlar antik Mısırlılar'a kadar ulaşmaktadır. Antibakteriyel ve antiviral özellikleri nedeniyle Mısırlılar tarafından sterilizasyon amaçlı kullanılan kekik, günümüzde ayrıca antihelmintik, spazm çözücü, karın ağrısı giderici, sakinleştirici, uyarıcı gibi çeşitli özellikleri nedeniyle de dünya genelinde yaygın olarak yetiştirilmekte ve astım, damar sertliği, bronşit, öksürük, diyare ve romatizma tedavisinde uygulanan ilaçların yapımında, ayrıca kozmetik ve parfüm üretiminde kullanılmaktadır.

Yaygın olarak Türkiye'nin Güney ve Güney-batı kesimlerinden toplanarak her yıl binlerce tondan fazlası dünya marketlerine ihraç edilir (Eminagaoglu ve ark, 2007). $2n = 28$ kromozom sayısına sahip olan (Morales, 2002) ve özellikle Kuzey Afrika, Avrupa ve Kuzey Amerika için ekonomik önemi giderek artan kekik, doğrudan güneş ışığı alan ve toprak sıcaklığının fazla olduğu kayalık ve dağlık bölgelerde çoğalır (Benli ve Yiğit, 2005). Bununla beraber, çevresel şartlara oldukça toleranslı doğası, uygun olmayan iklim şartlarında ve kuraklık koşullarında da yaşamasını mümkün kılar.

Odunsu olmayan gövdelerin köklendirilmesi veya köklenmiş gövde parçalarının birbirinden ayrılıp yeniden dikilmesi yoluyla vejetatif olarak da çoğaltılabilen kekik, bu şekilde üretimde gözlenen bazı kısıtlamalar (örneğin gövdelerin köklendirilmesinde karşılaşılan zorluklar, köklenmiş gövde parçalarının birbirinden ayrılması sırasında bitkilerin zarar görmesi gibi) nedeniyle daha çok tohum aracılığıyla, generatif olarak çoğaltılır. Ancak bu şekilde çoğaltılan bitkiler, ana bitkiyle aynı genetik özelliklere sahip olmadığından, bitkinin kendine has kokusu, aromatik özellikleri gibi arzu edilen bazı karakterlerin kaybedilmesi olasıdır. Ayrıca kekik gibi aromatik bitkilerin tohumlarının düşük canlılık oranlarına sahip olduğu da bilinmektedir (Nikola ve ark., 2002).

Son yıllarda geliştirilmiş olan ve günümüzde oldukça önemli bir bitki üretim yöntemi olan *in vitro* çoğaltım tekniği kullanılarak generatif ve vejetatif üretimde karşılaşılan kısıtlamalar aşılabilir. Ana bitkilerden izole edilen gövde ucu ve tomurcukların, yapay besi ortamlarında ve bitki büyüme düzenleyicilerinin varlığında, çoğalmaları ve gelişmelerinin teşvik edildiği teknikte, çok kısa bir sürede, birbiriyle aynı genetik özelliğe sahip çok sayıda bitki eldesi mümkündür. Buna karşılık, kekik türlerinin sekonder metabolit ve uçucu yağ içeriklerinin belirlenmesi ve bu yağların antibakteriyel ve antifungal özelliklerinin anlaşılması amacıyla yapılmış olan pek çok çalışma bulunmasına karşın (Rota ve ark., 2008; Wojdylo ve ark., 2007), bitki doku kültürü yöntemi günümüze kadar kekik bitkisinin çoğaltılması için çok az araştırmacı tarafından kullanılmıştır. Furmanowa ve Olszowska (1992) *T. vulgaris*' in *in vitro* yöntemlerle çoğaltılmasını deneyen araştırmacılarıdır. Çeşitli derişimlerde sitokin ve oksinleri içeren Nitsch ve Nitsch (Nitsch ve Nitsch, 1969) besiyerinin nodal tomurcukların çoğaltılmasında kullanıldığı çalışmada 0.1 mg/l kinetin ve 0.3 veya 0.5 mg/l IBA içeren NN besiyerinin optimum olduğu belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen en yüksek köklenme oranı ise 0.5 mg/l IBA içeren besiyerinde kaydedilmiştir. Lê (1989), Collet (1985) tarafından modifiye edilen CMS besiyerini kullanmış ve nodal tomurcukları taşıyan gövde parçalarının hormon içermeyen besiyerinde çoğaltılabildiğini göstermiştir.

1.5.1. *Thymus vulgaris* L.

Bitkilerin tedavi amaçla kullanılmaları çok eski yıllardan beri süregelen bir uygulamadır. Birçok dünya ülkesinde olduğu gibi Ülkemizde de deneme yanılma yöntemiyle bulunmuş, halk arasında şifalı bitkiler olarak anılan birçok bitki, hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Teşkilatı'nın 91 ülke üzerinde yaptığı araştırmaya göre tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarı 20.000 civarındadır. Bunlardan 500 kadarının üretiminin yapıldığı kaydedilmektedir. Ayrıca değişik amaçlarla kullanılan bitkilerin çok azı farmakopilerde (Kodeks) kayıtlıdır. Örneğin Türk kodeksinde kayıtlı bitki sayısı 140 civarındadır. Oysa halk arasında tıbbi amaçla kullanılan bitki sayısı çok daha fazladır (Kırbağ, 1999).

Son yıllarda antibiyotiklere dirençli suşların ortaya çıkması ve doğal kaynaklı ilaçlarda görülmeyen veya az görülen yan etkilerin sentetik ilaçlarda dikkati çekecek kadar çok olması, bilim adamlarını doğal kaynaklı ilaçları araştırmaya itmiştir (Dürger ve ark., 1999). Çeşitli bilim adamları birçok tıbbi bitkiyi tanımlamış ve bu bitkisel drogların birçoğunun etkisi bilimsel olarak kanıtlanmıştır (Ertürk ve Demirbağ, 2003).

Bahçe kekiği olarak da bilinen *Thymus vulgaris* Batı Akdeniz ve Güney İtalya' dan kökenlenen, 30 cm boylanabilen, küçük, çalı benzeri, çok yıllık bir bitki türüdür. Kekik bitkisi çimenlik tarla kıyılarında, orman kenarlarında, ve çayırlardaki karınca yuvalarının üstünde yer almaktan hoşlanır. Güneş ve sıcak istediği için, toprak sıcaklığının fazla olduğu kayalık ve dağlık bölgelere çoğalır. Kendine özgü bir kökuya sahiptir. Bitkinin gri-yeşil renkli yaprakları yüksek oranda aromatiktir ve başlıca kekik yağı, antiseptik özellik gösteren timol ve antifungal özellik gösteren karvakrol olmak üzere tıpta, ilaç yapımında yaygın olarak kullanılan uçucu yağların kaynağı olarak değerlendirilir (Loziene ve ark, 2007). Beyaz, pembe veya mor renkte çiçekleri süs bitkisi olarak, bitkinin gövdesi ise çeşitli et, balık, sebze yemeklerinin ve ekmeklerin tatlandırılmasında kullanılır.

Endüstriyel açıdan (ilaç ve kozmetik sanayinde, gıda sektöründe, vb.) oldukça önemli olan kekik bitkisi, içerdiği fenolik bileşikler nedeniyle pek çok araştırmacının ilgisini çekmiş, ancak kekik bitkisi üzerine yapılan çalışmalar, fenolik bileşenlerin tanımlanmasına ve mikrobiyolojik etkilerinin değerlendirilmesine odaklı kalmıştır (Çizelge 1.7).

Kekik öncelikle baharat olarak kullanılır. Yağlı ve ağır yemeklerin tadını zenginleştirir, sindirimi kolaylaştırır. Şifalı bitki olarak kekiğin halk arasında genel kullanım şekilleri şöyledir: Öncelikle kramp çözücü, dezenfekte edici ve balgam söktürücü olarak kullanılmaktadır. Akciğer ve bronşlar, mide ve bağırsaklar, kekiğin başlıca etki alanlarıdır. Bitkinin önemli etken maddesi olan eterli uçucu yağlar kana karışıp, bronşiyal kasları etkileyerek, krampları çözücü özelliktedir. Aynı zamanda o bölgelerde bakteri oluşumunu da önler. Öksürük ve üst solunum yolları iltihabında çay içimi ve gargara biçiminde kullanılmaktadır. Kekik iştah açar ve sindirim

sistemini uyarır. Sindirim sisteminde görülen ekşimeler ve kramplı ağrılar bir bardak kekik çayı ile geçiştirilebilir. Boğmaca ve öksürük, sinir sistemi zafiyeti, romatizma ve bağırsak hastalıklarına karşı, çay içiminin yanı sıra, kekik banyoları da çok yararlıdır. Güçsüz, zayıf ve solgun çocuklara da kekik banyosu yaptırılması önerilmektedir. Kekik çayı ile ayrıca adet kanamaları dengelenmektedir. Adet zamanlarındaki kramplı ağrılar geçirilebilmektedir. Ergenlik sivilceleri iyileştirilebilmektedir. Kekik çayı içimi ve kekikle karıştırılmış bal yenmesiyle organizmayı güçlendirilebilmektedir. Kekik tentürü ile ovmak suretiyle romatizmal ağrılar, sinirsel rahatsızlıklar tedavi edilebilir. Sıcak kekik yastıkları ağrılı bölgenin üstüne konularak büyük rahatlıklar sağlanabilir. Kekik, öksürük ve mide rahatsızlıklarına karşı başka bitkilerle karıştırılarak daha da başarılı biçimde kullanılabilir (Baytop, 1999; Eröztürk, 2000, Treben, 2008).

Çizelge 1.7. *Thymus vulgaris* L. bitkisinin uçucu yağ bileşenleri üzerinde yapılan bazı çalışmalar sonucu elde edilen sonuçların özeti (Stahl-Biscup ve Sáez, 2002).

Ülke	Uçucu Yağ Bileşenleri	Referans
Fas	1,8-cineole % 35,7-44,4; camphor % 11,6-16,3; camphene % 8,1-10,9; linalool, borneol.	Garcia-Martin ve ark., 1974
	Linalool + linalyl asetat % 90-98; α -terpineol + terpinyl asetat % 90-96; thymol + ρ -cymene % 50-65.	Elena-Rossella, 1976
	1,8-cineole; thymol; carvacrol; tr-sabinene hydrate/terpinen-4-ol; linalool; α -terpineol.	Adzet ve ark., 1977
	1,8-cineole % 33; camphor % 14,5; camphene % 11,4; ρ -cymene; γ -terpinen.	Mateo ve ark, 1978; Morales, 1986
	1,8-cineole 23,2; thymol % 17,2; camphor % 12,8; ρ -cymene; borneol.	Garcia Vallejo ve ark., 1992
Fransa	Geraniol + geranyl asetat % 93; Linalool + linalyl asetat % 95; α -terpineol + terpinyl asetat % 90-96; <i>trans</i> -sabinene hidrat %56; terpinen-4-ol + terpinen-4-yl asetat % 43; cis-myrcen-8-ol % 10-20;; thymol % 65.	Granger ve Passet, 1971,1973
Sudi Arabistan	thymol % 62,2; carvacrol % 24,8; ρ -cymene; linalool; Δ -3-carene	Mossa ve ark., 1987
Yeni Zellanda	carvacrol % 43; ρ -cymene % 41; α -pinene; limonene; borneol.	Montes Guyot ve ark. 1981
Kamerun	thymol % 62,2; ; ρ -cymene % 41; α -terpinene % 22,7; linalool; β -caryophyllene.	Amvam Zollo ve ark., 1998

Türkiye’de Bitkilerle Tedavi (Baytop, 1999) adlı kitapta da kekiğin sayısız yararlarından ve kullanım şekillerinden bahsedilmektedir. Bunlardan bazıları şöyledir: Kekik vücuttaki yağları eritir, bu özelliğinden dolayı vücuttaki suyu atar. Hem kilo vermeye, hem de vücuttaki kan sirkülasyonunu hızlandırdığından dolayı kalbe faydalıdır. Böbrek taşlarının düşürülmesine yardım eder. Adet düzensizliği ve damar sertliğinde de kullanılmaktadır. Kan şekerini düşürür. Salgı bezlerini uyarıp düzenli çalışmasını sağlar. Kekik çiçekli sapı idrar söktürücüdür. Gaz giderici ve mide bulantısını teskin edici olarak kullanılır. Bağırsak parazitlerine karşı etkidir. Baş ağrılarına iyi gelir. Geçici olarak tansiyonu düşürür. Hafızayı kuvvetlendirir. Uykusuzluğa iyi gelir. Ağız antiseptiğidir. Diş ağrısını giderir. Çocuklarda kansızlığı önler. Egzama ve uyuz tedavisinde kullanılır. Sara krizlerine karşı da önerilir. Afrodisyaktır. Saç banyolarında kullanılırsa, kırılan, dökülen saçları canlandırır, hoş bir parlaklık verir. Kekikten doğal boyamacılıkta da yararlanır. Yapraklarından çeşitli mordanlarla bej, gri ve haki renk elde edilir. Yün ve pamuk ipliklerinin boyanmasında kullanılır. Şap hastalığına karşı hayvanın ağız kaynatılmış kekik suyu ile yıkanır. Hayvanların dişeti iltihabında bir miktar kekik, şarapla karıştırılarak sürülür. Ancak hamileler ve guatr olanlar kullanmamalıdır. Bunun nedeni guatr olanlarda halsizlik, mide bulantısı, baş dönmesi ve kalp çarpıntısı meydana geldiğinin tecrübe edilmiş olmasıdır. Hamile bireylerde de düşük riskini artırmaktadır. Bu yan etkilerle birlikte kekik yağının tümör yapıcı madde olduğu ve karaciğer üzerinde zararlı etkileri olduğu bilinmekte ve dikkatli kullanılması önerilmektedir (Baytop, 1999; Eröztürk, 2000, Treben, 2008).

1.5.2. *Thymus longicaulis* C. Presl

Mor, pembe veya beyaz renkte çiçek açan, 15 cm’ye kadar boylanabilen çok yıllık bitkilerdir. Çiçekli gövdeler tamamen veya gövdenin iki yüzeyi boyunca tüylüdür. Yapraklarında bulunan yağ kesecikleri çok sayıda ve kırmızı renklidir. Ülkemizde Marmara Bölgesi başta olmak üzere, Ege, Akdeniz, İç Anadolu ve Karadeniz bölgelerinde 1800 m yüksekliğe kadar oldukça geniş bir alanda yayılış göstermektedir. Yayılış gösterdiği yüksekliğe ve iklime bağlı olarak Nisan-Ağustos ayları arasında çiçeklenmektedir (Davis, 1965).

Oldukça yaygın kullanılan tıbbi bitkilerden biri olan *T. longicaulis* C. Presl, etnobotanik açıdan oldukça önemli bir türdür (Guarrera, 2005). İçerdiği flavonoidler

ve uçucu yağlardan dolayı (Çizelge 1.8), antiseptik, nefes açıcı, sancı giderici etkisi vardır. Ayrıca, yağının antibakteriyel, antifungal, antioksidatif özellikleri olduğu ve bu özellikleri nedeniyle bazı yiyeceklerin uzun süreli saklanması için kullanıldığı rapor edilmiştir (Gortzi, 2006).

Çizelge 1.8. *Thymus longicaulis* C. Presl bitkisinin içerdiği uçucu yağ bileşenleri (Jovanovic, 2009).

Bileşen	%	Bileşen	%
α -Terpinenyl asetat	67,52	Camphene	0,51
Thymol	4,47	Germacrene D	0,50
Limonene	3,58	<i>cis-p</i> -Menthe-1 (7),8-dien-2-ol	0,49
α -Terpineol	3,43	Nerolidol	0,47
γ -Terpinen	2,07	Borneol	0,46
Myrcene	1,94	Linalool	0,38
β -Caryophyllene	1,54	α -Terpinene	0,27
1-Octen-3-ol	1,53	3-Octanol	0,26
3-Octanone	1,30	Carvacrol methyl ether	0,26
<i>p</i> -Cymene	1,21	α -Pinene	0,20
3-Octanyl asetat	0,98	Terpinen-4-ol	0,16
Methyl thymyl ether	0,91	Juniper camphor	0,13
Sabinene	0,82	Caryophyllene oxide	0,12
1-Octen-3-yl asetat	0,79	<i>trans</i> -Geraniol	0,10
β -Bisabolone	0,70	α -Humulene	0,10
α -Terpinolene	0,60	Carvacrol	0,09

1.5.3. *Thymus cariensis* Hub.-Mor. & Jalas

Çok yıllık, taban kısmı odunsu, 12-20-(30) cm'ye kadar boylanabilen, pembe veya beyaz renkli çiçek açan, çalimsı bitkilerdir. Doğu Akdeniz elementi olup, endemik bir türdür. Deniz seviyesinden 70 m yükseklikte, maki ve kızılçam açıklıklarında yayılış gösterirler ve Haziran-Temmuz aylarında çiçeklenirler. Türkiye'de yalnızca Muğla ilinde Fethiye yolu üzerinde dar bir alanda yayılış göstermektedir (Davis, 1965). Baser ve arkadaşları tarafından gaz kromatografisi ve kütle spektrometre çalışmaları yapılarak *T. cariensis* Hub.-Mor. & Jalas bitkisine ait, % 13,42 borneol, % 12,65 1,8-cineole ve % 12,15 α -pinene uçucu yağ bileşenleri tanımlanmıştır (Baser ve ark., 1992).

1.6. Tezin Amacı

Tez çalışması kapsamında, bitki doku kültürü, orta dereceli saklama, kriyoprezervasyon teknikleri ve genetik kararlılığın moleküler belirteçlerle belirlenmesi gibi bitki biyoteknolojisi alanındaki güncel teknolojiler kullanılarak *Thymus vulgaris*, *T. longicaulis* ve *T. cariensis* bitki türlerine yönelik çalışmalar amaçlanmıştır. Ayrıca değerli bitki germplazmasının güvenli bir şekilde ve uzun süreli saklanması anlamında da pratik ve bilimsel sonuçlar elde edilmesi tezin hedefleri arasındadır. Bu bağlamda kekik bitkisinden klonal bitki eldesini sağlayacak protokoller geliştirilmiş olup, elde edilen bitkilerden sağlanacak çeşitli eksplantların sıvı azot içinde canlılıklarını kaybetmeden sınırsız sürelerde saklanmasına imkan tanıyacak kriyoprezervasyon yöntemleri belirlenmiştir. Bununla birlikte, elde edilen klon bitkilerin, genetik kararlılıklarının korunma derecesi moleküler belirteçler yardımıyla görüntülenmiştir. Kekik bitkisi üzerinde yapılan mikroçoğaltım çalışmalarının hiçbirisinde elde edilen klon bitkilerin genetik kararlılığı moleküler belirteçlerle analiz edilmemiştir. Dolayısıyla bu tez çalışması, *T. vulgaris*' in Murashige ve Skoog (1962) adlı araştırmacılar tarafından geliştirilen ve günümüzde sürdürülen doku kültürü çalışmalarında en çok kullanılan besiyeri olan MS besiyerinde, çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri varlığında mikroçoğaltımı, elde edilen klon bitkilerin genetik kararlılığının moleküler belirteçler kullanılarak analizi açısından bir ilk olmuştur. Benzer şekilde, *T. vulgaris* ve *T. cariensis*'in kriyoprezervasyon yoluyla uzun süreli saklanması üzerine yapılmış her hangi bir çalışma da bulunmamaktadır. Dolayısıyla elde edilen sonuçlar literatürde özgündür ve bu anlamda ulusal ve uluslararası dergilerde yayınlanma potansiyeline sahiptir. Ayrıca, geliştirilmiş olan biyoteknolojik yöntemler, bitki germplazmasının saklanmasında görev alan çeşitli ticari laboratuvarlar ve enstitüler için de alternatif ve gelişmiş üretim ve saklama yöntemleri sunabilir. *T. vulgaris* bitkisi için geliştirilmiş olan kriyoprezervasyon protokolleri, nesli tükenme tehlikesi ile karşı karşıya olan benzer bir türün (*T. cariensis*) korunmasını sağlayabilmiş, bununla birlikte, ülkemizde ilk kez bölümümüzde kurulmaya çalışılan kriyobankaların ilk örnek bitkileri arasında yer almıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEMLER

2.1. GEREÇLER

2.1.1. Bitki Materyali

Tez çalışması sırasında bitki materyali olarak hem *T. vulgaris* L. bitkisinin tohumlarının çimlendirilmesi yoluyla elde edilmiş olan genç fideler, hem de doğal yayılış alanlarından toplanmış olan olgun *T. longicaulis* C. Presl var *longicaulis* ve *T. cariensis* Hub.-Mor. & Jals bitkilerine ait gövde segmentleri kullanılmıştır. *T. vulgaris* L. bitkisine ait tohumlar Florsilva (Bologna, İtalya)' dan temin edilmiştir. *T. longicaulis* C. Presl var *longicaulis* bitkisi Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Muallimköy Kampüsü (Kocaeli) civarlarından ve Pendik (İstanbul)' dan, endemik bir tür olan *T. cariensis* Hub.-Mor. & Jals ise Muğla, Fethiye yolu 40. Kilometrede, yolun sağ tarafında, dar bir yayılış alanından toplanmıştır. *T. longicaulis* ve *T. cariensis* örneklerin teşhisi tarafımızca "Flora of Turkey and East Aegean Islands" (Davis, 1965) adlı kitapta bulunan *Thymus* cinsine ait teşhis anahtarı kullanılarak yapılmış olup daha sonra Ege Üniversitesi Herbariumu'nda kontrol edilmiştir.

2.1.2. Kimyasal Malzemeler

2.1.2.1. Mikroçoğaltımda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışması sırasında, bitki materyalinin dekontaminasyonunda ve mikroçoğaltım aşamasında en uygun rejenerasyon ve köklenme besiyerlerinin belirlenmesinde kullanılan kimyasallar, vitaminler ve bitki büyüme düzenleyicileri, MS besiyerlerinde kullanılan makro ve mikro elementler Çizelge 2.1' de verilmiştir. Ayrıca, MS besiyerinin hazırlanmasında kullanılan stok çözeltiler (makro ve mikro elementler, vitaminler), sukroz ve fitajel oranları Çizelge 2.2' de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Olgun ve genç bitki materyalinin dekontaminasyonunda ve mikroçoğaltım aşamalarında kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
Etil alkol (%96)	Pro-Lab	-
H ₂ O ₂ (Hidrojen peroksit)	Merck	-
Ticari çamaşır suyu (Domestos)	Unilever	-
Zefiran	Kimpa [®]	-
Glisin	Merck	1.04201.0100
Nikotinic asit	Sigma	N-0765
Tiamin HCl	Sigma	T-3902
Pirodoksine HCl	Sigma	P-8666
Myo-inositol	Sigma	I-3011
Gelrite	Duchefa	G1101.100
Sukroz	Merck	1.07651.1000
GA ₃ (Giberellik asit)	Sigma	G-7645
AgNO ₃ (Gümüş nitrat)	Sigma	S-6506
IAA (İndolasetik asit)	Sigma	I-2886
IBA (İndolbütirik asit)	Sigma	I-5386
KIN (kinetin)	Sigma	K-3378
NAA (Naftalenasetik asit)	Sigma	N-0640
TDZ (Thidiazuron)	Duchefa	T0916.0250
2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit)	Sigma	D-7299
BA (Benzil adenin)	Sigma	B-3408
NH ₄ NO ₃ (Amonyum nitrat)	Sigma	A-3795-500
KNO ₃ (Potasyum nitrat)	Sigma	P-8291
KH ₂ PO ₄ (Potasyum fosfat)	Sigma	P-8416
CaCl ₂ .2H ₂ O (Kalsiyum klorür)	Sigma	C-2536
MgSO ₄ .7H ₂ O (Magnezyum sülfat)	Sigma	M-7899
H ₃ BO ₃ (Borik asit)	Sigma	B-9645
KI (Potasyum iyodür)	Riedel-de Haen	03124
MnSO ₄ .4H ₂ O (Mangan sülfat)	Sigma	M-7899
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Çinko sülfat)	Sigma	Z-1001
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (Molibdik asit)	Sigma	M-1651
CuSO ₄ .5H ₂ O (Bakır sülfat)	Sigma	C-8027
CoCl ₂ .6H ₂ O (Kobalt klorür)	Sigma	C-2911
FeSO ₄ .7H ₂ O (Demir sülfat)	Sigma	F-8263
Na ₂ EDTA (Sodyum etilendiamintetraasetik asit)	Sigma	4503

Çizelge 2.2. MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiyeri içeriği

	Derişim (mg/L)
Makro Elementler	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
CaCl . 2H ₂ O	440
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
Mikro Elementler	
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
MnSO ₄ . 4H ₂ O veya MnSO ₄ . H ₂ O	22.3 – 16.9
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025
Demir	
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	40
Organik Bileşenler	
Glisin	2.0
Nikotinik Asit	0.5
Tiamin HCl	0.1
Pirodoksin HCl	0.5
Myo-inositol	100 mg/l
Gelrite	3 g/l
Sukroz	30 g/l
pH	5.7 – 5.8

2.1.2.2. Moleküler Analizlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasının moleküler analizler aşamasında bitki materyalinden genomik DNA izolasyonu, RAPD PCR reaksiyonları, ve izole edilen genomik DNA' lar ile elde edilen PCR ürünlerinin görselleştirilmesi aşamalarında kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 2.3 ve 2.4' te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
CTAB (Setil Trimetil Amonyum Bromid)	Merck	1.02342.0100
Tris-HCl	AppliChem	A3452.0250
NaCl	Sigma	204439
EDTA	Sigma	431788
PEG (polietilen glikol)	Sigma	579319
β -Merkaptoetanol	Sigma	M-6250
PVP (Polivinilprolidon)	Sigma	P-2307
Kloroform	Sigma	372978
Oktanöl	AppliChem	A3461.1000
İzoamil alkol	Sigma	309435
İzopropanol	Sigma	I-9030
Fenol	Sigma	328111
Amonyum asetat	Sigma	372331
RNaz A 10 mg/ml	Intron Biotechnology	27062
Proteinaz K 1 ml (30 mg/ml)	Intron Biotechnology	32181

Çizelge 2.4. RAPD PCR reaksiyonlarında, ayrıca izole edilen genomik DNA ve elde edilen PCR ürünlerinin görüntülenmesi sırasında kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
Taq DNA polimeraz 100 U (5 U/ μ l)	Roche	11146165001
Taq DNA polimeraz 100U (5 U/ μ l)	Fermentas	EP0401
dNTP karışım 1 ml (2.5 mM herbiri)	İntron Biotechnology	25022
Trisma BASE	Sigma	T-6066
Glacial asetik asit	Sigma	380121
Etidyum bromid	Sigma	E-8751
Agaroz	Merck	1.16802.0250
λ DNA-Hind III (0.05 mg)	Fermentas	SM0103
1 kb DNA belirteç 0.5 mg DNA/ml	Fermentas	SM0318
500 bp DNA belirteç 0.05 μ g/ μ l	Fermentas	SM0643

RAPD PCR reaksiyonlarında kullanılan, rastgele seçilmiş olan oligonükleotid primerler ve bu primerlere ait baz dizilimleri Çizelge 2.5' te verilmiştir.

Çizelge 2.5. RAPD PCR reaksiyonlarında kullanılan oligonükleotid primer listesi.

Primer adı	Primer Baz Dizisi
F03	CCT GAT CAC C
F05	CCG AAT TCC C
F08	GGG ATA TCG G
F09	CCA AGC TTC C
F10	GGA AGC TTG G
F11	TTG GTA CCC C
F13	GGC TGC AGA A
F14	TGC TGC AGG T
F15	CCA GTA CTC C
F16	GGA GTA CTG G
F18	TTC CCG GGT T
K01	CAT TCG AGC C
K02	GTC TTC GCA A
K03	CCA GCT TAG G
K06	CAC CTT TCC C
K07	AGC GAG CAA G
K08	GAA CAC TGG G
K09	CCC TAC CGA C
K10	GTG CAA CGT G
K11	AAT GCC CCA G

2.1.2.3. Kriyoprezervasyonda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bitki materyalinin PVS2-vitrifikasyonuna dayalı çeşitli yöntemlerle kriyoprezervasyonu sırasında kullanılan malzemeler Çizelge 2.6' de verilmiştir.

Çizelge 2.6. Kriyoprezervasyon aşamasında kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Merck	K33960252
Gliserol	Merck	1.04093.2500
Sukroz	Merk	1.07651.1000
Etilen Glikol	Merck	K34762849
Sodyum Aljinat	Carlo Erba	366551
CaCl ₂ (Kalsiyum Klorit)	Sigma	C-2536
Sıvı Azot	Messer	-

2.1.3. Cihazlar

Tez çalışması süresince, mikroçoğaltım, iklimlendirme, moleküler analizler ve kriyoprezervasyon aşamalarında kullanılan tüm cihazlar Çizelge 2.7' de verilmiştir.

Çizelge 2.7. Tez çalışması sırasında kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Model	Firma Adı	Ülke
Laminar Akımlı Kabin	Hera Guard	Heraus	Almanya
Laminar Akımlı Kabin	Clean Air®	PMW Company	Telster Hollanda
Sterilizatör	Steri 350	Keller	İsviçre
Isıtıcı Karıştırıcı	Manyetik SLK6	Schott Gerate GMBH	Almanya
Isıtıcı Karıştırıcı	Manyetik MR3001	Heidolph	Almanya
pH Metre	Multical®	Wissenschef TW	Flinch Almanya
Elektrikli Pipetör	Pipetus® - standart	Hirschmann	Almanya
Etüv	E28	Binder	Almanya
Buzdolabı	TN6FNF	İndesit	Türkiye
Derin Dondurucu	GSF2200	İndesit	Türkiye
Mikrodalga Fırın	MW71E	Samsung	Malezya
Santrifüj	D-78532	Hettich Zentrifugen	Almanya
Santrifüj	Allegra™ 25R	Beckman Coulter	Amerika
Santrifüj	Mikrofuge® 22R	Beckman Coulter	Amerika
Jel Elektroforezi	MS09092879	Cleaver Scientific Ltd.	İngiltere
Termal Döngü Cihazı	PTC-200	MJ Research	Amerika
Jel Görüntüleme Sistemi	CN 3000	Wilber Lourmat	Fransa
Jel Görüntüleme Çıktısı	UP-D897	Sony	Japonya
Sıcak Su Banyosu	MP	Julaba	Almanya
Terazi	BL3100	Sartorius	Türkiye
Hassas Terazi	BL2105	Sartorius	Türkiye
Spektrofotometre	DU® 530	Beckman Coulter	Amerika
Liyafilizatör	RC101-RCT90	Jouan	Almanya
Fotoğraf Makinesi	PC1048	Canon	Japonya
Sıvı Azot Tankı	Arpege 40	Airliquide	Fransa

Çizelgelerde listelenen kimyasal madde ve cihazlara ek olarak, bitki materyalinin mikroçoğaltımı ve periyodik alt kültürlemeler sırasında çeşitli boylarda penset ve bistüriler, kesme tabağı (19 x 12 cm), besiyerlerinin hazırlaması sırasında çeşitli boylarda şişeler, beherler ve mezürler, bebek maması kapları (yükseklik 10 cm; çap 6 cm), Petri kapları (10 cm ya da 15 cm çapında), vitroentler (8 x 9 x 10,5 cm), kriyoprezervasyon çalışmaları boyunca, kriyovial tüpler (2 ml), kriyovial

kutuları (25 tüplük), sıvı azota transfer tablaları, kriyokoruyucu maske ve eldivenler, moleküler analizlerde kullanılmak üzere Beckman santrifüj tüpleri, falkonlar ve eppendorf tüpler, otomatik pipetler (1ml; 200 μ l; 20 μ l ve 2 μ l, Pipetman-Gilson), ayrıca cam ve plastik pipetler (5-10-20 ml), kültür tüpleri (15 x 2 cm, 15 x 1,5 cm), porttüp, spatül ve kaşıklar, otoklava girmeyen bazı sıvıların sterilizasyonunda kullanılan 0.2 μ m filtreler, süzme ve kurutmalarda kullanılan filtre kağıtları, parafilm, plastik streç ve aliminyum folyo, çeşitli boylarda erlenmayer ve balon jojeler, havanlar, verilerin alınmasında kullanılmak üzere çeşitli ölçülerde cetveller, cam kalemleri, farklı hacimlerde kavanoz ve cam şişeler ve plastik eldivenler kullanıldı.

2.2. YÖNTEMLER

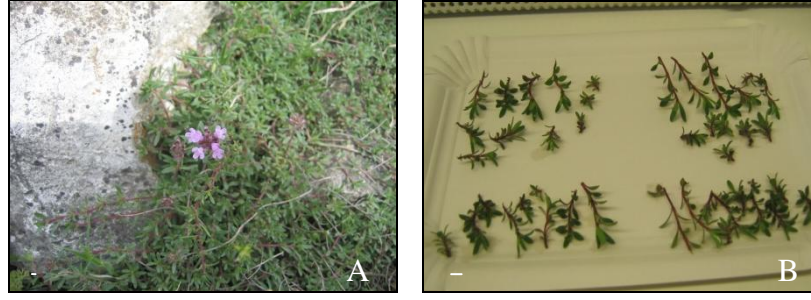
2.2.1. Mikroçoğaltım Yöntemleri

2.2.1.1. *T. longicaulis* ve *T. cariensis* Bitkilerine Ait Eksplantların Dekontaminasyonu

Thymus cinsine ait çeşitli kekik türlerinin (*Thymus vulgaris* L., *T. longicaulis* C. Presl var *longicaulis* ve *T. cariensis* Hub.-Mor. & Jalas), mikroçoğaltım yöntemi ile klonal olarak çoğaltılmasının amaçlandığı denemelerde, olgun bitki materyali olarak kullanılan örnekler Muallimköy (Kocaeli) ve Pendik (İstanbul) bölgelerinden elde edildi (Şekil 2.1A). Toplanan örneklerin *in vitro* şartlara aktarılması amacıyla, öncelikle uygun dekontaminasyon yöntemi geliştirilmeye çalışıldı. Denemelerde iki farklı çeşit eksplant (gövde ucu ve nod) kullanıldı ve eksplantler aşağıdaki şekilde dekontamine edildi:

- Olgun bitki materyalinden elde edilen bitki parçaları (yaklaşık 10 cm uzunluğundaki gövde parçaları) 1 saat boyunca akan musluk suyunda yıkandı.
- Yıkanan bitki parçaları %70' lik etanol (EtOH) çözeltisine batırılıp, yaklaşık 10-15 saniye muamele edildi.
- EtOH iyice kuruyup uzaklaşana kadar örnekler steril filtre kağıdı üzerinde, laminer akımlı kabin içinde bekletildi (30-40 dakika) (Şekil 2.1B).
- EtOH' den arındırılan örnekler %1; 1.5; 2; 2.5; 3; 3.5 veya 4' lük ticari çamaşır suyu (domestos) çözeltisi ile 30 veya 60 dakika boyunca muamele edildi.

Çamaşır suyunun iyice arındırılması için en az 3 kez steril dH₂O ile yıkanan örnekler, yaklaşık 1-2 cm uzunluğunda eksplantler halinde kesilerek, 1 mg/ml benzil adenin (BA) ve 0.01 mg/ml indol butirik asit (IBA) içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiyerine aktarıldıktan sonra, olası kontaminasyon ve rejenerasyon oranları gözlemlendi.

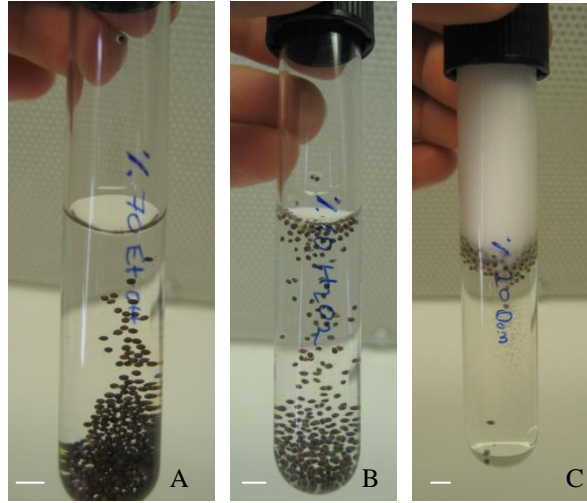


Şekil 2.1. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu ve nodal eksplantlar. (A) Muallimköy arazisinde yetişen ve denemelerde olgun bitki materyali olarak kullanılan *T. longicaulis* bitkisi, (B) alkolden arındırılması amacıyla laminar akımlı kabinde bekletilen, gövde ucu ve nodları içeren kekik gövde parçaları (Bar 0.5cm).

2.2.1.2. *T. vulgaris* L. Tohumlarının (Genç Materyal) Dekontaminasyonu

Kekik bitkisinin *in vitro* doku kültürü yöntemi ile hızlı bir şekilde çoğalmasını sağlayacak en elverişli mikroçoğaltım yönteminin optimize edilmesinde kullanılan bitki parçaları (gövde ucu ve nod eksplantları) Florsilva (Bologna, İtalya)'dan temin edilen *T. vulgaris* tohumlarının çimlendirilmesi sonucunda elde edilen bitkiciklerden sağlanmıştır. Bunun için öncelikle tohumların dekontamine edilmesi gerekmektedir. Tohum dekontaminasyonu için kullanılan yöntem Ozudogru ve ark. (2005) tarafından yerfistiği tohumlarının dekontaminasyonu için geliştirilmiş olan yöntemdir ve aşağıdaki gibi uygulanmaktadır:

- Tohumlar öncelikle %70' lik EtOH çözeltisinde 5 dakika boyunca çalkalandı ve böylece yüzey sterilizasyonu sağlandı (Şekil 2.2A).
- En az iki kez steril dH₂O ile yıkanarak alkolden arındırılan tohumlar %10' luk hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi ile 5 dakika boyunca çalkalandı (Şekil 2.2B).
- Tohumlar, H₂O₂' den arındırılabilmeleri için en az iki kez steril dH₂O ile yıkandı.
- %20' lik çamaşır suyu (domestos) çözeltisi içinde 15 dakika boyunca çalkalanan tohumlar, her biri en az beş dakika olmak üzere, en az üç kez steril dH₂O ile yıkandı ve çimlenmeleri için besiyerine aktarıldı (Şekil 2.2C).



Şekil 2.2. *T. vulgaris* tohumlarının dekontaminasyonu. Tohumların, %70' lik EtOH (A), %10' luk H₂O₂ (B) ve %20' lik çamaşır suyu (C) çözeltileri ile muamele edilmesi (Barlar 0.5cm).

2.2.1.3. *T. vulgaris* L. Tohumlarının Çimlendirilmesi

Bir önceki bölümde (Bölüm 1.2) anlatıldığı şekilde dekontamine edilen *T. vulgaris* L. tohumlarının çimlendirilmesi için, üçü *in vivo* olmak üzere, dört farklı yöntem denendi. *In vivo* çimlenme, tohumların (i) steril dH₂O ile ıslatılmış çift kat pamuk arasında çimlendirilmesi, (ii) bitki büyüme düzenleyicilerini içermeyen sıvı MS besiyeri (MS.0) ile ıslatılmış olan çift kat pamuk arasında çimlendirilmesi, ve (iii) steril edilmiş toprak içeren saksılarda, kontrollü iklim şartlarında çimlendirilmesi yoluyla sağlandı. Çimlenmenin pamuk arasında yapıldığı denemeler steril vitroent kaplar içinde ve pamukların 20 ml steril dH₂O veya MS.0 besiyeri ile ıslatılmasıyla gerçekleştirildi ve tohum çimlenmesi 45 gün boyunca izlendi. Topraktaki çimlenmenin gözlenmesi ise 100 gün boyunca sürdürüldü. *In vitro* çimlenme amacıyla tohumlar 90 mm çaplı Petri kapları içindeki yarı-katı MS.0 besiyerine aktarıldı ve 45 gün boyunca çimlenmeleri gözlemlendi. Tohumların çimlenme oranları, her bir tohumda elde edilen ortalama gövde sayısı ve gövde boyu *in vitro* koşullar için 30. ve 45. kültür günlerinde, topraktaki çimlenme için ise ayrıca 100. günde kaydedildi.

2.2.1.4. En Uygun Mikroçoğaltım Besiyerinin Belirlenmesi

Kekik bitkisinin *in vitro* koşullarda klonal çoğaltılması için en elverişli mikroçoğaltım yönteminin geliştirilmesi amacıyla, çeşitli bitki büyüme

düzenleyicileri (sitokininler, oksinler, gibberelik asit ve gümüş nitrat) çeşitli derişimlerde ve kombinasyonlarda denendi. Bunun için öncelikle sitokininlerin kekik bitkisinin mikroçoğaltımındaki etkilerini araştırıldı. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmalarda; BA, kinetin (KIN) ve thidiazuron (TDZ) 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 ve 3 mg/l derişimlerde yarı-katı MS besiyerine eklenmiş, her bir besiyeri kompozisyonuna en az 60 adet gövde ucu ve nod eksplanti aktarılarak 30 günlük alt kültür süresince bitki gelişimleri gözlemlendi. En elverişli sitokinin bitki büyüme düzenleyicisi belirlendikten sonra, bu bitki büyüme düzenleyicisi, değişik derişimlerde oksin bitki büyüme düzenleyicileri [İndol asetik asit (IAA), İndol bütirik asit (IBA), Naftalen asetik asit (NAA) ve 2,4 dikolorofenoksi asetik asit (2,4-D)] ile farklı derişimlerde, herbir kompozisyon için en az 60 gövde ucu eksplanti olacak şekilde denendi ve 30 günlük gelişmeleri kayıt edildi. Son olarak en uygun derişimlerdeki bitki büyüme düzenleyicisi kompozisyonu, farklı derişimlerde Gibberellik asit (GA₃) ve Gümüş nitrat (AgNO₃) ile denendi. Sonuçların değerlendirilmesinin ardından en uygun mikroçoğaltım besiyerine karar verildi.

2.2.1.5. Köklendirme Besiyerinin Belirlenmesi

En elverişli mikroçoğaltım besiyerinde çoğaltılan kekik gövdelerinin toprağa aktarılmaları öncesinde, en uygun köklendirme besiyerinin belirlenmesi amacıyla bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı-katı MS besiyerinde ve farklı derişimlerde farklı oksin bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS besiyerlerinde, her bir deneme için 60 gövde 30 gün süreyle köklendirildi ve elde edilen sonuçlar değerlendirilerek en uygun köklenme besiyeri belirlendi.

2.2.1.6. İklimlendirme ve Toprağa Adaptasyon

En elverişli köklendirme besiyerinde 30 gün süreyle köklenmeye alınan kekik gövdelerinin, *in vitro* ortamdan toprağa aktarılma sürecinde uyum sorununu ortadan kaldırmak amacıyla bazı uygulamalar yapıldı. Bunlardan ilki, aseptik koşullardaki *in vitro* ortamdan gelen bitkilerin, toprakta bulunan olası bakteri ve fungusların olumsuz etkilerinden uzaklaştırılması amacıyla, iklimlendirmede kullanılacak olan toprağın otoklav ile steril edilmesidir. Toprağa aktarım sonrasında *in vitro* ortamdan gelen bitkilerin hızlı bir şekilde su stresiyle karşılaşmaması için, toprağa aktarılan bitkilerin üstü ışık geçiren bir kap ile kapatıldı ve gaz giriş-çıkışını sağlayacak bir delik açılarak doğrudan güneş ışığı almayan aydınlık bir ortama alındı. Daha sonra 2-

3 günlük periyotlarda üst kısma birer delik daha açılarak yavaş yavaş ortama adaptasyonları sağlandı. 10-15 gün sonra üst kısım tamamen açıldı ve 30-45 gün sonra toprağa uyum fotoğraflandı.

2.2.1.7. Ölçme Yöntemleri ve Verilerin Değerlendirilmesi

Dekontaminasyon yönteminin başarısı, denenen her bir yöntem sonucunda elde edilen rejenerasyon başarısı, elde edilen temiz materyalin canlı kalabilme ve rejenerere olabilme yeteneğinde olan bitki parçasının % cinsinden hesaplanması ile belirlendi. Mikroçoğaltım ve kriyoprezervasyon yöntemlerinin optimizasyonu sırasında elde edilen bitki gelişmeleri, *in vitro* şartlara aktarılan her bir bitki parçasının 4 haftalık ilk alt kültür periyodu sonucunda elde edilen gövde gelişim oranı (%), gövde sayısı ve elde edilen gövdelerin boyu kaydedilerek belirlendi. Benzer şekilde, çeşitli derişimlerde oksin içeren besiyerlerine aktarılan gövdelerin köklenme oranları da % cinsinden belirlendi, ayrıca her bir gövde başına elde edilen kök sayısı ve kök uzunluğu da kaydedildi. Gövde oluşturma ve kök oluşturma kapasiteleri aşağıdaki formüllere göre hesaplandı;

G.O.K. (Gövde oluşturma kapasitesi) = (% Rejenerasyon x Ort. gövde sayısı) / 100

K.O.K. (Kök oluşturma kapasitesi) = (% Köklenme x Ortalama kök sayısı) / 100

(Lambardi, 1993).

2.2.2. Moleküler Analizler

2.2.2.1. CTAB Yöntemi ile Kekik (*Thymus vulgaris* L.) Bitkisinden Genomik DNA İzolasyonu

Mikroçoğaltım için en elverişli şartların belirlenmesini takiben, yöntemin kekik bitkisinin genetik kararlılığı üzerindeki etkisini tespit etmek amacıyla 4 haftalık periyotlarla yapılan ardışık 10 alt kültür sırasında, her iki alt kültürde bir 3-4 gram bitki örneği ayrılarak, moleküler analizlerde kullanılmak üzere -80°C derin dondurucuda saklandı. Moleküler analizlerde kullanılan bitki materyali, tek bir tohumun çimlendirilmesi ve izole edilen gövde uçlarının mikroçoğaltımı yoluyla elde edilen klon bitkilerden oluşmaktadır.

Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Enzim Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı'nda, zeytin (*Olea europaea*) çeşitleri arasındaki akrabalık derecelerinin

belirlenmesine yönelik projeler kapsamında yapılan deneylerin bir bölümünde kullanılan genomik DNA' lar CTAB yöntemi kullanılarak elde edildi (Doyle ve Doyle, 1987). *Thymus* cinsine ait türlerden genomik DNA elde etmek amacıyla da öncelikle, daha önce optimize edilmiş olan bu yöntemin etkinliği denendi. İzolasyon protokolü aynen uygulanmakla birlikte, zeytin bitkisinden genomik DNA elde etmek için başlangıç materyali olarak 5 gr yaprak kullanılırken, *Thymus* bitkisi için 1 gr yaprak kullanıldı. CTAB yöntemiyle genomik DNA izolasyonu sırasında kullanılan çözeltiler Çizelge 2.8' da verilmiştir.

Çizelge 2.8. CTAB yöntemiyle genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler.

Çözelti	Bileşenleri ve oranı
CTAB 1	100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1.4 M NaCl; 20 mM EDTA; % 2 CTAB
CTAB 2	% 10 CTAB; 0.7 M NaCl
PEG	% 13 PEG 8000; 1.6 M NaCl; 0.2 µm filtre ile steril edildi
TE	10mM Tris-HCl, pH 7.5; 1 mM EDTA, pH 8.0
Kloroform/Oktanöl	24:1
Fenol/Kloroform/İzoamilalkol	25:24:1
Kloroform/İzoamilalkol	24:1
Etanol Çözeltisi	10M Amonyum Asetat içeren % 75 Etil Alkol

Buna göre, kekik bitkisinde genomik DNA izolasyonu aşağıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi;

- -80°C' ta saklanan örneklerden 1 gr (yaprak veya taze sürgünler) alınarak steril bir havanda sıvı azot altında toz haline getirildi.

- Toz haline getirilen örnekler Beckman santrifüj tüplerine (TA-14-50) alınıp, üzerlerine 5 ml CTAB 1 çözeltisi eklendikten sonra el ile alt-üst edilerek 3-5 dakika karıştırıldı. Daha sonra örneklerin üzerine son derişimi %0.2 olacak şekilde β-merkaptöetanol (8 µl 14.3 M β-merkaptöetanol) eklenip, yine el ile 3-5 dakika alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra 100 mg çözünmeyen PVP eklendi. El ile alt üst

edilerek karıştırılan örnekler, 65°C' a ayarlanmış su banyosunda, 5-15 dakika aralıklarla alt-üst edilerek, 1 saat boyunca inkübe edildi.

- İnkübasyonun ardından tüpler buza alınarak soğutuldu ve 2 ml kloroform/oktanol (24:1) eklenip, 10 dakika süre ile alt-üst edilerek iyice karıştırıldıktan sonra, oda sıcaklığında 7000 g' de 30 dakika santrifüj edildi.

- Üst faz temiz bir santrifüj tüpüne alınıp, üzerine 500 µl CTAB 2 çözeltisi eklendi. Alt-üst edilerek iyice karıştırıldıktan sonra +4°C' ta 8500 g' de 20 dakika santrifüj edildi.

- Üst faz temiz bir santrifüj tüpüne alındıktan sonra 0.6 hacim soğuk izopropanol eklenerek iyice karıştırıldı ve -20°C' ta 10 dakika bekletildikten sonra +4°C' ta 8500 g' de 30 dakika santrifüj edildi.

- Üst sıvı vakum ile çekilip uzaklaştırıldıktan sonra pelet 500 µl soğuk etanol çözeltisi (10 mM amonyum asetat içeren %75 etanol) ile hafifçe yıkanıp, oda sıcaklığında 8500 g' de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı vakumla uzaklaştırıldıktan sonra pelet iyice kuruyana dek inkübatörde 37°C' ta bırakıldı.

- DNA peleti üzerine 100 µl TE çözeltisi (peletin büyüklüğüne bağlı olarak 250 µl) eklenerek +4°C' ta gece boyu çözülmeye bırakıldı. Ertesi gün 55°C sıcak su banyosunda 30 dakika inkübe edildikten sonra çözünen örnekler ependorf tüplere alındı.

- Örneklere son derişimi 0.1 mg/ml olacak şekilde 10 mg/ml RNaz A çözeltisi eklendikten sonra 37°C' ta 45 dakika inkübe edildi.

- İnkübasyonun ardından örneklere 1 mg/ml proteinaz K çözeltisinden son derişimi 0.01 mg/ml olacak şekilde eklendi ve 37°C' ta 30 dakika inkübe edildi.

- İnkübasyonun ardından örneklere eşit hacimde fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi eklendi ve alt-üst edilerek 5 dakika karıştırıldı. Daha sonra +4°C' ta 13.000 g' de 15 dakika santrifüj edildi. Üst faz temiz bir ependorf tüpüne alınarak

üzerine eşit hacimde kloroform/izoamilalkol (24:1) eklendi ve alt-üst edilerek karıştırıldıktan sonra +4°C' ta 13.000 g' de 15 dakika santrifüj edildi.

- Üst faz temiz bir ependorf tüpüne aktarıldıktan sonra üzerine eşit hacimde PEG çözeltisi eklendi ve buzda 5 dakika bekletilip +4°C' ta 12.000 g' de 20 dakika santrifüj edildi.
- Üst faz vakumla çekildikten sonra DNA çökeleği %75' lik etil alkol ile yıkandı ve +4°C' ta 12.000 g' de 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst sıvı vakumla çekilerek uzaklaştırıldıktan sonra DNA çökeleği vakum altında kurutuldu.
- Elde edilen DNA çökeleği, çöktürme öncesi hacmine eşit hacimde dH₂O eklendikten sonra +4°C' ta gece boyu çözünmeye bırakıldı (bu aşamada çözünmeyi kolaylaştırmak için örnekler 55°C' ta 30-60 dakika inkübe edilebilir).

2.2.2.2. Agaroz Jel Elektroforeziyle DNA Görüntülenmesi

Elde edilen genomik DNA' lar %1' lik agaroz jelde yürütülerek incelendi. Bunun için jele her bir örnekten 1 ve 3 µl yüklendi. Ayrıca, 10 µl DNA örneği 65 µl dH₂O ile sulandırıldıktan sonra mikroküvete alınarak spektrofotometrede 220-325 nm aralığındaki absorbansları ölçüldü ve DNA derişimleri hesaplandı (DNA µg/µl = OD₂₆₀ x 50 x 7.5).

2.2.2.3. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR) Yöntemi

PCR reaksiyonlari rastgele dizayn edilmiş 20 primer kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon 25 µl toplam hacimde ve 0.5 ml ince cidar PCR tüplerinde gerçekleştirildi. Kullanılan PCR reaksiyon karışımı şu şekildedir; 10x PCR tamponu (ROCHE) (1.5 mM MgCl₂), 2.5 µl; dNTP (2.5 mM) 1 µl; Primer (50 ng/µl), 1 µl; Kalıp DNA (20 ng/µl), 2 µl; Taq DNA Pol (1 U/µl) (ROCHE; 5U), 1 µl; dH₂O, 17.5 µl.

PCR Döngüleri; 95°C' ta 5 dakikalık ön denatürasyonu takiben 95°C' ta 30 saniye (denatürasyon); 35°C' ta 1 dakika (primer bağlanması) ve 72°C' ta 1 dakika

40 saniyelik (uzama) 35 döngü şeklinde gerçekleştirildi ve reaksiyonlar 72°C' ta 8 dakika daha bekletilerek tüm amplifikasyonların tamamlanması sağlandı.

2.2.2.4. RAPD-PCR Ürünlerinin Jel Elektroforeziyle Görüntülenmesi

Her bir PCR ürününden 18 µl alınıp 3 µl 6x boya ile karıştırılarak jele yüklendi. PCR ürünleri %1' lik agaroz jel (0,3 g agaroz, MERCK; 30 ml 1x TAE tampon; 3 µl etidyum bromid (10 mM)) üzerinde yürütüldükten sonra görüntüledi. Belirteç olarak 100 bp DNA belirteç (Fermentas, kullanıma hazır, 0.01 mg/ml DNA) kullanıldı. Jele yüklenen örnekler 80 voltta yürütüldükten sonra Wilber Lourmat CN 3000 model jel görüntüleme sisteminde görselleştirilip değerlendirildi.

2.2.3. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) Bitkisinin Orta Dereceli Saklanması

Kekik bitkisinin yavaş büyütme yöntemi ile orta dereceli saklanmasında, mikroçoğaltım aşamasında belirlenen en uygun rejenerasyon besiyeri kullanıldı. Yaklaşık 3-6 cm uzunluğunda kesilen *T. vulgaris* bitkisine ait gövdeler, içinde yarıkatı rejenerasyon besiyeri bulunan bebek maması kaplarına, her bir kaptaki 25-30 gövde olacak şekilde aktarıldı (denemelerde her ay için 3 kap olacak şekilde toplam 39 bebek maması kabı kullanıldı). Aktarımı takip eden ilk 14 gün boyunca standart büyüme şartlarında (23°C sıcaklık, 16/8 saat fotoperiyot) tutulan kültürler daha sonra bir karton kutuya ışık almayacak şekilde yerleştirilip +4°C' ta soğuk odaya alındı. Her ay soğuk odada saklanan kaplardan 3 tanesi geri alınarak, saklama periyodu sonundaki canlılık oranları değerlendirildi, ayrıca 60 gövde ucu alınarak tekrar rejenerasyon besiyerine aktarıldı ve standart şartlardaki 4 haftalık kültür periyodu sonucunda sahip oldukları rejenerasyon oranları, her bir eksplantten elde edilen gövde sayısı ve gövde boyları değerlendirildi.

2.2.4. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) Bitkisinin Kriyoprezervasyon Yoluyla Uzun Süreli Saklanması

2.2.4.1. +4 °C Sıcaklıkta Ön Koşullandırma

Kriyoprezervasyon öncesi, kekik bitkisi için en uygun soğuğa alıştırma periyodunu belirlemek amacıyla *T. vulgaris in vitro* gövde kültürleri, 1-2-3-4 hafta süreyle +4°C sıcaklıktaki karanlık ortama alındı. Birer haftalık periyotlarda bitkilerden alınan gövde ucu eksplantları mikroçoğaltım aşamasında belirlenen en uygun besiyerinde 4 hafta kültürlendi. 4 haftalık süre sonunda gövde uçlarından

gelişen bitkilerin rejenerasyonları, gövde boyları ve oluşan gövde sayısı kayıt edilerek, bu veriler ışığında hesaplanan gövde oluşturma kapasitesine göre en uygun soğuğa alıştırmaya süresi belirlendi.

2.2.4.2. Sukroz Ön Koşullandırma

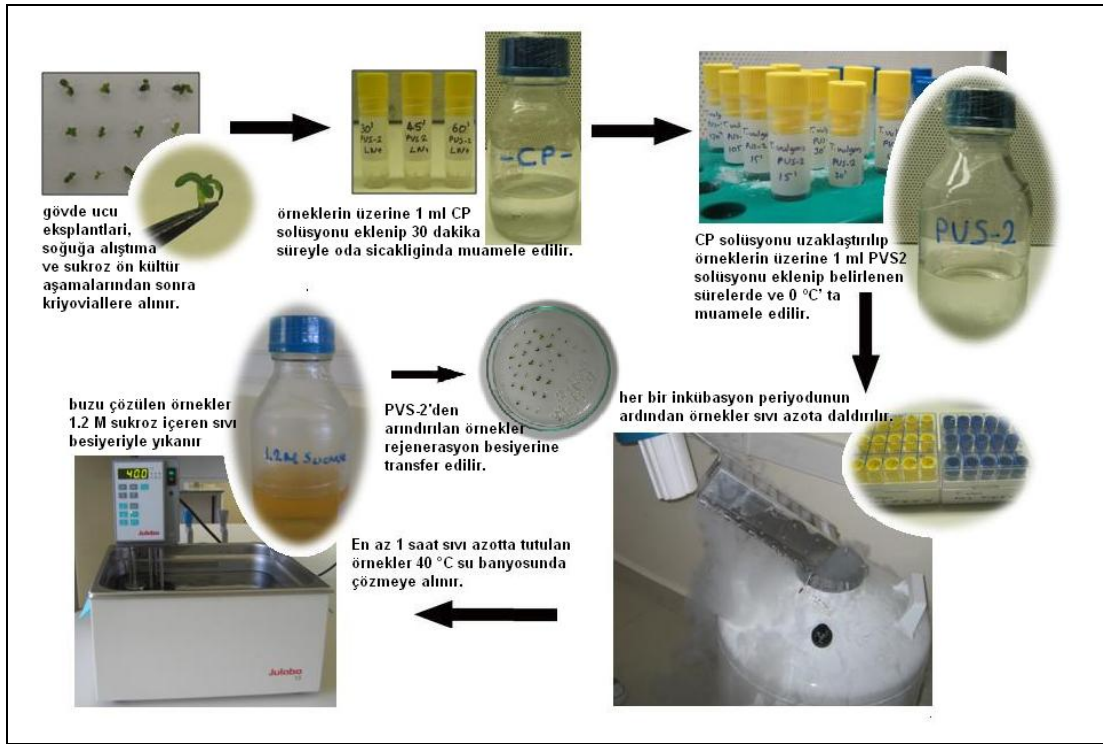
Kekik bitkisinin kriyoprezervasyon öncesi ön koşullandırma ikinci aşamasında sukroz ön kültür çalışması yapıldı. Bu çalışmada, çeşitli sukroz derişimlerinde farklı kültür sürelerinin bitkinin rejenerasyonu üzerindeki etkileri değerlendirildi. Buna göre, bitkiden alınan gövde ucu eksplantları 0.12 - 0.25 - 0.50 – 0.75 M ve 1 M sukroz içeren yarı-katı MS besiyerlerinde 24; 48 ve 72 saat kültürlendi, daha sonra yine mikroçoğaltım aşamasında belirlenen en uygun rejenerasyon besiyerine aktarıldı. 4 haftalık kültür sonucu bitkinin rejenerasyon oranı, gövde boyu ve gövde sayısı kayıt edildi. Bu veriler ışığında gövde oluşturma kapasitesi hesaplandı ve kriyoprezervasyon öncesi optimum sukroz ön kültür besiyeri belirlendi.

Çalışmada ayrıca sukroz derişiminin kademeli olarak artırılması yoluyla (eksplantlar 24 saatlik periyotlarda sırasıyla 0.12 –0.25-0.50 M veya 0.12 –0.25-0.50-0.75- 1 M sukroz derişimlerine aktarılmıştır) eksplantların ön koşullandırılması da denenmiştir.

2.2.4.3. PVS2 Vitrifikasyon Tekniği İle Kriyoprezervasyon

Kekik bitkisine ait gövde ucu eksplantları, soğuğa alıştırmaya ve sukroz ön kültür aşamalarından sonra doğrudan kriyoviallere alındı. Kriyoviallere alınan örneklerin üzerine 1 ml LS solüsyonu (kriyokoruyucu çözelti: 2 M gliserol, 0.4 M sukroz) eklenip 30 dakika süreyle oda sıcaklığında muamele edildi. LS uygulamasını takiben, solüsyon uzaklaştırıldı ve örneklerin üzerine 1 ml PVS2 solüsyonu (Sakai ve ark., 1990; % 30 gliserol, %15 etilenglikol, % 15 dimetilsülfoksit (DMSO), 0.4 M sukroz içeren sıvı MS besiyeri) eklendi ve örnekler 15-30-45-60-75-90-105 ve 120 dakikalık periyotlarla (her bir periyotta 30 gövde ucu eksplanti kullanılmış ve her bir deneme en az 2 kez tekrarlanmıştır) 0°C' ta muamele edildi. Her bir inkübasyon periyodundan sonra örnekler kriyovialler içerisinde doğrudan sıvı azota (SA +) transfer edildi. En az 1 saat sıvı azotta tutulan örnekler 40°C sıcak su banyosunda 1-2 dakika bekletilerek çözülüp 1.2 M sukroz içeren sıvı MS besiyeriyle yıkandıktan

sonra rejenerasyon besiyerine transfer edildi. Örneklerin diğer kısmı ise (kontrol grubu) PVS2 uygulamasını takiben sıvı azota daldırılmadan, 30 dakika 1.2 M sukroz içeren sıvı MS besiyeri ile yıkanıp uygun besiyerine transfer edildi. 4 haftalık rejenerasyon periyodunu takiben canlılık ve rejenerasyon oranları, her bir eksplanttan elde edilen gövde sayısı ve gövde boyu sonuçları kaydedilip değerlendirildi (Şekil 2.3).



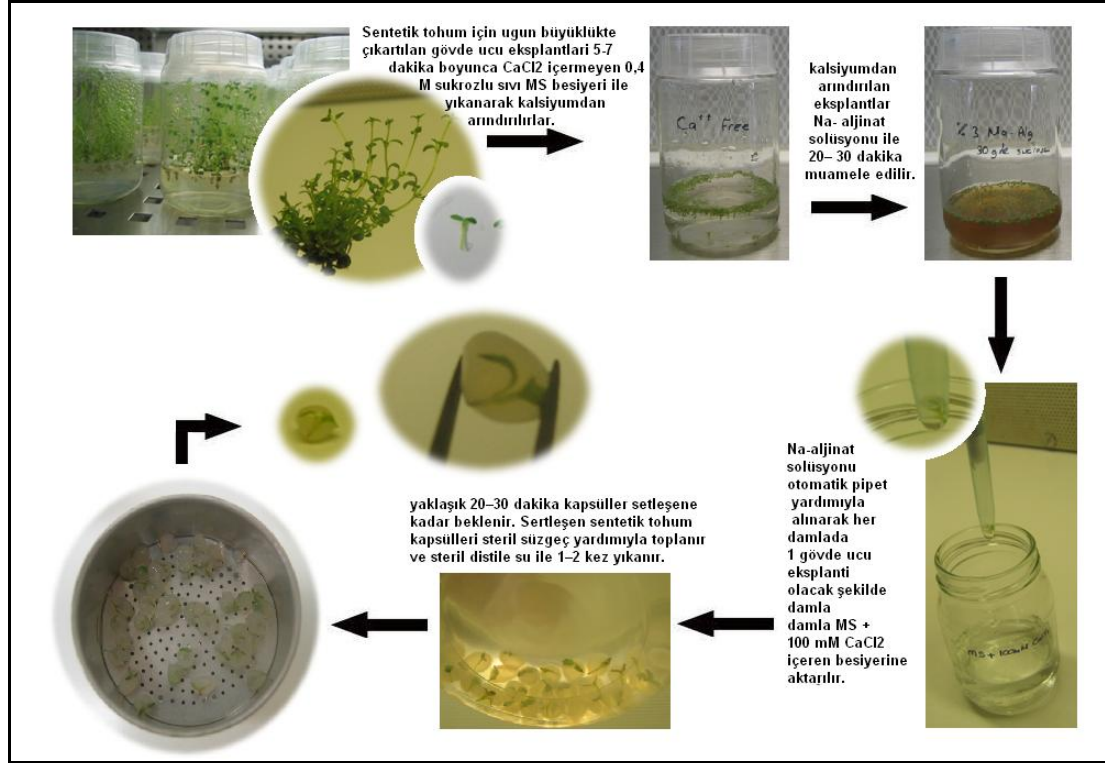
Şekil 2.3. PVS-2 vitrifikasyon tekniğiyle kriyoprezervasyon yönteminin aşamaları.

2.2.4.4. Enkapsülasyon-Vitrifikasyon Tekniği İle Kriyoprezervasyon

2.2.4.4.1. Sentetik Tohum Eldesi

Sentetik tohumlar hazırlanırken 1987 yılında Redenbaugh ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. Öncelikle CaCl_2 içeren yarı-katı MS besiyerinde kültürlenmiş gövde ucu eksplantları, kalsiyumdan arındırılmak için 5-7 dakika boyunca CaCl_2 içermeyen 0,4 M sukrozlu sıvı MS besiyeri ile yıkandı. Ardından, gövde uçları 0,4 M sukroz içeren sıvı MS besiyeri ile hazırlanan Na-aljinat solüsyonu ile 20–30 dakika muamele edildi. Bu sürenin sonunda Na-aljinat solüsyonu otomatik pipet yardımıyla alınarak her damlada 1 gövde ucu eksplanti olacak şekilde damla damla 100 mM CaCl_2 içeren sıvı MS besiyerine aktarıldı (damlatma esnasından CaCl_2 içeren beher dairesel hareketlerle karıştırıldı) ve 20–30 dakika süreyle kapsüllerin polimerleşmesi için bekletildi. Sentetik tohum kapsülleri

daha sonra steril süzgeç yardımıyla toplandı ve steril distile su ile 1–2 kez yıkandı. Elde edilen sentetik tohum kapsülleri enkapsülasyon-vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyon yönteminde kullanıldı (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarını içeren sentetik tohumların eldesi.

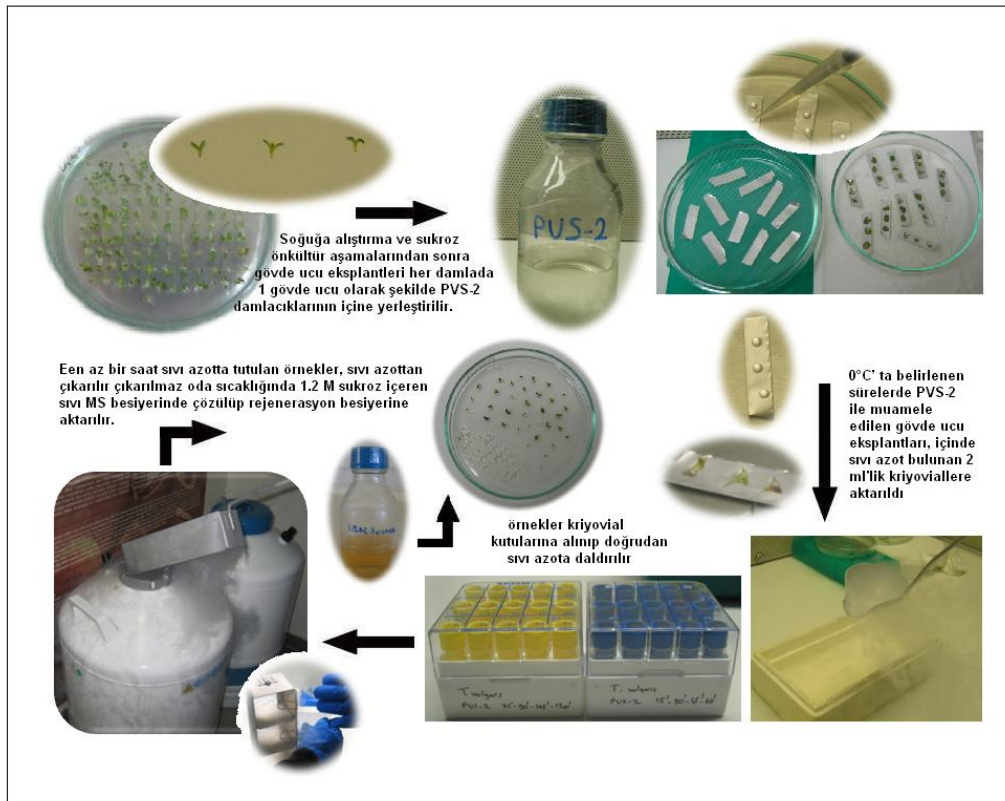
2.2.4.5. Enkapsülasyon-Vitrifikasyon Tekniğinin Uygulanması

Tekniğin temel prensibi PVS2 ile vitrifikasyon öncesi bitkiden alınan gövde ucu eksplantlarının sodyum aljinat kapsülleri içerisinde tutulması esasına dayanır. Buna göre soğuğa alıştıırılma ve sukroz ön kültür aşamalarının ardından, yukarıda anlatıldığı şekilde sodyum aljinat ile enkapsüle edilen eksplantlar kriyoviallere aktarılarak önce 30 dakika LS solüsyonu, daha sonra 0-15-30-45-60-75-90-105 ve 120 dakikalık periyotlarda PVS2 çözeltisi ile muamele edildi. Kontrol grubu PVS2 uygulaması sonrasında 1.2 M sukroz içeren sıvı MS besiyeri ile yıkayıp rejenerasyon besiyerine aktarıldı ve 4 hafta süreyle canlılık ve rejenerasyonları gözlemlendi. Sıvı azot grubu için ayrılmış gövde ucu eksplantı içeren sentetik tohum örnekleri 0-15-30-45-60-75-90-105 ve 120 dakikalık periyotlardaki PVS2 uygulamasının ardından sıvı azota daldırıldı. Tüm denemeler gövde ucu eksplantı içeren 30 sentetik tohumla 2 set

halinde denendi. Sıvı azot sonrası (en az 1 saat sıvı azotta bekletilen) örnekler 40°C sıcak su banyosunda 1-2 dakika hızla çözülüp 1.2 M sukroz içeren sıvı MS besiyeri ile yıkandıktan sonra uygun rejenerasyon besiyerine aktarılıp, 4 hafta süreyle canlılık ve rejenerasyonları gözlemlendi.

2.2.4.6. Damlacık Dondurma Tekniği ile Kriyoprezervasyon

Önceden hazırlanmış steril alüminyum folyolar (yaklaşık 4-5x12-15 mm boyutlarında) Petri kaplarına alındı ve sıcaklıklarının ~0°C olması için, buz akülerinin üzerine yerleştirildi. Her bir folyo üzerinde yaklaşık 4 – 5 µl miktarında 3 damla PVS-2 damlatıldı. Soğuğa alıştırmaya ve sukroz önkültür süreçlerinden geçen gövde ucu eksplantları her damlada 1 gövde ucu eksplantı olacak şekilde PVS-2 damlacıklarının içine yerleştirildi ve 0°C’ ta 15; 30; 45; 60; 75; 90; 105 ve 120 dakika boyunca muamele edildi. Daha sonra sıvı azota aktarılacak olan örnekler, her bir kriyovialde 1 alüminyum folyo olacak şekilde, sıvı azotla önceden soğutulmuş 2 ml’lik kriyoviallere alındı ve doğrudan sıvı azota daldırıldı (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Damlacık Dondurma tekniği ile kriyoprezervasyon tekniğinin aşamaları.

En az 1 saat süreyle sıvı azotta bekletilen örnekler, saklama süresi sonunda sıvı azottan alınarak oda sıcaklığında 1,2 M sukroz içeren sıvı MS besiyerinde 30 dakika yıkanıp, uygun rejenerasyon besiyerine alınarak standart büyüme koşullarında gelişmeleri değerlendirildi. Kontrol grubu ise, 0°C' de 15; 30; 45; 60 ; 75; 90; 125 ve 180 dakika PVS ile inkübasyon sonrasında 1,2 M sukroz içeren sıvı MS besiyerinde yıkanarak rejenerasyon besiyerine aktarıldı. Her bir denemede her set için 30 gövde ucu eksplanti kullanıldı ve her bir deneme en az iki kez tekrarlandı (Şekil 2.5).

3. BULGULAR

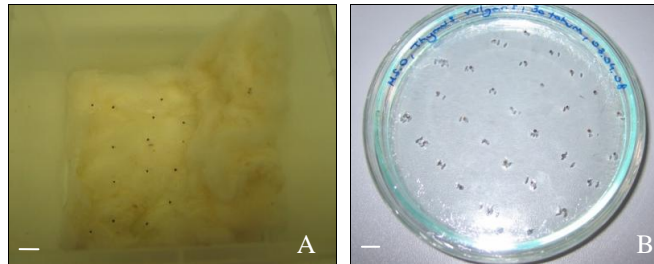
3.1. KEKİK (*Thymus vulgaris* L.) BİTKİSİNİN MİKROÇOĞALTIMI

3.1.1. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) Bitkisinin Dekontaminasyonu

3.1.1.1. *Thymus vulgaris* L. Tohumlarının Dekontaminasyonu ve Çimlendirilmesi

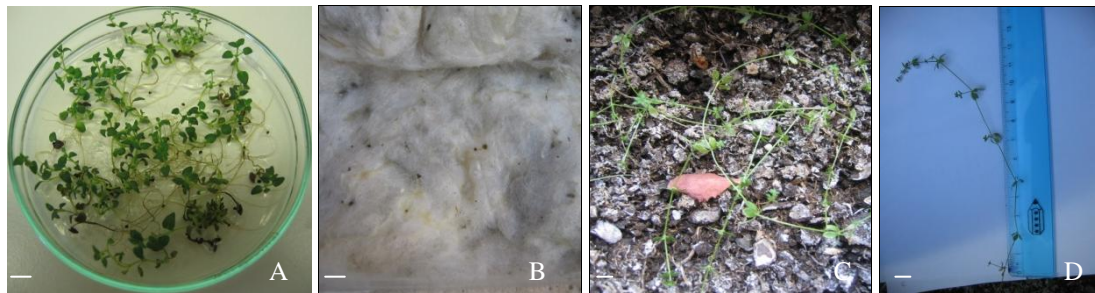
Kekik bitkisinin mikroçoğaltımında kullanılan bitki parçaları (gövde ucu ve nod eksplantları) Florsilva (Bologna, İtalya)'dan temin edilen kekik tohumlarının çimlendirilmesi sonucunda elde edilen fidelerden sağlandı. Bunun için öncelikle tohumların dekontamine edilmesi gerekmektedir. Tohum dekontaminasyonu için Ozudogru ve ark. (2005) tarafından yerfıstığı tohumlarının dekontamine edilmesi için geliştirilmiş olan yöntem kullanıldı ve %100 oranında başarı elde edildi.

Dekontamine edilen kekik tohumlarının çimlendirilmesi için, üçü *in vivo* olmak üzere, dört farklı yöntem denendi. *In vivo* çimlenme, tohumların (i) dekontamine dH₂O ile ıslatılmış çift kat pamuk arasında çimlendirilmesi (Şekil 3.1A), (ii) bitki büyüme düzenleyicilerini içermeyen sıvı MS besiyeri (MS.0) ile ıslatılmış olan çift kat pamuk arasında çimlendirilmesi, (iii) dekontamine edilmiş toprak içeren saksılarda, kontrollü iklim şartlarında çimlendirilmesi yoluyla sağlanmıştır. *In vitro* yöntemde ise bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen yarı-katı MS besiyerinde 30-45 gün boyunca çimlenme izlendi (Şekil 3.1B). Topraktaki çimlenmenin gözlenmesi ise 100 gün boyunca sürdürülmüştür. Tohumların çimlenme oranları, her bir tohumda elde edilen ortalama gövde sayısı ve gövde boyu *in vitro* koşullar için 30. ve 45. kültür gününde, topraktaki çimlenme için ise ayrıca 100. günde kayıt edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.1'de verilmektedir.



Şekil 3.1. *In vivo* ve *in vitro* yöntemlerle çimlendirilen kekik (*Thymus vulgaris* L.) tohumları. (A) Tohumların dekontamine su veya sıvı MS.0 besiyeri ile ıslatılmış iki kat pamuk arasında çimlendirilmesi. (B) Tohumların yarı-katı MS.0 besiyerine aktarılarak *in vitro* olarak çimlendirilmesi (Barlar 1cm).

Elde edilen sonuçlara göre, kekik tohumlarının çimlendirilmesinde en uygun yöntem yarı-katı MS.0 besiyerinin kullanıldığı *in vitro* çimlenme yöntemidir. Bu nedenle, daha sonraki tüm denemelerde de, tohum çimlenmesi için bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı-katı MS besiyerinde *in vitro* çimlenme yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle hem 30 hem de 45 günlük kültür sonucunda %80' e yakın çimlenme oranı elde edildi (Çizelge 3.1.). 30 günlük kültür süresince 1,57 olan ortalama gövde sayısı, kültür süresinin 45 güne çıkarılmasıyla 3,07' ye yükseldi. Elde edilen gövdelerin boyları da 2 cm'e yakındır (Şekil 3.2A). Dekontamine su ile ıslatılmış iki kat pamuk arasında çimlendirilen tohumlarda da %70 oranında çimlenme sağlandı, ancak bu şekilde çimlendirilen tohumlarda hiçbir zaman çoklu gövde elde edilmemiş, kültür süresinin uzatılması da gövde sayısı ve boyunda artışa yol açmadı. (Şekil 3.2B). Sıvı MS.0 besiyeri ile ıslatılmış pamuklar arasında çimlenme oldukça elverişsizdir. 30 günlük kültür sonunda tohumların sadece %3,33' ü çimlenmiş, kültür süresinin uzatılması ise tohumların canlılığını kaybetmelerine neden olmuştur. Pamukta çimlenmenin bir diğer sınırlılığı, sonuçların kaydedilmesi, özellikle de gövde boylarının ölçülmesi sırasında, fidelerin zarar görmesidir. Toprakta çimlenme en düşük çimlenme oranları ile sonuçlanmış, 30, 45 ve 100. günlerde %1' den daha düşük çimlenme oranı elde edildi. 45 günlük kültür süresince tek bir gövdeye sahip olan fidelerde çoklu gövdelerin oluşması 50-60 günden sonra başlamış, 100 günlük kültür sonucunda ortalama 3,12 gövdeyi bulmuştur (Şekil 3.2C). Toprakta çimlenmenin tek üstünlüğü, elde edilen fidelerin gövde boylarının diğer yöntemlere göre daha yüksek olmasıdır (Şekil 3.2D).



Şekil 3.2. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) tohumlarının çimlendirilmesi sonucunda elde edilen fideler. (A) Tohumların 45 gün boyunca yarı-katı MS.0 besiyerinde, veya (B) dekontamine su ile ıslatılmış iki kat pamuk arasında çimlendirilmesi sonucunda elde edilen fideler. (C ve D) Tohumların toprağa aktarılmasından yaklaşık 100 gün sonra elde edilen fideler (Barlar 1cm).

Çizelge 3.1. *In vitro* veya *in vivo* çimlendirilen kekik (*Thymus vulgaris* L.) tohumlarında görülen fide gelişimleri.

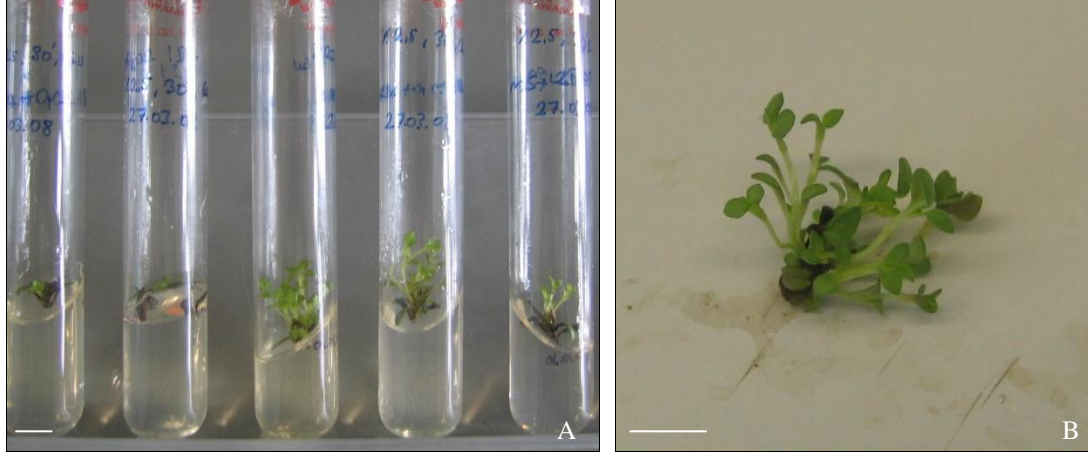
	<i>In vitro</i> çimlenme		<i>In vivo</i> çimlenme						
	Yarı-katı MS.0 besiyeri		Pamuk + dekontamine dH ₂ O		Pamuk + sıvı MS.0 besiyeri		Toprak		
	30 gün	45 g	30 g	45 g	30 g	45g	30 g	45 g	100 g
Çimlenme oranı (%)	79,75a	78,83a	70a	70a	3,33b	0b	0,50b	0,80b	0,53b
Ortalama gövde sayısı (no ± S.H) ^a	1,57 ±	3,07 ±	1,00 ±	1,00 ±	1,00 ±	-	1,00 ±	1,00 ±	3,12 ±
Ortalama gövde boyu (cm ± S.H) ^a	0,007b	0,22a	0,00c	0,00c	0,00c		0,004c	0,006c	0,90a
	1,60 ±	1,73 ±	1,12 ±	1,12 ±	1,1 ±	-	0,50 ±	2,28 ±	5,61 ±
	0,005c	0,01c	0,11d	0,11d	0,00d		0,02e	0,30b	0,92a

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, P≤0,05).

3.1.1.2. *Thymus longicaulis* C. Presl bitkisinin dekontaminasyonu

T. longicaulis gövde ucu ve nod eksplantlarının dekontaminasyonunu takiben elde edilen dekontaminasyon oranları ve rejenerasyon sonuçları Çizelge 3.2 ve 3.3’de verildi. Buna göre, kullanılan dekontaminasyon yöntemi gövde ucu eksplantlarında, nodal eksplantlara görece çok daha başarılı olmuştur. Kullanılan ondört farklı yöntemden oniki tanesi ile gövde uçlarının dekontaminasyonu mümkün olmuştur (Çizelge 3.2). Gövde ucu eksplantları için en elverişli yöntem, %77,27 oranında dekontamine eksplant eldesini mümkün kılan ve bu eksplantların yaklaşık %30’ unda bitki rejenerasyonuna imkan veren, bitki parçalarının %2,5’ lik çamaşır suyu çözeltisi ile 30 dakika muamele edilmesidir. Bu yöntemle dekontaminasyonları gerçekleştirilen, rejenerasyon gövde uçlarında elde edilen ortalama gövde sayısı da oldukça yüksektir (ortalama 8,60 gövde) (Şekil 3.3). Denemelerde, en yüksek dekontaminasyon oranı (% 88,23), %2’ lik domestos çözeltisinin 60 dakika uygulanması sonucunda elde edildi. Ancak, bu yöntem eksplantların rejenerasyonuna izin vermediğinden uygun bulunmamıştır. Yapılan denemeler, gövde ucu eksplantlarında %2,5’ ten daha düşük çamaşır suyu derişimlerinin, olgun kekik bitkisine ait bitki parçalarının *in vitro* şartlara elverişli bir şekilde aktarılması için

yeterli olmadığını, %2,5' ten daha yüksek çamaşır suyu derişimlerinin ise toksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, %2,5' lik çamaşır suyu çözeltisinin uzun süreli uygulanması da toksik etki göstermektedir.



Şekil 3.3A, B. % 2,5'lik çamaşır suyu çözeltisinin 30 dakika uygulanması yoluyla dekontamine edilen *T. longicaulis* bitkisinin gövde ucu eksplantlarında, 30 günlük kültür sonucunda elde edilen gövdeler (Barlar 1cm).

Çizelge 3.2. Olgun kekik (*T. longicaulis*) bitkisinden alınan gövde ucu eksplantlarının çeşitli derişimlerde ve sürelerde çamaşır suyu (domestos) ile muamelesini takiben elde edilen dekontaminasyon ve rejenerasyon sonuçları.

Dekontaminasyon Yöntemi	Dekontaminasyon Oranı (%)	% Rejenerasyon/ Dekontamine Eksplant	% Rejenerasyon/ Toplam Eksplant	Ortalama Gövde Sayısı (no \pm S.H) ^a	Ortalama Gövde Boyu (cm) (cm \pm S.H) ^a
% 1 dom., 30 dk	20,00c	100,00a	20,00a	1,50 \pm 0,50b	0,60 \pm 0,21b
% 1 dom., 60 dk	20,00c	50,00b	10,00b	7,00 \pm 0,00a	0,96 \pm 0,13a
% 1.5 dom, 30dk	36,84b	0	0	0	0
% 1.5 dom, 60dk	40,90b	55,55b	22,72a	7,20 \pm 2,57a	0,75 \pm 0,001ab
% 2 dom., 30 dk	39,13b	0	0	0	0
% 2 dom., 60 dk	88,23a	0	0	0	0
% 2.5 dom, 30dk	77,27a	29,41c	22,72a	8,60 \pm 2,31a	0,78 \pm 0,001ab
% 2.5 dom, 60dk	0	0	0	0	0

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi.

Kekik bitkisine ait nodal eksplantlarda elde edilen en yüksek dekontaminasyon oranı %30,76' dır (Çizelge 3.3). Bu oran, gövde ucu eksplantlarına benzer şekilde, %2,5' lik çamaşır suyu çözeltisinin 30 dakikalık kullanımı sonucunda elde edildi. Ancak, bu yöntemle dekontamine edilen eksplantlarda elde edilen bitki rejenerasyon oranı oldukça düşüktür (%8,33). En yüksek bitki rejenerasyonunun (%50) elde edildiği %2' lik çamaşır suyu çözeltisinin 60 dakika uygulandığı yöntemde ise dekontaminasyon oranı çok düşüktür (%2,56). Nod eksplantları için en elverişli yöntem yaklaşık %22 oranında dekontaminasyon ve %23,52 oranında bitki rejenerasyonunun gözlendiği, %2' lik çamaşır suyu çözeltisinin 30 dakikalık kullanımınıdır. Gövde uçlarının tersine, nod eksplantlarında, denenen ondört farklı yöntemden altı tanesinde dekontaminasyon sağlanamamış, dördünde ise başarı oranı %10' un altında kalmıştır.

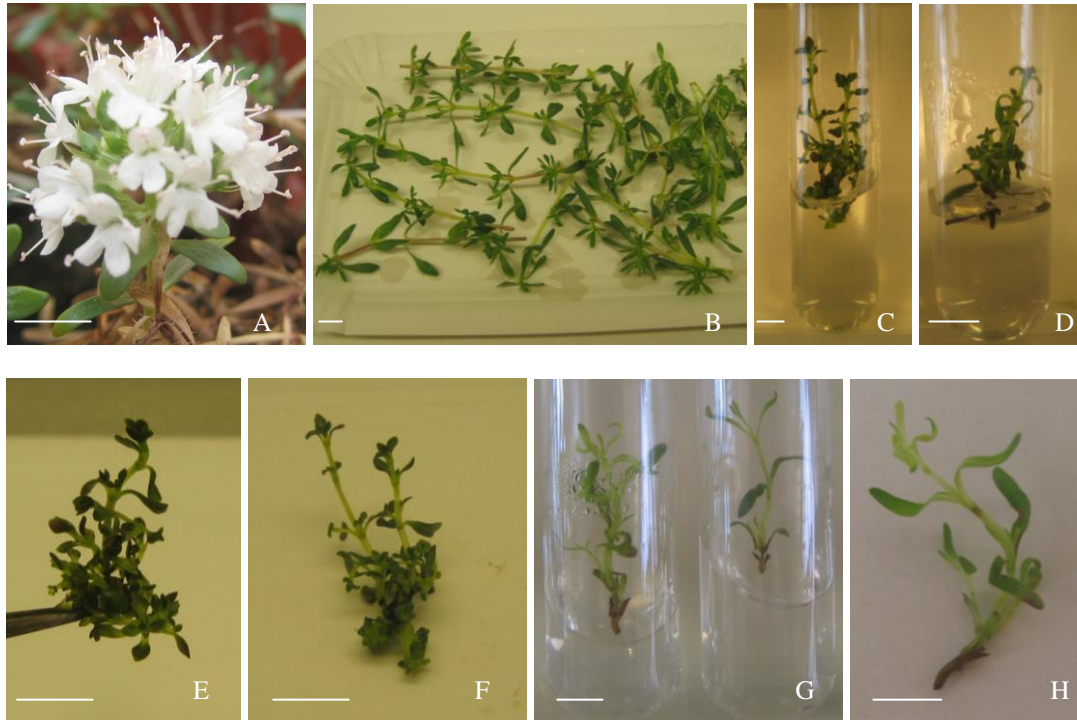
Çizelge 3.3. Olgun kekik (*T. longicaulis*) bitkisinden alınan nod eksplantlarının çeşitli derişimlerde ve sürelerde çamaşır suyu (domestos) ile muamelesini takiben elde edilen dekontaminasyon ve rejenerasyon sonuçları.

Dekontaminasyon Yöntemi	Dekontaminasyon Oranı (%)	% Rejenerasyon/ Dekontamine Eksplant	% Rejenerasyon/ Toplam Eksplant	Ortalama Gövde Sayısı (no ± S.H) ^a	Ortalama Gövde Boyu (cm) (cm ± S.H) ^a
%1 dom., 30 dk	0	0	0	0	0
%1 dom., 60 dk	0	0	0	0	0
%1,5 dom, 30 dk	15,38c	0	0	0	0
%1,5 dom., 60dk	9,30cd	0	0	0	0
%2 dom., 30 dk	21,79b	23,52b	5,12a	3,5 ± 0,957a	0,25 ± 0,042b
%2 dom., 60 dk	2,56e	50a	1,28b	2,0 ± 0,001b	0,5 ± 0,4a
%2,5 dom, 30 dk	30,76a	8,33c	2,56b	1 ± 0,001c	0,1 ± 0,001c
%2,5 dom, 60 dk	14,28c	20b	4,76a	3,0 ± 2,00a	0,583 ± 0,22a
%3 dom., 30 dk	0	0	0	0	0
%3 dom., 60 dk	8	0	0	0	0
%3,5 dom, 30 dk	0	0	0	0	0
%3,5 dom, 60 dk	6,97d	0	0	0	0
%4 dom., 30 dk	0	0	0	0	0
%4 dom., 60 dk	0	0	0	0	0

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi.

3.1.1.3. *Thymus cariensis* Hub.-Mor. & Jalas bitkisinin dekontaminasyonu

T. longicaulis bitkisinde gövde ucu ve nod eksplantlarının dekontaminasyonunu takiben elde edilen sonuçlar değerlendirilen elverişli olduğu belirlenen uygulamalar *T. cariensis* bitkisinde (Şekil 3.4A, B) denendi ve dekontamine edilen gövdelerden alınan gövde ucu eksplantları 1 mg/l KIN ve 0.3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerine aktarıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.4'te verildi. Çizelgeye göre %1,5' lik çamaşır suyu kullanılarak 60 dakika muamele edilen örneklerden %67 oranında dekontamine eksplant elde edildi. Bu eksplantlarda rejenerasyon oranı %51,02' dir (Şekil 3.4 C-F). %2,5' lik çamaşır suyu ile 30 dakika muamele edilen örneklerden ise %84 oranında dekontamine eksplant ve %66 rejenerasyon oranı elde edildi (Şekil 3.4G, H).



Şekil 3.4 (A) *Thymus cariensis* bitkisi ana materyalin genel görünüşü; (B) Dekontaminasyon için bitkiden alınan gövde parçaları; (C-F). %2,5' lik çamaşır suyu çözeltisinin 30 dakika uygulanması ve (G-H) %1,5' lik çamaşır suyu çözeltisinin 60 dakika uygulanması yoluyla dekontamine edilen gövde ucu eksplantlarında 30 günlük kültür sonucunda 1 mg/l KIN ve 0.3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen gövde gelişimleri (Barlar 1cm).

Çizelge 3.4. *T. cariensis* bitkisine ait dekontaminasyon sonuçları

Dekontaminasyon Yöntemi	Dekontamine Eksplant Oranı (%)	Canlılık Oranı (%)	Rejenerasyon Oranı (%)
% 1,5 Domestos ticari çamaşır suyu, 60 dakika	67,35b	55,10b	51,02b
% 2,5 Domestos ticari çamaşır suyu, 30 dakika	84,00a	72,3a	66,0a

3.1.2. KEKİK (*Thymus vulgaris* L.) BİTKİSİ İÇİN EN UYGUN REJENERASYON BESİYERİNİN BELİRLENMESİ

3.1.2.1. Sitokin Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Kekik (*Thymus vulgaris* L.) Bitkisinin *In vitro* Gelişimi Üzerindeki Etkileri

Kekik bitkisinin *in vitro* olarak klonal çoğaltılmasında en elverişli mikroçoğaltım yönteminin geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmada, Benzil adenin (BA), kinetin (KIN) ve thidiazuron (TDZ) bitki büyüme düzenleyicileri, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 ve 3 mg/l derişimlerde yarı-katı MS besiyerine eklendi ve her bir besiyeri kompozisyonuna en az 60 adet gövde ucu ve nodal eksplant aktarılarak 4 haftalık alt kültür süresince bitki gelişimleri gözlemlendi. Tüm denemeler en az iki kez tekrarlandı. Çeşitli derişimlerde BA bitki düzenleyicisi içeren yarı-katı MS besiyerinin gövde ucu eksplantları üzerinde etkilerine yönelik veriler Çizelge 3,5' te verildi.

Çizelge 3.5. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, çeşitli derişimlerde BA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen bitki rejenerasyonları.

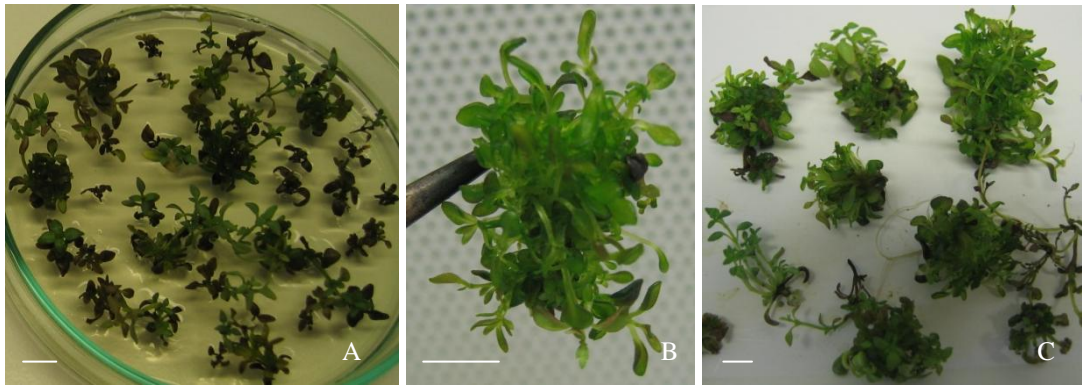
	BA Derişimleri					
	0,5 mg/l	1,0 mg/l	1,5 mg/l	2,0 mg/l	2,5 mg/l	3,0 mg/l
Rejenerasyon oranı (%)	41,6b	53,3ab	51,7ab	65,0a	56,7a	50,0ab
Ortalama gövde sayısı (no ± S.H ^a)	4,00 ± 0,79a	5,09 ± 1,61a	2,87 ± 0,39a	4,42 ± 1,35a	6,03 ± 1,23a	3,90 ± 0,68a
Ortalama gövde boyu (cm ± S.H ^a)	0,64 ± 0,081a	0,67 ± 0,073a	0,62 ± 0,073a	0,77 ± 0,064a	0,76 ± 0,130a	0,64 ± 0,088a
G.O.K. ^b	1,66	2,71	1,48	2,87	3,41	1,95

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, P≤0,05).

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

En yüksek bitki rejenerasyonu %65' lik oranla 2 mg/l BA içeren MS besiyerinde kaydedildi (Şekil 3.5A). Bu besiyerinde elde edilen çoklu gövde sayısı 4,42 idi. BA derişiminin 2 mg/l' den 2,5 mg/l' ye yükseltilmesiyle çoklu gövde sayısında ve eksplant başına elde edilen ortalama gövde sayısında artış kaydedildi (6.03). 2,5 mg/l BA derişimi 3,41'lik Gövde Oluşturma Kapasitesi (G.O.K.) indeksi ile en uygun BA derişimi olarak belirlendi (Şekil 3.5B,C).

Nodal eksplantların farklı derişimlerde BA içeren yarı-katı MS besiyerine aktarılması sonucu, 30 günlük kültür periyodu sonunda elde edilen sonuçlar Çizelge 3.6' da verildi. Nod eksplantları ile denenen tüm BA derişimlerinde % 50' den daha az bitki rejenerasyonu elde edildi. En yüksek rejenerasyon oranı (%45) en düşük BA derişiminde (0,5 mg/l) elde edildi. Bu besiyeri ayrıca en yüksek çoklu gövde sayısı (4.22) ve G.O.K. indeksinin (1,89) de elde edildiği besiyeri kompozisyonudur. BA derişimindeki artış nod eksplantlarında gözlenen gövde rejenerasyon oranlarının düşmesine neden olmuş, en yüksek BA derişiminde (3 mg/l) ise hiçbir rejenerasyon elde edilmemistir.



Şekil 3.5. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından (A) 2 mg/l BA içeren; (B, C) 2,5 mg/l BA içeren yarı-katı MS besiyerinde 4 haftalık alt kültür periyodunda elde edilen gövdeler (Barlar 1cm).

Çizelge 3,7'de altı farklı BA derişiminde, gövde ucu ve nod eksplantlarında, 30 günlük kültür sonucunda elde edilen G.O.K. indeksi karşılaştırmalı olarak verildi. Çizelgede de görüldüğü gibi, nod eksplantları yalnızca 0,5 mg/ml BA derişiminde gövde ucu eksplantlarında elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar verdi, diğer tüm BA derişimlerinde gövde uçlarına görece oldukça düşük bitki rejenerasyonu ile

sonuçlandı. Elde edilen bu sonuçlar nod eksplantlarının kekik bitkisinin hızlı bir şekilde mikroçoğaltılmasında uygun olmadığını ortaya koymaktadır. Olgun bitki materyalinden temin edilen bitki parçalarının kullanıldığı denemelerde de nod eksplantları ile elde edilen dekontaminasyon ve bitki rejenerasyon sonuçları gövde uçlarına göre daha elverişsizdi. Tüm bu sonuçların ışığında, bundan sonraki mikroçoğaltım denemelerinde gövde ucu eksplantlarının kullanılmasına karar verildi.

Çizelge 3.6. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait nod eksplantlarından, çeşitli derişimlerde BA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen bitki rejenerasyonları.

	BA Derişimi					
	0,5 mg/l	1,0 mg/l	1,5 mg/l	2,0 mg/l	2,5 mg/l	3,0 mg/l
Rejenerasyon oranı (%)	45,0a	35,0b	15,0d	25,0c	25,0c	0
Ortalama gövde sayısı (no \pm S.H) ^a	4,22 \pm 0,84a	4,42 \pm 1,54a	2,66 \pm 0,66b	3,00 \pm 0,44b	4,00 \pm 1,14a	0
Ortalama gövde boyu (cm \pm S.H) ^a	1,02 \pm 0,13a	0,51 \pm 0,006b	0,62 \pm 0,11b	0,45 \pm 0,007b	0,70 \pm 0,12b	0
G.O.K. İndeksi ^b	1,89	1,54	0,39	0,75	1	0

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, $P \leq 0,05$).

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

Çizelge 3.7. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu ve nod eksplantlarından, çeşitli derişimlerde BA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen gövde oluşturma kapasite indeksi.

BA Derişimi	Gövde Oluşturma Kapasite İndeksi	
	Gövde Ucu	Nod
0,5 mg/l	1,66	1,89
1,0 mg/l	2,71	1,54
1,5 mg/l	1,48	0,39
2,0 mg/l	2,87	0,75
2,5 mg/l	3,41	1,00
3,0 mg/l	1,95	0

Çeşitli derişimlerde BA bitki büyüme düzenleyicisi ile yapılan çalışmanın ardından, thidiazuron (TDZ) ve kinetin (KIN) bitki büyüme düzenleyicileri 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 ve 3 mg/l derişimlerde yarı-katı MS besiyerinde ve her bir besiyeri kompozisyonuna en az 60 adet gövde ucu eksplanti aktarılıp 30 günlük alt kültür süresince bitki gelişmeleri gözlemlendi. Tüm denemeler en az iki kez tekrarlandı. Bu denemelerin sonuçları Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9’da verildi.

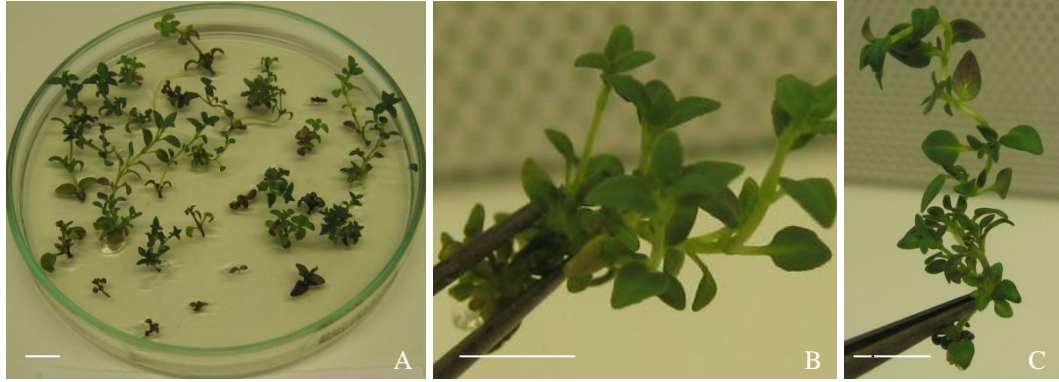
En yüksek bitki rejenerasyon oranı 2 mg/l TDZ içeren yarı-katı MS besiyerinde kaydedildi (%61.66). Bu besiyerinde elde edilen çoklu gövde sayısı 3,37’ dir. 2,07’ lik G.O.K. indeksi ile en uygun TDZ derişimi 2 mg/l olarak belirlendi (Şekil 3.6).

Çizelge 3.8. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, çeşitli derişimlerde TDZ içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen bitki rejenerasyonları.

	TDZ Derişimi					
	0,5 mg/l	1,0 mg/l	1,5 mg/l	2,0 mg/l	2,5 mg/l	3,0 mg/l
Rejenerasyon oranı (%)	55,0ab	55,0ab	51,7ab	61,7a	45,0b	35,0b
Ortalama gövde sayısı (no ± S.H) ^a	3,6 ± 0,80a	2,84 ± 0,40ab	3,42 ± 0,61a	3,37 ± 0,51a	1,59 ± 0,22b	3,33 ± 0,84ab
Ortalama gövde boyu (cm ± S.H) ^a	0,59 ± 0,044ab	0,42 ± 0,033b	0,92 ± 0,116a	0,98 ± 0,097a	0,48 ± 0,049ab	0,58 ± 0,049ab
G.O.K. ^b	1,98	1,56	1,76	2,07	0,71	1,16

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, $P \leq 0,05$).

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).



Şekil 3.6. (A) Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının 2 mg/l TDZ içeren yarı-katı MS besiyerinde rejenerasyonun genel görünümü; (B, C) elde edilen gövdeler (Barlar 1 cm).

Çeşitli kinetin derişimlerinin kullanıldığı denemelerde rejenerasyon oranının %20 ve üzeri olduğu görüldü. Ayrıca 0,5 mg/l KIN derişimi %73,33 (Şekil 3.7A) ve 1 mg/l KIN derişimi %85 (Şekil 3.7B) oranında yüksek rejenerasyon verdi. Ayrıca 1 mg/l KIN derişiminde elde edilen gövde oluşturma kapasitesi indeksi 4,26'dır (Şekil 3.7.C, D).

Çizelge 3.9. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, çeşitli derişimlerde KIN içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen bitki rejenerasyonları.

	KIN Derişimi					
	0,5 mg/l	1,0 mg/l	1,5 mg/l	2,0 mg/l	2,5 mg/l	3,0 mg/l
Rejenerasyon oranı (%)	73,3a	85,0a	53,3b	45,0b	46,7b	20,0c
Ortalama gövde sayısı (no ± S.H)	3,06 ± 0,46b	5,02 ± 0,64a	4,53 ± 0,89ab	2,86 ± 0,27b	5,40 ± 0,81a	4,50 ± 1,41ab
Ortalama gövde boyu (cm ± S.H)	1,41 ± 0,115a	1,09 ± 0,122ab	0,94 ± 0,104b	1,06 ± 0,126ab	0,86 ± 0,126b	0,87 ± 0,165b
G.O.K. ^b	2,24	4,26	2,41	1,28	2,52	0,90

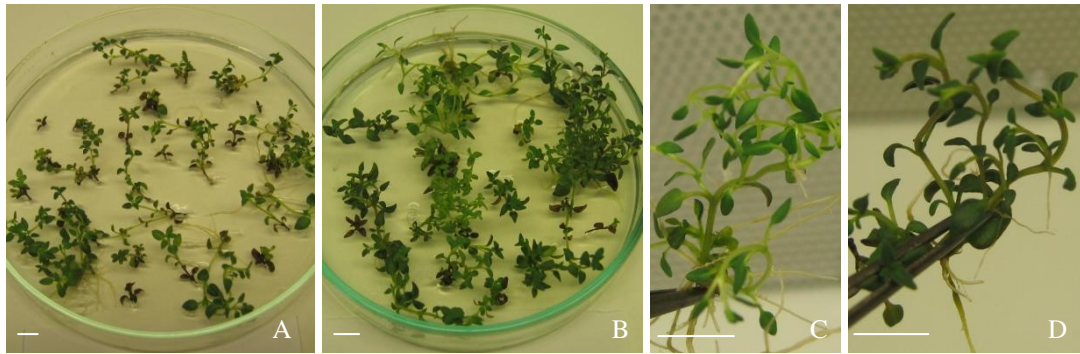
^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, $P \leq 0,05$).

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

Çalışmada kullanılan sitokinin bitki büyüme düzenleyicileri Çizelge 3.10' da karşılaştırıldı. Çizelgeye göre 1 mg/l KIN içeren yarı-katı MS besiyeri ile en yüksek G. O. K. indeksi elde edildi (4.26).

Çizelge 3.10. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının, çeşitli derişimlerde sitokinin içeren yarı-katı MS besiyerinde gövde oluşturma kapasiteleri.

	Sitokinin Derişimleri					
	0,5 mg/l	1,0 mg/l	1,5 mg/l	2,0 mg/l	2,5 mg/l	3,0 mg/l
BA	1,66	2,71	1,48	2,87	3,41	1,95
TDZ	1,98	1,56	1,76	2,07	0,71	1,16
KIN	2,24	4,26	2,41	1,28	2,52	0,90



Şekil 3.7. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının (A) 0,5 mg/l KIN; (B) 1 mg/l KIN içeren yarı-katı MS besiyerinde rejenerasyonlarının genel görünümü; (C, D) 1 mg/l KIN içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen gövdeler (Barlar 1cm).

Çalışmada kullanılan, farklı derişimlerde üç sitokinin çeşidi içinde en yüksek bitki rejenerasyon ve gövde oluşturma kapasitesi, 1 mg/l KIN içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edildi. Bu sonuçlara dayanarak, çalışmanın ilerleyen bölümlerinde, 1 mg/l KIN içeren yarı-katı MS besiyerine farklı derişimlerde (0,01, 0,05, 0,1, ve 1 mg/l) ve kombinasyonlarda oksin (IBA, IAA, NAA ve 2,4-D) bitki büyüme düzenleyicileri eklenerek, bitki gelişimleri incelendi.

3.1.2.2. Kinetin ile Çeşitli Oksin Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Kekik (*Thymus vulgaris* L.) Bitkisinin *In vitro* Gelişimi Üzerindeki Etkileri

Thymus vulgaris L. bitkisinin *in vitro* çoğaltımında en elverişli olan 1 mg/l KIN ile birlikte, ilk olarak, çeşitli derişimlerde (0,01; 0,05; 0,1 ve 1 mg/l) IBA oksin bitki büyüme düzenleyicisi yarı-katı MS besiyerinde denendi ve her bir denemede en az 60 gövde ucu eksplantı kullanıldı. Tüm denemeler en az iki kez tekrarlandı. 4 hafta sonundaki gelişme sonuçları Çizelge 3.11' de verildi. Rejenerasyon oranı (%75), ortalama gövde sayısı (7,77) ve buna bağlı olarak hesaplanan gövde oluşturma kapasitesi indeksiyle (5,83), 1 mg /l KIN ve 0,05 mg /l IBA içeren yarı-katı MS besiyeri en iyi sonucu verdi.

1 mg/l kinetin bitki büyüme düzenleyicisi ile farklı derişimlerde IAA bitki büyüme düzenleyicisi içeren yarı-katı MS besiyerinde, *Thymus vulgaris* L. bitkisinin *in vitro* gelişimine ait veriler Çizelge 3.12' de verildi. Çizelge incelendiğinde denenen tüm IAA derişimlerinde rejenerasyon oranlarının birbirine yakın olduğu görülmektedir (%56,7- 65). Bununla beraber, 4,55' lik ortalama gövde sayısı ve buna bağlı olarak hesaplanan 2,89' luk gövde oluşturma kapasitesi indeksiyle en iyi sonucu veren 1 mg /l KIN ve 0,1 mg /l IAA içeren yarı-katı MS besiyeridir (Şekil 3.8).

Çizelge 3.11. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, 1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde IBA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen bitki rejenerasyonları.

	1 mg/l KIN + IBA Derişimleri			
	0,01 mg/l	0,05 mg/l	0,1 mg/l	1 mg/l
Rejenerasyon oranı (%)	61,7ab	75,00a	63,3ab	58,3b
Ortalama gövde sayısı (no ± S.H) ^a	3,16 ± 0,42b	7,77 ± 2.34a	4,15 ± 0.58ab	5,286 ± 1,36ab
Ortalama gövde boyu (cm ± S.H) ^a	1,17 ± 0,093a	1,197 ± 0,053a	1,18 ± 0,078a	1,21 ± 0,076a
G.O.K. ^b	1,94	5,83	2,63	3,08

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, P<0,05).

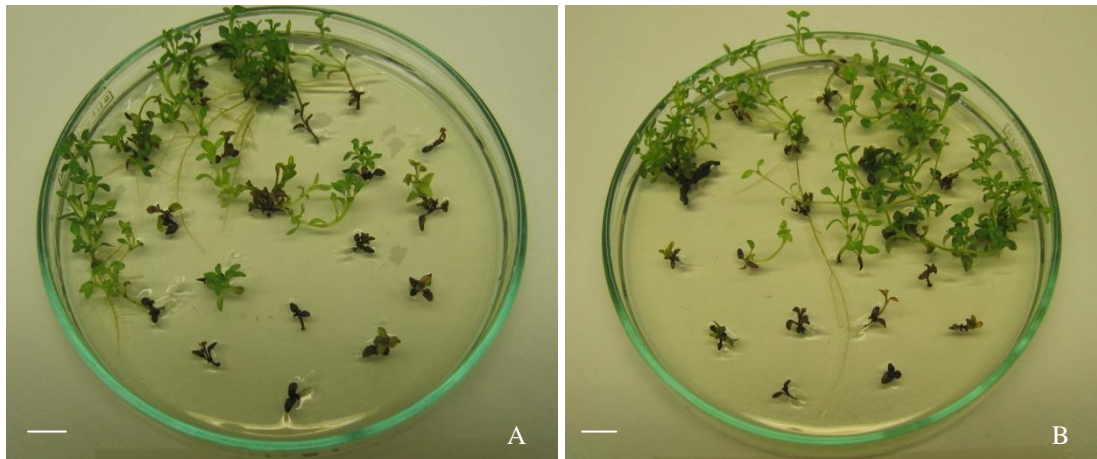
^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

Çizelge 3.12. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, 1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde IAA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen bitki rejenerasyonları.

	1 mg/l KIN + IAA Derişimleri			
	0,01 mg/l	0,05 mg/l	0,1 mg/l	1 mg/l
Rejenerasyon oranı (%)	56,7a	65,0a	63,3a	56,7a
Ortalama gövde sayısı (no ± S.H) ^a	3,76 ± 0.82ab	2,69 ± 0.52b	4,55 ± 0,82a	1,79 ± 0,27b
Ortalama gövde boyu (cm ± S.H) ^a	1,58 ± 0,123a	1,94 ± 0,190a	1,76 ± 0,173a	0,93 ± 0,094b
G.O.K. ^b	2,13	1,74	2,89	1,01

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, P≤0,05).

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).



Şekil 3.8A, B. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının 1 mg/l KIN ve 0,1 mg/l IAA içeren yarı-katı MS besiyerinde rejenerasyonları (Barlar 1cm).

1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde NAA kombinasyonlarını içeren yarı-katı MS besiyerlerinin, kekik bitkisinin rejenerasyonu üzerindeki etkileri Çizelge 3.13' te verildi. Buna göre, 1 mg/l KIN ve 0,01 mg/l NAA kombinasyonunu içeren yarı-katı MS besiyerinde %85, 1 mg/l KIN ve 1 mg/l NAA kombinasyonunu içeren yarı-katı MS besiyerinde %83.3 değerinde yüksek rejenerasyon oranları elde edilmiştir. Buna rağmen %66,7 değerinde rejenerasyon oranı veren 1 mg/l KIN ve 0,1 NAA içeren

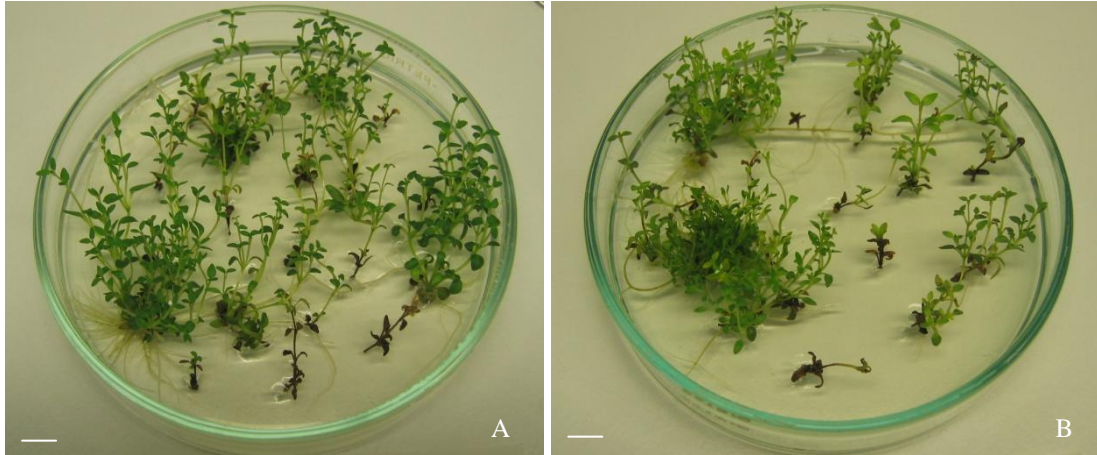
yarı-katı MS besiyerinin, 9,02' lik ortalama gövde sayısına bağlı olarak, en yüksek gövde oluşturma kapasitesine (6,01) sahip olduğu görülmektedir (Şekil 3.9).

Çizelge 3.13. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, 1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde NAA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen bitki rejenerasyonları.

	1 mg/l KIN + NAA Derişimleri			
	0,01 mg/l	0,05 mg/l	0,1 mg/l	1 mg/l
Rejenerasyon oranı (%)	85,0a	55,0b	66,7b	83,3a
Ortalama gövde sayısı (no \pm S.H) ^a	4,65 \pm 0,96a	6,94 \pm 3,32a	9,02 \pm 2,09a	4,88 \pm 1,03a
Ortalama gövde boyu (cm \pm S.H) ^a	1,23 \pm 0,070a	1,54 \pm 0,149a	1,39 \pm 0,088a	1,52 \pm 0,177a
G.O.K. ^b	3,95	3,81	6,01	4,06

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, $P \leq 0,05$).

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).



Şekil 3.9. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının (A) 1 mg/l KIN ve 1 mg/l NAA; (B) 1 mg/l KIN ve 0,1 mg/l NAA içeren yarı-katı MS besiyerlerindeki rejenerasyonları (Barlar 1cm).

1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde 2,4-D içeren yarı-katı MS besiyerinin kekik bitkisinin rejenerasyonu üzerindeki etkileri Çizelge 3.14' te verilmektedir. Çizelge incelendiğinde tüm 2,4-D derişimlerinde gövde oluşturma kapasitesinin

diğer oksin bitki büyüme düzenleyicilerine görece daha düşük olduğu görülmektedir. Özellikle 0,05, 0,1 ve 1 mg/l 2,4-D oksin derişimlerinde $1 \leq$ gövde oluşturma kapasitesi gözlemlendi.

Çizelge 3.14. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, 1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde 2,4-D içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen bitki rejenerasyonları.

	1 mg/l KIN + 2,4-D Derişimleri			
	0,01 mg/l	0,05 mg/l	0,1 mg/l	1 mg/l
Rejenerasyon oranı (%)	56,7a	58,3a	13,3b	5,0c
Ortalama gövde sayısı (no \pm S.H) ^a	4,23 \pm 1,78a	1,40 \pm 0,11a	1,25 \pm 0,25a	1,00 \pm 0,00a
Ortalama gövde boyu (cm \pm S.H) ^a	1,08 \pm 0,094a	0,79 \pm 0,086ab	1,47 \pm 0,229a	0,467 \pm 0,088b
G.O.K. ^b	2,39	0,81	0,16	0,05

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, $P \leq 0,05$).

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

1 mg/l KIN bitki büyüme düzenleyicisi ile çeşitli derişimlerde ve kombinasyonlarda dört farklı oksin bitki büyüme düzenleyicisini içeren MS besiyerlerinde elde edilen, kekik bitkisine ait gövde oluşturma kapasiteleri Çizelge 3.15' te karşılaştırılmıştır. Çizelgede en iyi sonucun 1 mg/l KIN ve 0,1 mg/l NAA içeren yarı-katı MS besiyerine aktarılan gövde ucu eksplantlarından sağlandığı görülmektedir. Bu sonuçlar göz önünde tutularak, çalışmanın sonraki aşamalarında, en uygun mikroçoğaltım besiyerinin belirlenmesine yönelik yapılan denemelerde 1 mg/l KIN ve 1mg/l KIN ile 0,1 mg/l NAA içeren yarı-katı MS besiyerleri, farklı derişimlerde AgNO₃ ve GA₃ ile ayrı ayrı denendi.

Çizelge 3.15. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, 1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde oksin içeren yarı-katı MS besiyerlerinde elde edilen gövde oluşturma kapasitelerinin (G.O.K.) karşılaştırılması.

	1 mg/l KIN + Oksin Derişimleri			
	0,01 mg/l	0,05 mg/l	0,1 mg/l	1 mg/l
IBA	1,94	5,83	2,63	3,08
NAA	3,95	3,81	6,01	4,06
IAA	2,13	1,74	2,88	1,01
2,4-D	2,39	0,81	0,16	005

3.1.2.3. Gibberelik Asit (GA₃)'in *Thymus vulgaris* L. Bitkisinin Rejenerasyonu Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

Thymus vulgaris L. bitkisi için büyüme ve gövde sayısı artışında en ideal olan besiyeri içeriğinin belirlenmesi için yapılan bir diğer çalışma, önceki denemelerde en iyi sonuçları veren 1 mg/l KIN ve 1 mg/l KIN ile 0,1 mg/l NAA bitki büyüme düzenleyicilerini içeren besiyeri kompozisyonlarının gibberelik asit ile birlikte kullanılmasıdır. Bu deneme için her iki farklı yarı-katı MS besiyeri kompozisyonu, 0,1, 0,3 ve 0,6 mg/l GA₃ derişimleri ile birlikte denendi.

1mg/l KIN ile çeşitli derişimlerde GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerinde, kekik bitkisinden alınan gövde ucu eksplantlarının gelişmelerine ait sonuçlar Çizelge 3.16' da verildi. Çizelgeye göre tüm GA₃ derişimlerinde %90' in üzerinde rejenerasyon görülmüştür. Ayrıca, gövde sayısındaki artış ve buna bağlı olarak gövde oluşturma kapasitesi indeksi tüm GA₃ derişimlerinde oldukça yüksektir (Şekil 3.10). Bu sonuçlar içinde, %96,7 rejenerasyon oranı, 8,64 ortalama gövde sayısı ve bunlara bağlı olarak hesaplanan 8,35 gövde oluşturma kapasitesi indeksi ile en yüksek değerleri 0,3 mg/l GA₃ derisimi sağladı.

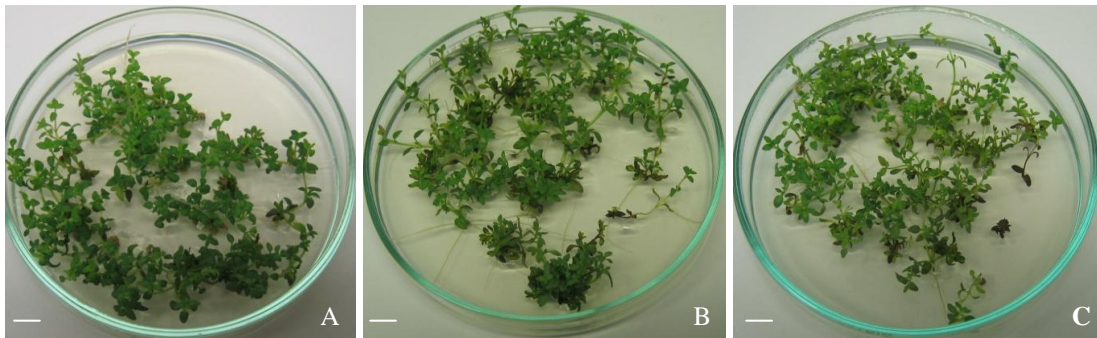
Çizelge 3.16. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının, 1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerindeki rejenerasyonları.

	1 mg/l KIN + GA ₃ Derişimleri		
	0,1 mg/l	0,3 mg/l	0,6 mg/l
Rejenerasyon oranı (%)	93,3a	96,7a	91,6a
Ortalama gövde sayısı (no ± S.H) ^a	6,35 ± 0,59a	8,64 ± 0,95a	7,56 ± 0,91a
Ortalama gövde boyu (cm ± S.H) ^a	1,09 ± 0,054a	1,02 ± 0,043a	1,13 ± 0,050a
G.O.K. ^b	5,92	8,35	6,92

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, P≤0,05).

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

1 mg/l KIN ile 0,1 mg/l NAA ve çeşitli derişimlerde GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerlerinde, *Thymus vulgaris* L. bitkisinden alınan gövde ucu eksplantlarına ait gelişme sonuçları Çizelge 3.17' de verildi. Çizelgeye göre tüm GA₃ derişimlerinde rejenerasyon oranları %70' in üzerindedir (Şekil 3.11) ve ayrıca 0,6 mg/l GA₃ içeren besiyeri kombinasyonu, eksplant başına 8,47 olan gövde sayısı ve 6,35 gövde oluşturma kapasitesi ile yüksek bir değere sahiptir.



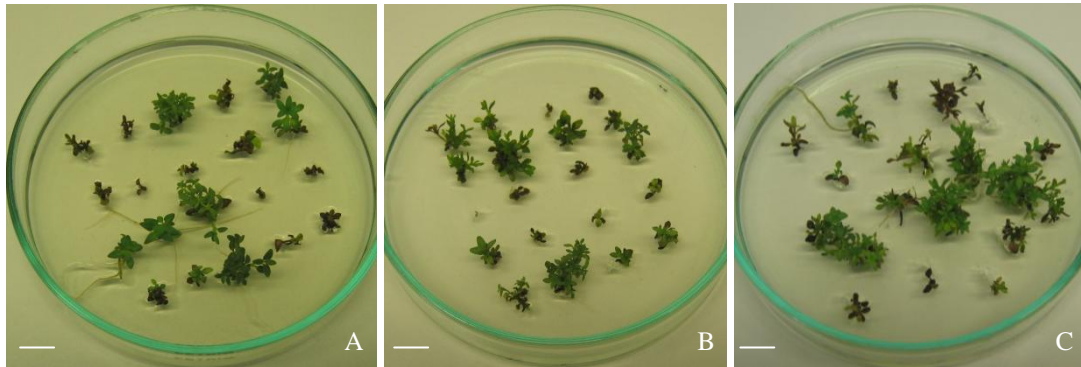
Şekil 3.10. *Thymus vulgaris* L. bitkisinin 1 mg/l KIN ile (A) 0,1 mg/l; (B) 0,3 mg/l; (C) 0,6 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerlerinde rejenerasyonu (Barlar 1cm).

Çizelge 3.17. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, 1 mg/l KIN + 0.1 mg/l NAA ve çeşitli derişimlerde GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen rejenerasyonlar.

1 mg/l KIN + 0,1 mg/l NAA + GA ₃ Derişimleri			
	0,1 mg/l	0,3 mg/l	0,6 mg/l
Rejenerasyon oranı (%)	76,7a	71,7a	75,0a
Ortalama gövde sayısı (no ± S.H) ^a	5,09 ± 0,83b	2,77 ± 0,29c	8,47 ± 1,01a
Ortalama gövde boyu (cm ± S.H) ^a	0,97 ± 0,056a	0,53 ± 0,032b	0,66 ± 0,024b
G.O.K. ^b	3,90	1,98	6,32

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, P≤0,05).

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).



Şekil 3.11. *Thymus vulgaris* L. bitkisinin 1 mg/l KIN ve 0,1 mg/l NAA ile (A) 0,1 mg/l; (B) 0,3 mg/l; (C) 0,6 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerlerinde rejenerasyonu (Barlar 1cm).

3.1.2.4. Gümüş Nitrat (AgNO₃)'ın *Thymus vulgaris* L. Bitkisinin Rejenerasyonu Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

1 mg/l KIN ve 1 mg/l KIN ile 0,1 mg/l NAA bitki büyüme düzenleyicilerini içeren besiyeri kompozisyonları, çeşitli derişimlerde (1; 2; 4; 6 ve 8 mg/l) gümüş nitrat (AgNO₃) ile birlikte denendi. Deneme için her iki farklı yarı-katı MS besiyeri kompozisyonu en az 60 gövde ucu eksplanti kullanılarak, dört hafta standart büyüme şartlarında (23°C sıcaklık, 16/8 saat fotoperiyot) inkübe edildi. Tüm denemeler en az iki kez tekrarlandı. 1 mg/l KIN ile çeşitli derişimlerde AgNO₃ içeren yarı-katı MS besiyerinde, kekik bitkisinden alınan gövde ucu eksplantlarının gelişmelerine ait sonuçlar Çizelge 3.18' de verildi. Çizelgeye göre tüm AgNO₃ derişimlerinde %80' in

üzerinde rejenerasyon görülmüştür (Şekil 3.12). 1 mg/l KIN ile 2 veya 6 mg/l AgNO₃ içeren yarı-katı MS besiyerlerinde en iyi rejenerasyon oranı (%98.3), 1 mg/l KIN ile 8 mg/l AgNO₃ içeren yarı-katı MS besiyerinde ise en yüksek ortalama gövde sayısı (5,43) ve gövde oluşturma kapasitesi indeksi (4,88) elde edildi.

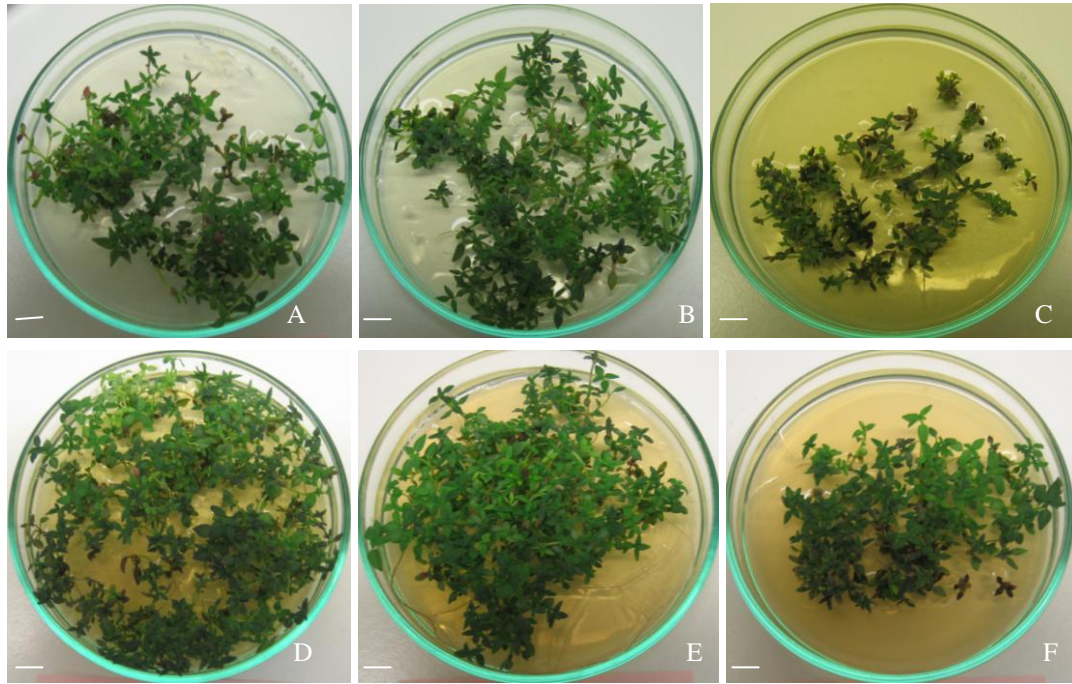
Çizelge 3.18. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının, 1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde AgNO₃ içeren yarı-katı MS besiyerindeki rejenerasyonları.

	MS + 1 mg/l KIN + AgNO ₃ Derişimleri				
	1 mg/l	2 mg/l	4 mg/l	6 mg/l	8 mg/l
Rejenerasyon oranı (%)	90,00a	98,3a	83,3b	98,3a	90,0a
Ortalama gövde sayısı (no ± S.H) ^a	3,94 ± 0,41b	4,81± 0,36ab	2,78 ± 0,32c	4,59 ± 0,38ab	5,43 ± 0,35a
Ortalama gövde boyu (cm ± S.H) ^a	1,05± 0,057b	1,01± 0,039b	0,98± 0,049b	1,40± 0,081a	1,32± 0,051a
G.O.K. ^b	3,54	4,72	2,31	4,51	4,88

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, P≤0,05).

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

1 mg/l KIN ve 0,1 mg/l NAA ile çeşitli derişimlerde (1; 2; 4; 6 ve 8 mg/l) AgNO₃ içeren yarı-katı besiyerlerinde elde edilen, dört haftalık gelişme sonuçları Çizelge 3.19'da verildi. Çizelgeye göre rejenerasyon oranlarının %55 ve altında olduğu, ayrıca gövde oluşturma kapasitesinin de tüm AgNO₃ derişimlerinde oldukça düşük olduğu görülmektedir (Şekil 3.13).



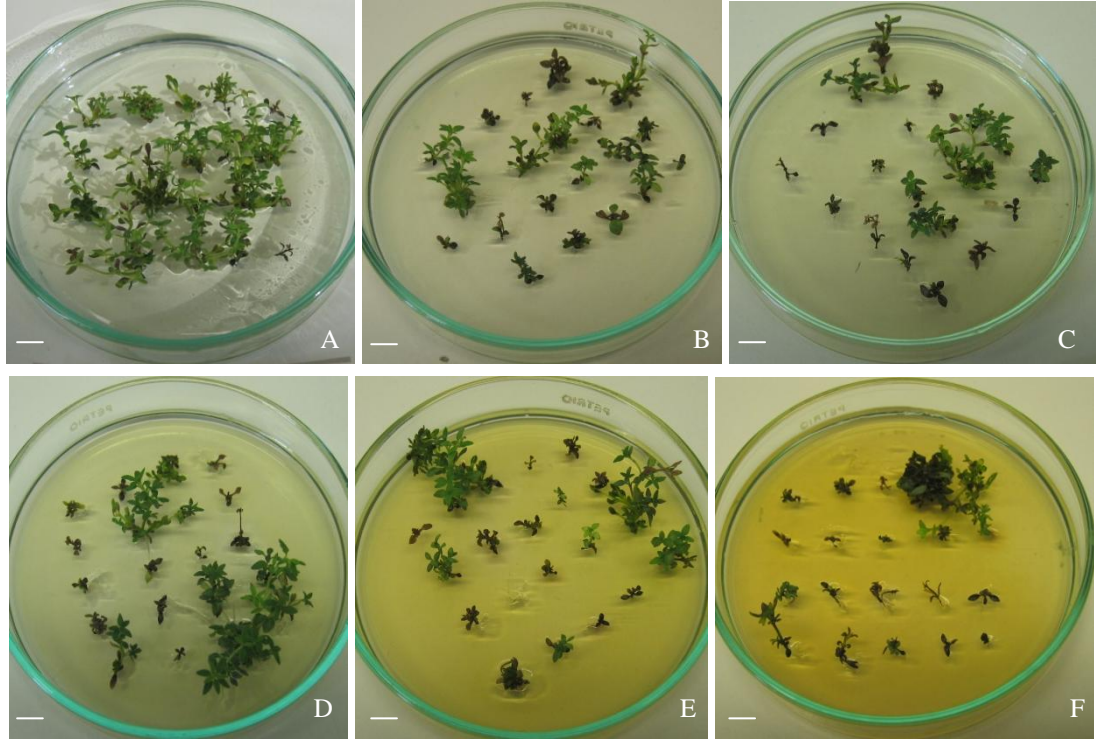
Şekil 3.12. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, 1 mg/l KIN ile (A) 1 mg/l; (B) 2 mg/l; (C) 4 mg/l; (D) 6 mg/l; (E, F) 8 mg/l $AgNO_3$ içeren yarı-katı MS besiyerlerinde elde edilen rejenerasyonlar (Barlar 1cm).

Çizelge 3.19. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının, 1 mg/l KIN, 0,1 mg/l NAA ve çeşitli derişimlerde $AgNO_3$ içeren yarı-katı MS besiyerlerindeki rejenerasyonları.

MS + 1 mg/l KIN + 0.1 mg/l NAA + $AgNO_3$ Derişimleri					
	1 mg/l	2 mg/l	4 mg/l	6 mg/l	8 mg/l
Rejenerasyon oranı (%)	48,3ab	30,0b	55,0a	53,3a	28,3b
Ortalama gövde sayısı (no \pm S.H) ^a	6,14 \pm 1,0a	3,50 \pm 0,55b	4,25 \pm 0,85ab	4,53 \pm 0,53ab	2,47 \pm 0,47b
Ortalama gövde boyu (cm \pm S.H) ^a	0,85 \pm 0,05a	0,79 \pm 0,07a	0,92 \pm 0,06a	0,84 \pm 0,05a	0,70 \pm 0,10a
G.O.K. ^b	2,96	1,05	2,33	2,41	0,69

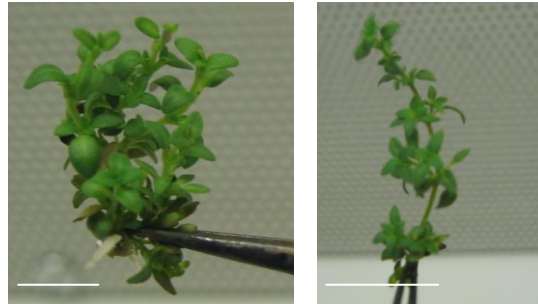
^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, $P \leq 0,05$).

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).



Şekil 3.13. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövde ucu eksplantlarından, 1 mg/l KIN ve 0,1 mg/l NAA ile (A, B) 1 mg/l; (C) 2 mg/l; (D) 4 mg/l; (E) 6 mg/l; (F) 8 mg/l $AgNO_3$ içeren yarı-katı MS besiyerlerinde elde edilen rejenerasyonlar (Barlar 1cm).

Denenen tüm besiyerlerinde rejenerasyon oranları ve ortalama gövde sayıları değerlendirilerek, gövde oluşturma kapasiteleri karşılaştırıldığında, *Thymus vulgaris* için en uygun rejenerasyon besiyerinin 1 mg/l KIN ve 0,3 mg/l GA_3 içeren yarı-katı MS besiyeri olduğuna karar verildi. Bu besiyerinde, *T. vulgaris* bitkisinden alınan gövde ucu eksplantlarından %96,7 rejenerasyon oranı elde edildi. Ortalama gövde sayısı 8,64 ve ortalama gövde boyu 1,02 cm (Şekil 3.14) olarak belirlendi ve gövde oluşturma kapasitesi indeksi 8,35 olarak hesaplandı.



Şekil 3.14. *T. vulgaris* bitkisine ait eksplantlarından 1 mg/l KIN ile 0,3 mg/l GA_3 içeren yarı-katı MS besiyerinde büyüyen gövdeler (Barlar 1cm).

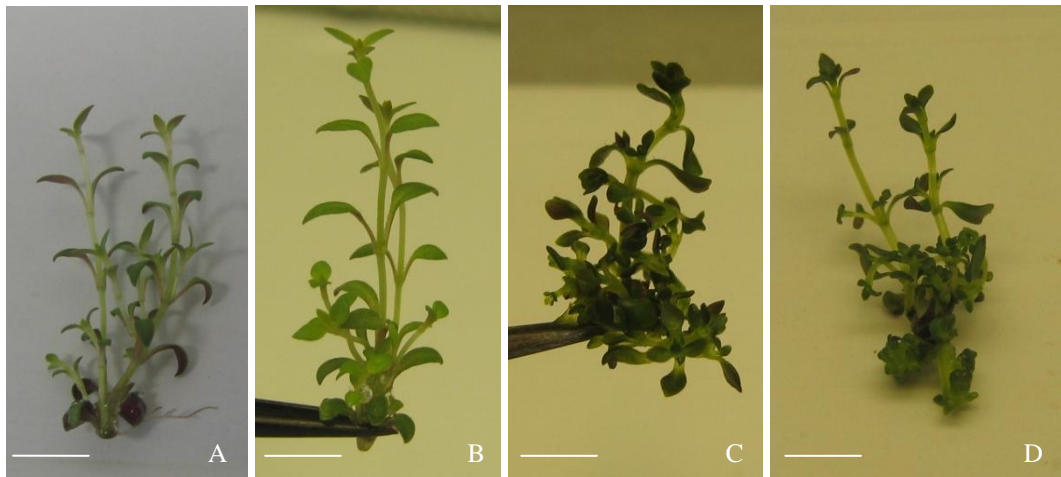
Bu bilgiler ışığında, takip eden tüm mikroçoğaltım ve kriyoprezervasyon denemelerinde 1 mg/l KIN ve 0,3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyeri kullanıldı. Ayrıca, *T. vulgaris* için optimize edilen rejenerasyon besiyeri, *T. longicaulis* ve *T. cariensis* bitkilerinden alınan gövde ucu eksplantları ile de denendi (Çizelge 3.20) ve *T. longicaulis* bitkisinde %97,5, *T. cariensis* bitkisinde ise %95,7 oranında bitki rejenerasyonu elde edildi. Ayrıca gövde oluşturma kapasitesi indeksleri sırasıyla 3,02 (Şekil 3.15A, B) ve 1,22 (Şekil 3.15C, D) olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.20. 1 mg/l KIN ve 0,3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerinin *T. longicaulis* ve *T. cariensis* bitkilerinden alınan gövde ucu eksplantlarının rejenerasyonu üzerindeki etkileri.

	Rejenerasyon oranı (%)	Ortalama gövde sayısı (no ± S.H) ^a	Ortalama gövde boyu (cm ± S.H) ^a	G.O.K. ^b
<i>T. longicaulis</i> C. Presl	97,5a	3,10 ± 0,20a	0,96 ± 0,063b	3,02
<i>T. cariensis</i> Hub.-Mor. & J alas	95,7a	1,27 ± 0,14b	1,68 ± 0,12a	1,22

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, P≤0,05).

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).



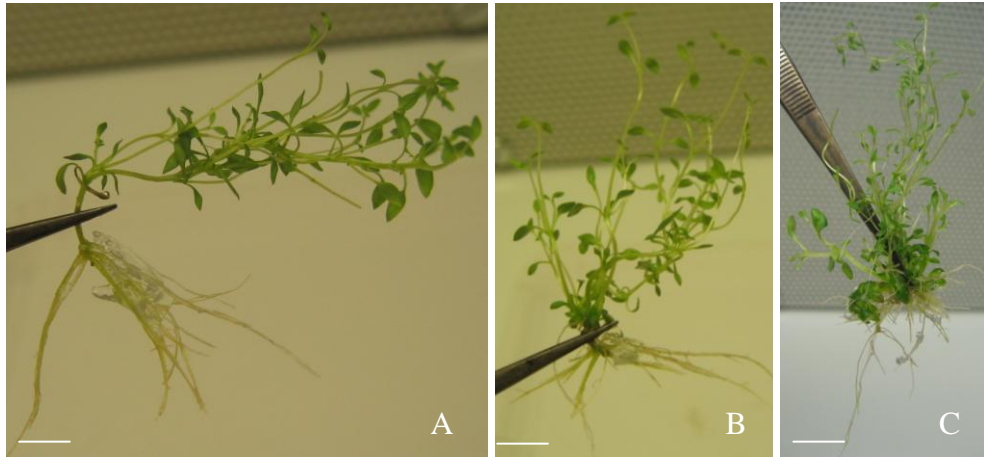
Şekil 3.15. 1 mg/l KIN ile 0,3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerinde, (A, B) *T. longicaulis* ve (C, D) *T. cariensis* bitkilerine ait gövde ucu eksplantlarından elde edilen gövdeler (Barlar 1cm).

3.1.3. KEKİK (*Thymus vulgaris* L.) BİTKİSİ İÇİN EN UYGUN KÖKLENME BESİYERİNİN BELİRLENMESİ

Mikroçoğaltım yönteminde ikinci aşama, bitkinin iklimlendirilme sırasında toprağa tutunması ve ortama adaptasyonunu kolaylaştırmak için bitkinin köklendirilmesidir. *T. vulgaris* bitkisinde köklenmenin sağlanması amacıyla bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı-katı MS besiyeri ve farklı derişimlerde (0,01; 0,05; 0,1 ve 1 mg/l) IBA, IAA, NAA ve 2,4-D oksin bitki büyüme düzenleyicilerini içeren yarı-katı MS besiyerleri kullanıldı. Buna göre, yaklaşık 4 cm uzunluğundaki gövdeler bebek maması kaplarına aktarılarak 23 °C' ta 6 hafta süreyle kültüre alındı.

3.1.3.1. *T. vulgaris* Bitkisinde Bitki Büyüme Düzenleyicisi İçermeyen Yarı-Katı MS Besiyerlerinde Elde Edilen Köklenme Oranları

Yarı-katı MS.0 besiyerinde 6 haftalık kültür sonunda, köklenme oranı %100 ve gövde başına oluşan ortalama kök sayısı $12,4 \pm 1,27$ olarak belirlendi. Bu verilere dayanılarak kök oluşturma kapasitesi indeksi 12,4 olarak hesaplandı. Elde edilen ortalama kök boyu $1,62 \pm 0,044$ olarak bulundu (Şekil 3.16).



Şekil 3.16A-C. Yarı-katı MS.0 besiyerinde *T. vulgaris* bitkisinin gövdelerinde gelişen kökler (Barlar 1cm).

3.1.3.2. Çeşitli Derişimlerde Farklı Oksin Bitki Büyüme Düzenleyicilerini İçeren Yarı-Katı Ms Besiyerlerinde Elde Edilen Köklenme Oranları

T. vulgaris bitkisine ait gövdelerin köklendirilmesi amacıyla, farklı derişimlerde oksin bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak gerçekleştirilen denemeler sonucu elde edilen köklenme oranı, gövde başına elde edilen ortalama kök sayısı, ortalama kök uzunluğu ve bu verilerden hesaplanan kök oluşturma kapasitesi belirlendi. IBA bitki büyüme düzenleyicisinin köklenme üzerine etkilerine yönelik veriler Çizelge 3.21' de verilmistir. 1 mg/l IBA içeren yarı-katı MS besiyerinde, diğer IBA derişimlerinden belirgin bir farkla, en yüksek köklenme oranı (%92,5), gövde başına düşen kök sayısı (12,35) ve bu verilere dayanılarak hesaplanan kök oluşturma kapasitesi indeksi (11,42) elde edildi.

Çizelge 3.21. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövdelerin çeşitli derişimlerde IBA içeren yarı-katı MS besiyerlerinde elde edilen köklenme oranları.

	IBA Derişimleri			
	0,01 mg/l	0,05 mg/l	0,1 mg/l	1,0 mg/l
Köklenme oranı (%)	75b	72,5b	85,7a	92,5a
Ortalama kök sayısı (no ± S.H) ^a	6,40 ± 0,89b	4,53 ± 0,47bc	4,00 ± 0,47c	12,35 ± 1,15a
Ortalama kök boyu (cm ± S.H) ^a	1,22 ± 0,078a	0,94 ± 0,070b	0,83 ± 0,052b	1,25 ± 0,058a
K.O.K. ^b	4,80	3,28	3,42	11,42

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, P≤0,05).

^bK.O.K: Kök oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

Farklı derişimlerde NAA bitki büyüme düzenleyicisi içeren yarı-katı MS besiyerinde, *T. vulgaris* bitki gövdelerine ait köklenme verileri Çizelge 3.22' de verildi. 1 mg/l NAA içeren yarı-katı MS besiyerinde en başarılı sonuçlar alınmış, bu sonuçlara göre köklenmeye alınan gövdelerde, %85 oranında köklenme oranı, 17,68 gövde başına düşen ortalama kök sayısı ve bu verilere dayanılarak hesaplanan 15,02 kök oluşturma kapasitesi indeksi elde edildi.

Çizelge 3.22. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövdelerin çeşitli derişimlerde NAA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen köklenme oranları.

	NAA Derişimleri			
	0,01 mg/l	0,05 mg/l	0,1 mg/l	1,0 mg/l
Köklenme oranı (%)	61,5b	80,0a	90,0a	85,0a
Ortalama kök sayısı (no \pm S.H) ^a	6,29 \pm 0,83c	8,39 \pm 0,87c	12,53 \pm 1,18b	17,68 \pm 2,27a
Ortalama kök boyu (cm \pm S.H) ^a	1,10 \pm 0,112a	1,22 \pm 0,066a	9,99 \pm 0,058ab	0,89 \pm 0,050b
K.O.K. ^b	3,86	6,71	11,27	15,02

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, $P \leq 0,05$).

^bK.O.K: Kök oluşturma kapasitesi indeksi. (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

Köklenme amaçlı kullanılan diğer bir oksin IAA' nın farklı derişimlerini içeren yarı-katı besiyerinde, *T. vulgaris* gövdelerine ait köklenme incelendiğinde, 1 mg/l IAA içeren besiyerinde %92,5 köklenme oranı ve gövde başına ortalama kök sayısı 10,59 olarak belirlendi. Bu veriler ışığında hesaplanan kök oluşturma kapasitesi indeksi IAA derişimleri için en yüksek 9,79 olarak bulundu (Çizelge 3.23).

Çizelge 3.23. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövdelerin çeşitli derişimlerde IAA içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen köklenme oranları.

	IAA Derişimleri			
	0,01 mg/l	0,05 mg/l	0,1 mg/l	1,0 mg/l
Köklenme oranı (%)	62,5b	75,0ab	82,5a	92,5a
Ortalama kök sayısı (no \pm S.H) ^a	6,24 \pm 1,27c	9,17 \pm 1,67abc	9,79 \pm 0,79ab	10,59 \pm 0,76a
Ortalama kök boyu (cm \pm S.H) ^a	0,94 \pm 0,081b	1,03 \pm 0,065b	0,96 \pm 0,047b	1,19 \pm 0,052a
K.O.K. ^b	3,90	6,87	8,07	9,79

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, $P \leq 0,05$).

^bK.O.K: Kök oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

T. vulgaris bitkisinin köklenmesi amacıyla son olarak 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisini içeren yarı-katı MS besiyerleri kullanıldı. Denemede en iyi sonuç 0,05 mg/l 2,4-D içeren yarı-katı MS besiyerinde köklenen gövdelerden elde edildi

(Çizelge 3.24). Bu besiyerine aktarılan gövdelerde %92,5 köklenme oranı ve gövde başına ortalama kök sayısı 17,15 olarak belirlendi. Bu sonuçlara bağlı olarak kök oluşturma kapasitesi 15,86 olarak hesaplandı.

Çizelge 3.24. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövdelerin çeşitli derişimlerde 2,4-D içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen köklenme oranları.

	2,4-D Konsantrasyonu			
	0,01 mg/l	0,05 mg/l	0,1 mg/l	1,0 mg/l
Köklenme oranı (%)	75,0b	92,5a	80,0a	0,0c
Ortalama kök sayısı (no \pm S.H) ^a	5,77 \pm 0,56c	17,15 \pm 0,96a	10,24 \pm 0,71b	-
Ortalama kök boyu (cm \pm S.H) ^a	0,95 \pm 0,044a	1,04 \pm 0,033a	0,78 \pm 0,029	-
K.O.K. ^b	4,32	15,86	8,19	-

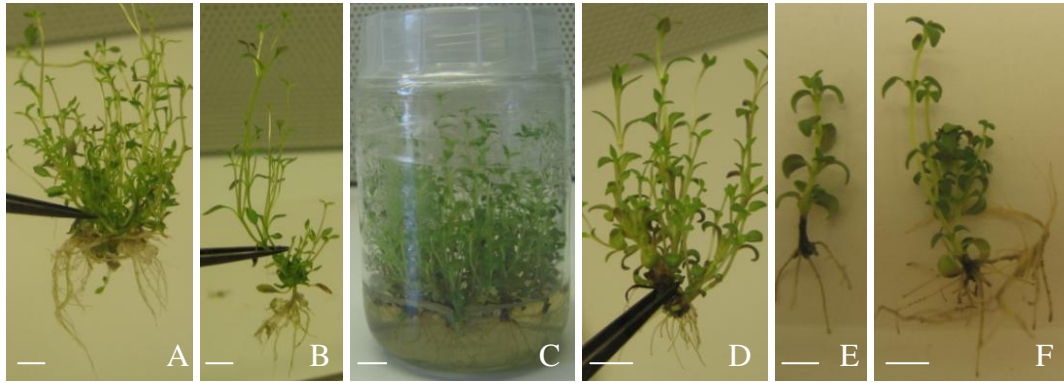
^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, $P \leq 0,05$).

^bK.O.K: Kök oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

T. vulgaris bitkisinde köklenme amaçlı denenen çeşitli derişimlerde oksin bitki büyüme düzenleyicilerine ait veriler değerlendirilip, kök oluşturma kapasitesi indeksleri karşılaştırıldığında en iyi sonuç 15,86 (Çizelge 3.25) olarak hesaplanan, 0,05 mg/l 2,4-D içeren yarı-katı besiyerinde köklenen gövdelerden elde edildi (Şekil 3.17A, B). *T. vulgaris* için belirlenen en uygun köklenme besiyeri, *T. longicaulis* (Şekil 3.17C, D) ve *T. cariensis* (Şekil 17E, F) için de denendi ve her iki kekik türünde %100 köklenme oranı elde edilirken, kök oluşturma kapasitesi indeksleri sırasıyla 11,95 ve 17,67 olarak hesaplandı (Çizelge 3.26).

Çizelge 3.25. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) bitkisine ait gövdelerin çeşitli derişimlerde oksin içeren yarı-katı MS besiyerinde kök oluşturma kapasitelerinin (K.O.K.) karşılaştırılması.

	Oksin Derişimleri			
	0,01 mg/l	0,05 mg/l	0,1 mg/l	1 mg/l
IBA	4,80	3,28	3,42	11,42
NAA	3,86	6,71	11,27	15,02
IAA	3,90	6,87	8,07	9,79
2,4-D	4,32	15,86	8,19	-



Şekil 3.17. 0,05 mg/l 2,4-D içeren yarı-katı MS besiyerinde, (A, B) *T. vulgaris*; (C, D) *T. longicaulis*; (E, F) *T. cariensis* gövdelerinde elde edilen köklenmeler (Barlar 1cm).

Çizelge 3.26. 0,05 mg/l 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisi içeren yarı-katı MS besiyerinde *T. longicaulis* ve *T. cariensis* gövdelerinden elde edilen köklenme sonuçları.

	Köklenme oranı (%)	Ortalama kök sayısı (no \pm S.H) ^a	Ortalama kök boyu (cm \pm S.H) ^a	K.O.K. ^b
<i>T. longicaulis</i> C. Presl	100,0a	11,95 \pm 1,18b	0,92 \pm 0,044a	11,95
<i>T. cariensis</i> Hub.-Mor. & J alas	100,0a	17,67 \pm 0,68a	0,97 \pm 0,060a	17,67

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, $P \leq 0,05$).

^bK.O.K: Kök oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

3.1.4. KEKİK (*Thymus vulgaris* L.) BİTKİSİNİN TOPRAĞA AKTARILMASI VE İKLİMLENDİRİLMESİ

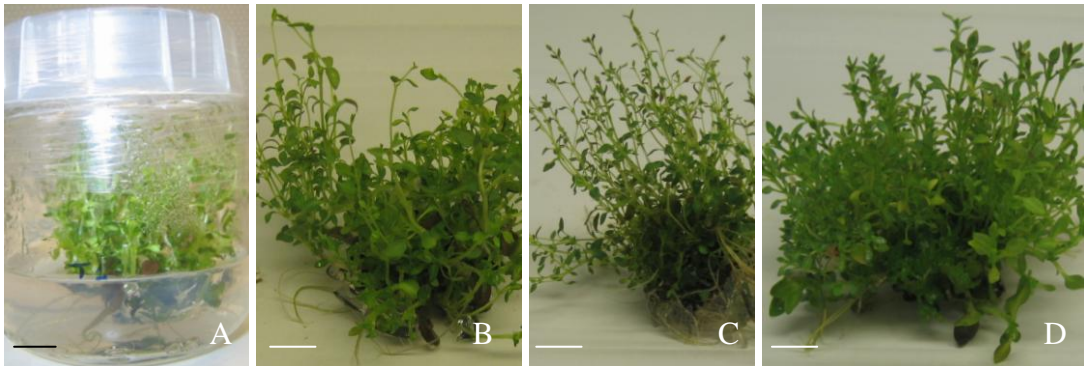
T. vulgaris bitkisi için en ideal köklenme besiyeri olarak belirlenen, 0,05 mg/l 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisi içeren yarı-katı MS besiyerinde köklendirilen, *T. vulgaris*, *T. longicaulis* ve *T. cariensis* bitkilerine ait gövdeler, iklimlendirilmek amacıyla toprağa aktarıldılar. *In vitro* şartlarda geliştirilen örneklerin, doğal ortamda bulunan düşük nem içeriğinden olumsuz yönde etkilenmemesi için, saksıların üstü şeffaf plastikle kapatılıp, birer gün aralıklarla üstlerine birer delik açılarak ortam şartlarına yavaş yavaş adapte olmaları sağlandı. 2 hafta sonunda üstleri tamamen açılan örneklerin, 4 haftalık toprağa aktarım süresi sonunda ortama adaptasyonları değerlendirildi. Her üç bitki türü için yapılan iklimlendirme çalışmalarında %100 başarılı elde edildi (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. *In vitro* ortamda köklendirilip toprağa aktarılan (A) *T.vulgaris*; (B) *T. longicaulis*; (C) *T. cariensis* türlerine ait bitkiler (Barlar 1cm).

3.2. *IN VITRO* ÇOĞALTILAN KEKİK (*Thymus vulgaris* L.) BİTKİSİNİN MOLEKÜLER BELİRTEÇLERLE GENETİK KARARLILIĞININ BELİRLENMESİ

T. vulgaris L. bitkisinin, *in vitro* çoğaltılmı aşamasında, alt kültürleme sırasında oluşabilecek genetik değişikliklerin belirlenmesi amacıyla RAPD PCR tekniği kullanıldı. Bu amaca yönelik tek bir tohumdan çimlendirilip (Şekil 3.19) 1 mg/l KIN ve 0,3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerinde alt kültürlenerek çoğaltılan *T. vulgaris* klonları (T1, T2 ve T3 klonları; çalışmada yalnızca T1 klonundan alt kültürlenerek çoğaltılan klon bitkiler kullanıldı), dört haftalık periyotlarda 10 kez alt kültürlendi. Ana materyalden (*in vitro* gövde klonlarının oluşturulmasında kullanılan, tek bir tohumun çimlendirilmesi sonucu elde edilen fide) başlanarak, 10. alt kültüre kadar her iki alt kültürde bir (0-2-4-6-8-10), 20-30 bitkicik DNA izolasyonu için ayrılarak, moleküler analizlerde kullanılmak üzere, -20°C' ta saklandı. 10 alt kültür sonunda ayrılan örneklerden CTAB yöntemiyle DNA izolasyonu yapıldı.



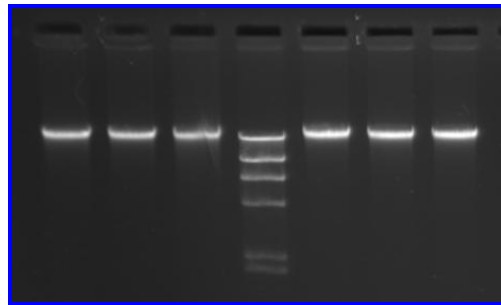
Şekil 3.19. Moleküler analizlerde kullanılmak üzere, *in vitro* çimlendirilen *T. vulgaris*'e ait tohumlardan elde edilen ve 1 mg/l KIN ve 0,3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerinde klonlanan(A, B) T1 klonu ; (C) T2 klonu; ve (D) T3 klonuna ait gövdeler (Barlar 1cm).

3.2.1. Jel elektroforezi ve Spektrofotometre ile DNA Miktarı Tayini

DNA izolasyonunun ardından elde edilen genomik DNA'lar %1' lik agaroz jelde yürütülerek jel görüntüleme sisteminde görselleştirildi (Şekil 3.20). Daha sonra örneklerden 10 µl alınıp 65 µl dH₂O ile sulandırılarak (7.5 kez) mikro küvete alındı ve spektrofotometrik analizi yapılarak (Çizelge 3.27) DNA miktarı ng/µl olarak hesaplandı (DNA µg/µl = 1OD₂₆₀ x 50 x 7.5).

Çizelge 3.27. *Thymus vulgaris* L. bitkisinin T1 klonundan altkültürlenerek çoğaltılan bitkilerden izole edilen genomik DNA'ların spektrofotometrik analiz sonuçları.

λ	0	2	4	6	8	10
220	0.199	0.181	0.194	0.221	0.271	0.250
230	0.100	0.100	0.107	0.135	0.172	0.157
240	0.111	0.111	0.116	0.141	0.186	0.166
250	0.163	0.155	0.157	0.182	0.239	0.212
255	0.178	0.169	0.170	0.196	0.257	0.226
260	0.184	0.174	0.176	0.201	0.262	0.231
270	0.158	0.152	0.153	0.176	0.233	0.204
280	0.103	0.104	0.105	0.129	0.171	0.152
290	0.040	0.051	0.051	0.074	0.105	0.094
300	0.007	0.025	0.024	0.048	0.072	0.064
325	0.000	0.008	0.010	0.029	0.047	0.039
DNA miktarı	690 ng/µl	653 ng/µl	660 ng/µl	754 ng/µl	983 ng/µl	867 ng/µl



Şekil 3.20. *Thymus vulgaris* L. bitkisinden İzole edilen genomik DNA'ların jel görüntüsü (soldan sağa sırasıyla, 0-2-4. alt kültürler sonucu elde edilen bitkilerden izole edilen genomik DNA'lar; *Hind*III ile kesilmiş λ DNA; 6-8-10. alt kültürler sonucu elde edilen bitkilerden izole edilen genomik DNA'lar.)

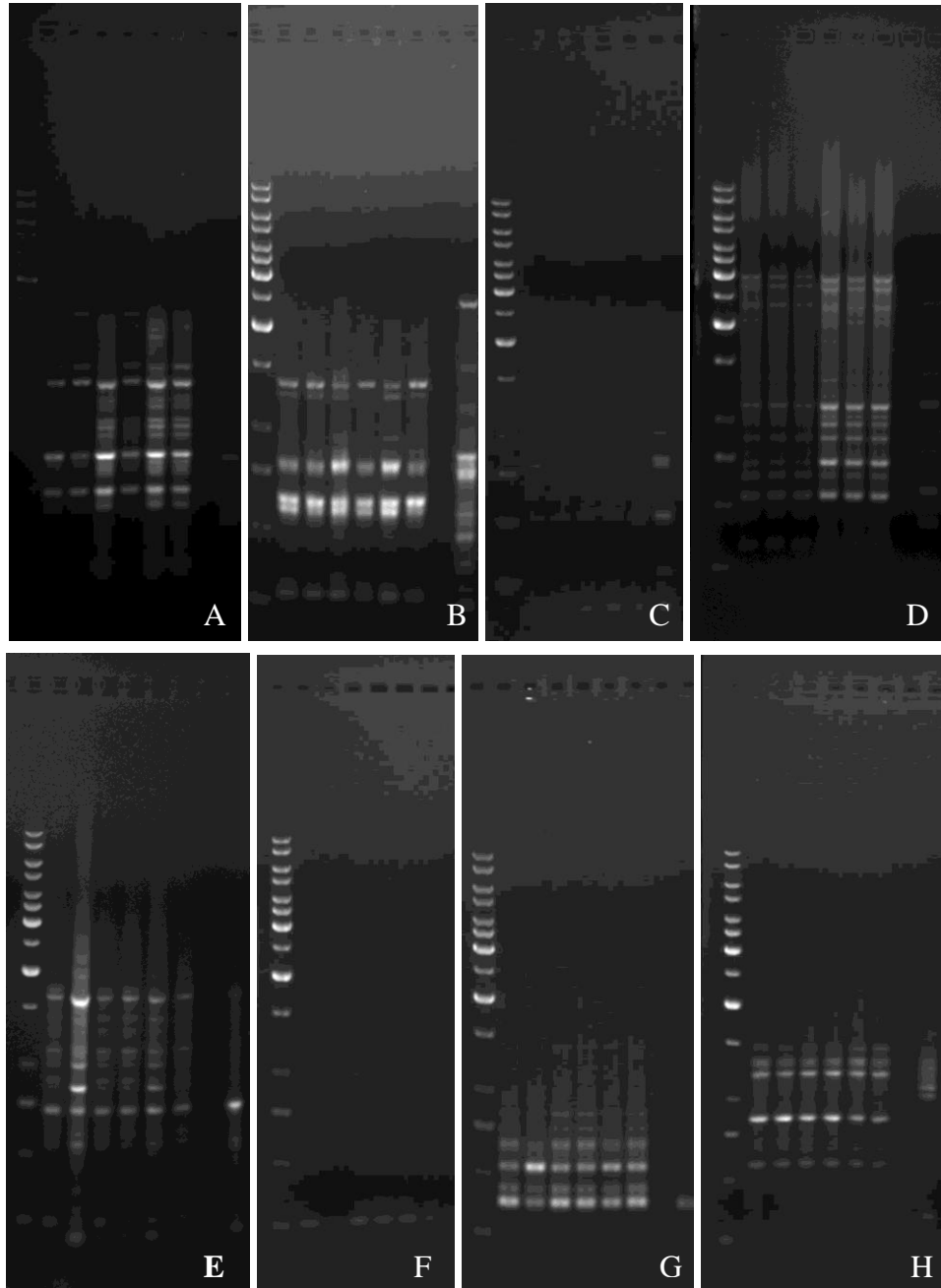
3.2.2. RAPD Analizleri

PCR reaksiyonu rastgele tasarlanmış ve daha önce Yrd. Doç. Dr. Elif Aylin Özüdoğru tarafından arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisi üzerinde denenmiş olan 20

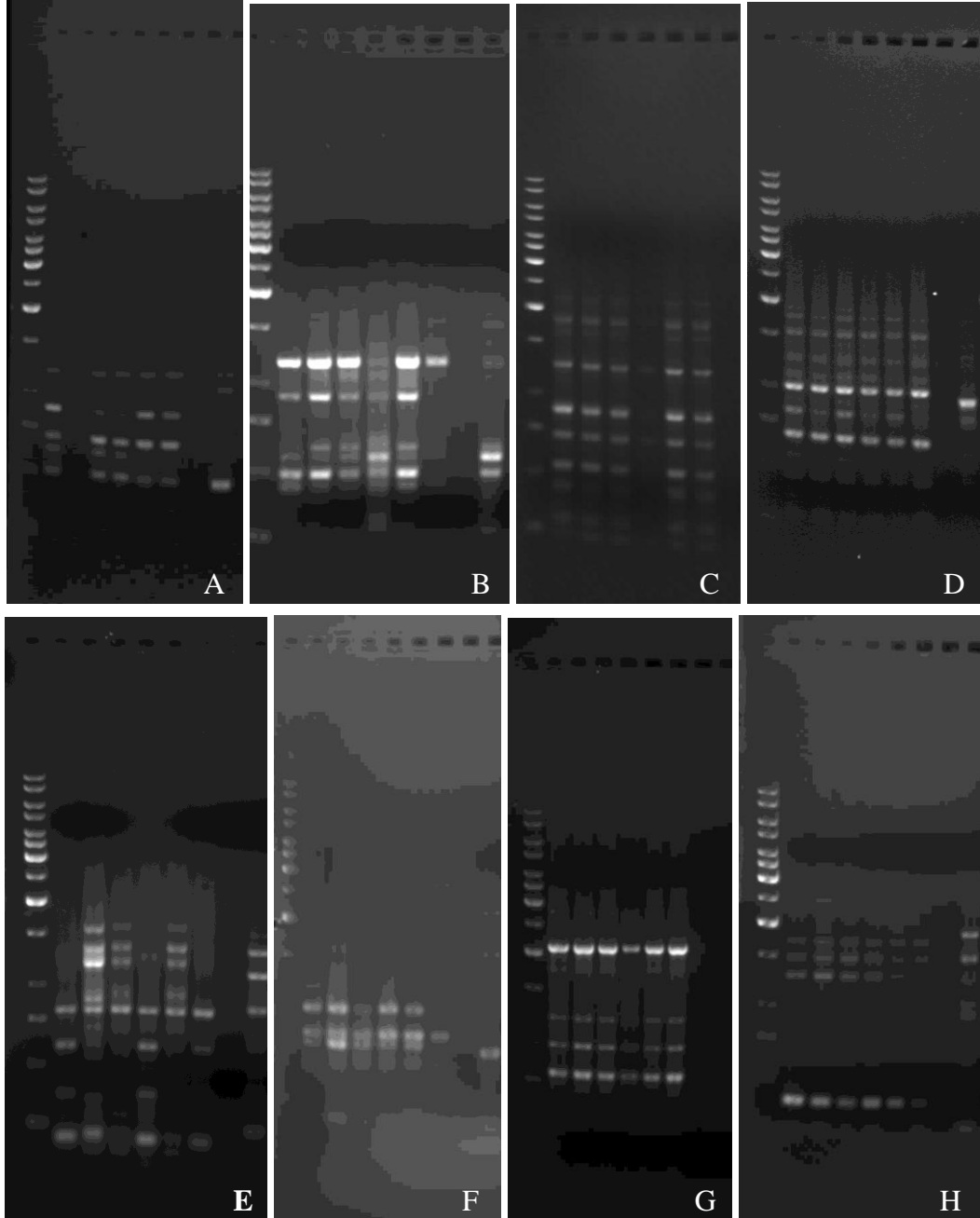
adet primer kullanılarak gerçekleştirildi. PCR ürünleri %1' lik agaroz jel üzerinde yürütüldükten sonra görüntüledi (Şekil 3.21). 20 primerle yapılan RAPD PCR sonucunda büyüklükleri 770-3450 bp arasında değişen toplam 229 bant belirlendi. Denenen primerlerden 4-21 arasında değişen sayılarda bant görülmüştür (Çizelge 3.28). RAPD PCR için kullanılan primerlerden en fazla bant verenler F09 (20 bant; Şekil 3.21A) ve F10' dur (21 bant; Şekil 3.21B). F18 primeri iki tekrarda da hiç bir bant vermedi. Elde edilen PCR ürünlerinde hiç bir polimorfik bant elde edilmedi.

Çizelge 3.28. PCR için kullanılan oligonükleotid primer dizileri ve RAPD PCR sonucu her bir primerden elde edilen bant sayısı.

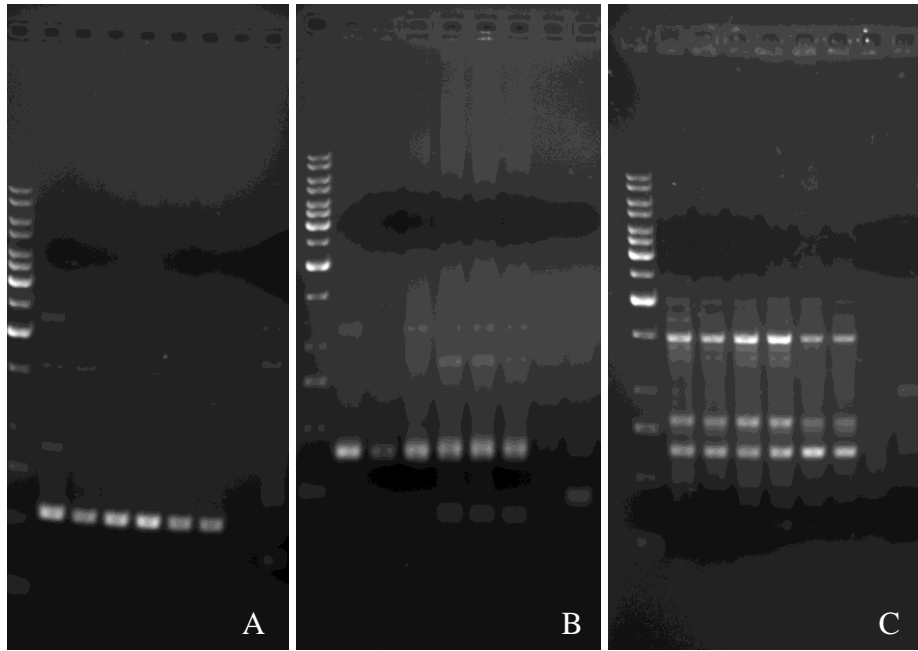
Primer Adı	Oligonükleotid dizisi (5'- 3')	Bant Sayısı	Polimorfik Bant	Polimorfizm (%)
F03	CCT GAT CAC C	17	-	0
F05	CCG AAT TCC C	16	-	0
F08	GGG ATA TCG G	13	-	0
F09	CCA AGC TTC C	20	-	0
F10	GGA AGC TTG G	21	-	0
F11	TTG GTA CCC C	4	-	0
F13	GGC TGC AGA A	9	-	0
F14	TGC TGC AGG T	10	-	0
F15	CCA GTA CTC C	6	-	0
F16	GGA GTA CTG G	18	-	0
F18	TTC CCG GGT T	-	-	0
K01	CAT TCG AGC C	11	-	0
K02	GTC TTC GCA A	14	-	0
K03	CCA GCT TAG G	14	-	0
K06	CAC CTT TCC C	13	-	0
K07	AGC GAG CAA G	11	-	0
K08	GAA CAC TGG G	9	-	0
K09	CCC TAC CGA C	6	-	0
K10	GTG CAA CGT G	4	-	0
K11	AAT GCC CCA G	13	-	0



Şekil 3.21. (A) F03; (B) F05; (C) F08; (D) F09 (E) F10; (F) F11; (G) F13; (H) F14 primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen bantlar. Kuyuların yerleşimi soldan sağa doğru, 1. kuyu belirteç (100 bp); 2-7. kuyular sırasıyla 0-2-4-6-8-10. alt kültürlerde elde edilen kekik bitkilerine ait genomik DNA' nin kalıp olarak kullanıldığı RAPD PCR ürünleri; 8. kuyu - kontrol; 9. kuyu + kontrol (ayvalık çeşitine ait zeytin bitkisinin genomik DNA' sı kullanılarak yapılan RAPD PCR ürünü).



Şekil 3.22. (A) F15; (B) F16; (C) K01; (D) K02 (E) K03; (F) K06; (G) K07; (H) K08 primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen bantlar. Kuyuların yerleşimi soldan sağa doğru, 1. kuyu belirteç (100 bp); 2-7. kuyular sırasıyla 0-2-4-6-8-10. alt kültürlerde elde edilen kekik bitkilerine ait genomik DNA' nin kalıp olarak kullanıldığı RAPD PCR ürünleri; 8. kuyu - kontrol; 9. kuyu + kontrol (ayvalık çeşitine ait zeytin bitkisinin genomik DNA' sı kullanılarak yapılan RAPD PCR ürünü).



Şekil 3.23. (A) K09; (B) K10; (C) K11 primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen bantlar. Kuyuların yerleşimi soldan sağa doğru, 1. kuyu belirteç (100 bp); 2-7. kuyular sırasıyla 0-2-4-6-8-10. alt kültürlerde elde edilen kekik bitkilerine ait genomik DNA' nin kalıp olarak kullanıldığı RAPD PCR ürünleri; 8. kuyu - kontrol; 9. kuyu + kontrol (ayvalık çeşitine ait zeytin bitkisinin genomik DNA' sı kullanılarak yapılan RAPD PCR ürünü).

3.3. KEKİK (*Thymus vulgaris* L.) BİTKİSİNİN *İN VİTRO* YÖNTEMLER VE TEK AŞAMALI DONDURMA YÖNTEMLERİYLE ORTA VE UZUN SÜRELİ SAKLANMASI

3.3.1. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) Bitkisinin *İN Vitro* Yöntemlerle Saklanması

T. vulgaris bitkisi için geliştirilen rejenerasyon besiyerine aktarılan gövdeler, orta dereceli saklama amacıyla, 13 ay boyunca +4°C' ta, karanlık ortamda tutuldu. Her ay, 3 adet bebek maması kabında bulunan örnekler standart şartlara geri alınarak canlılık oranları değerlendirildi. Ayrıca, canlılıklarını koruyan, sağlıklı gövdelerden izole edilen gövde ucu eksplantları rejenerasyon besiyerine aktarılan 4 hafta boyunca standart kültür şartlarında kültürlendi. Dört hafta sonunda, örneklerin rejenerasyon oranları, elde edilen ortalama gövde sayısı ve ortalama gövde boyu kaydedildi ve gövde oluşturma kapasitesi indeksleri hesaplandı (Çizelge 3.29).

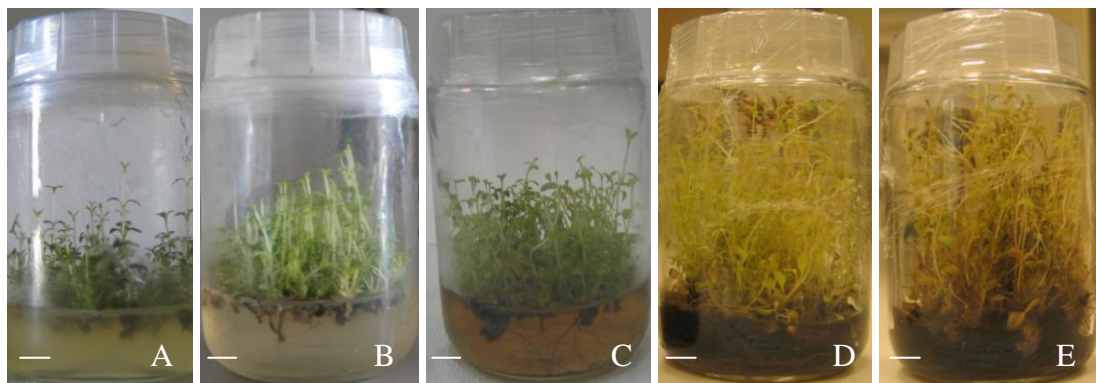
Çizelge 3.29. *T. vulgaris* bitkisinin +4°C’ ta orta dereceli saklaması sonucu elde edilen bitki rejenerasyonları.

+4 °C’ ta saklama süresi (ay)	Canlılık oranı (%)	Rejenerasyon Oranı	Ortalama Gövde sayısı (no ± S.H) ^a	Ortalama gövde boyu (cm ± S.H) ^a	G.O.K ^b
1	100a	100a	5.5 ± 0.60d	1.2 ± 0.08c	5.5
2	100a	100a	9.2 ± 0.78b	1.4 ± 0.06b	9.2
3	100a	91.7a	7.3 ± 0.83bc	1.6 ± 0.09a	6.7
4	100a	93.3a	4.4 ± 0.33d	1.0 ± 0.05d	4.1
5	100a	100a	4.8 ± 0.32d	1.0 ± 0.05d	4.8
6	94.8a	95.3a	4.8 ± 0.48d	1.6 ± 0.14a	4.5
7	83.6a	96.7a	6.5 ± 0.47d	1.1 ± 0.05c	6.3
8	74.4ab	88.5a	8.6 ± 0.45b	1.1 ± 0.04c	7.6
9	62.7b	95.1a	6.7 ± 0.36cd	1.2 ± 0.04c	6.4
10	66.1b	98.3a	8.4 ± 0.52b	1.3 ± 0.04b	8.3
11	53.1b	98.3a	7.4 ± 0.40bc	1.3 ± 0.04b	4.1
12	36.8c	78.3b	8.8 ± 1.25a	1.0 ± 0.04d	6.9
13	25.3c	3.3c	6.0 ± 2.00d	1.2 ± 0.02c	0.2

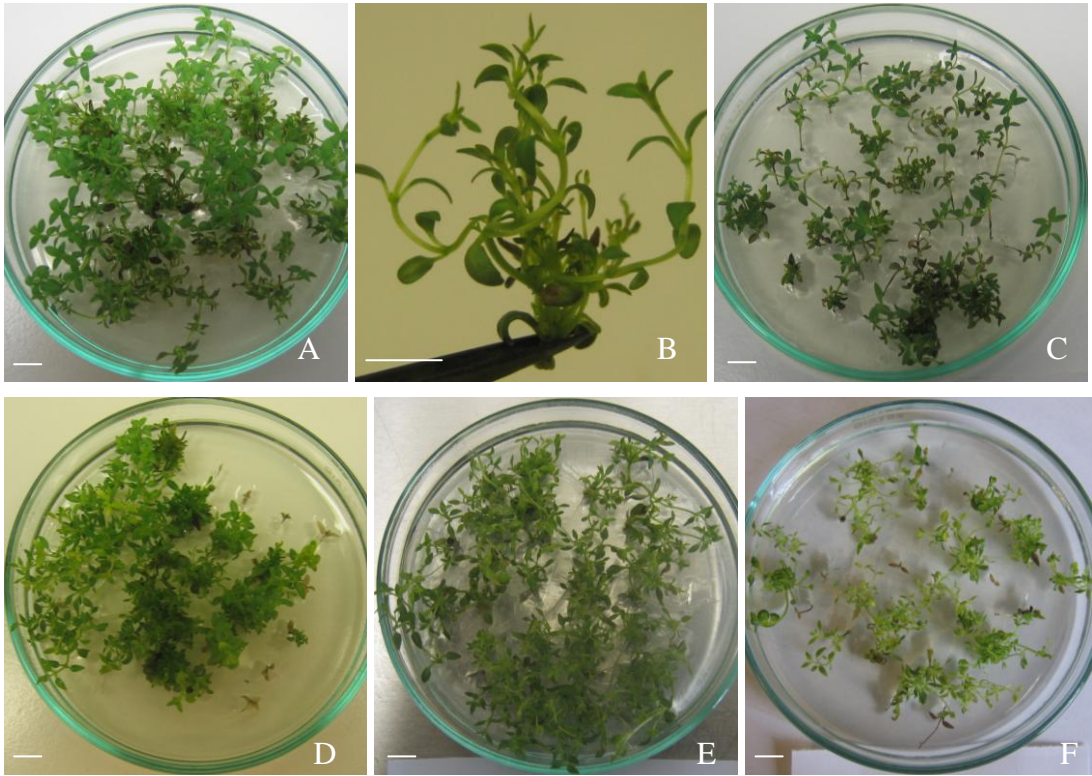
^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, P≤0.05).

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

Yapılan çalışmada elde edilen verilere göre, *T. vulgaris* bitkisinin orta dereceli saklanması ilk beş aylık periyotta %100 olan canlılık oranları (Şekil 3.24A, B, C) altıncı ay ve sonrasında yavaş yavaş bir düşüş gösterdi (Şekil 3.24D, E). Bununla birlikte 12 ay orta dereceli saklanan bitkilerden alınan gövde ucu eksplantlarından %78’ in üzerinde rejenerasyon oranı elde edildi (Şekil 3.25). Buna karşılık, 13 ay boyunca +4°C’ ta saklanan kültürlerin canlılık ve rejenerasyon oranlarında önemli bir düşüş kaydedildi. Elde edilen bu sonuçlar, kekik bitkisinin orta dereceli saklama yöntemleri ile, periyodik alt kültürlerle gerek duyulmadan, bir yıl boyunca saklanabildiğini göstermektedir.



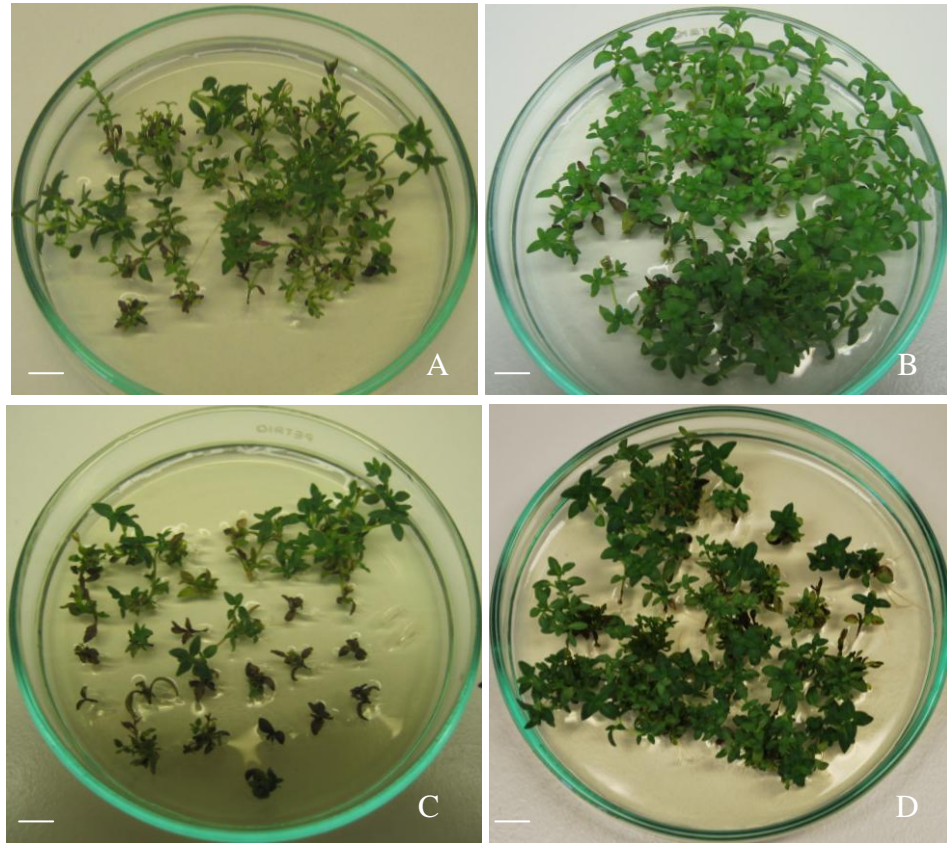
Şekil 3.24. +4°C’ ta, karanlık koşullarda (A) 1 ay; (B) 2 ay; (C) 5 ay; (D) 10 ay; ve (E) 12 ay saklanan *T. vulgaris* gövde kültürleri (Barlar 1cm).



Şekil 3.25. (A, B) 2 ay; (C) 6 ay; (D) 8 ay; (E) 10 ay; ve (F) 12 ay boyunca +4°C' ta, karanlık koşullarda orta dereceli saklanan *T. vulgaris* gövde kültürlerinden izole edilen gövde ucu eksplantlarında gözlenen bitki rejenerasyonları (Barlar 1cm).

3.3.2. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) Bitkisinin Kriyoprezervasyon Öncesi Soğuğa Alıştırılması

Kriyoprezervasyon öncesi *T. vulgaris* bitkisi için en uygun soğuğa alıştırma süresini belirlemek amacıyla, +4°C' ta 1-4 hafta tutulan örneklerden birer haftalık periyotlarla alınan gövde ucu eksplantları, 1 mg/l KIN ve 0.3 mg/l GA₃ içeren yarıkatı MS besiyerine aktarıldı. Dört haftalık süre sonunda, gövde uçlarının rejenerasyon oranları, ortalama gövde boyları ve her bir eksplanttan oluşan gövde sayısı belirlenerek, bu veriler ışığında hesaplanan gövde oluşturma kapasitesine göre en uygun soğuğa alıştırma süresi belirlendi (Çizelge 3.30). Soğuğa alıştırma sürecinde 1-4 hafta soğukta bekletilen örneklerden alınan gövde ucu eksplantlarından %100 rejenerasyon oranı elde edildi (Şekil 3.26A-D). 2 hafta soğukta bekletilen örneklerden alınan gövde ucu eksplantlarından, eksplant başına en yüksek gövde sayısı ve dolayısı ile gövde oluşturma kapasitesi elde edildi (6,95) ve ilerleyen kriyoprezervasyon çalışmaları için en uygun soğuğa alıştırma periyodu 2 hafta olarak belirlendi (Şekil 3.27).



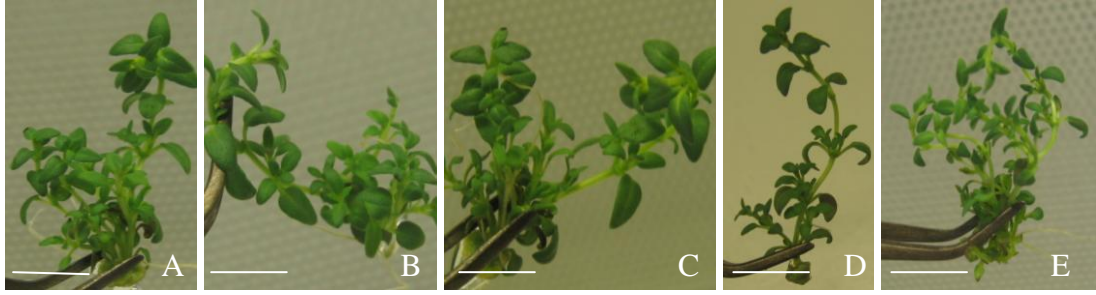
Şekil 3.26. (A) 1; (B) 2; (C) 3; (D) 4 hafta süreyle soğukta tutulan *T. vulgaris* bitkilerinden izole edilen gövde ucu eksplantlarında gözlenen bitki rejenerasyonları (Barlar 1cm).

Çizelge 3.30. 1-4 hafta boyunca soğuğa alıştıran *T. vulgaris* bitkilerinden izole edilen gövde ucu eksplantlarının rejenerasyonları.

Saklama Süresi	Rejenerasyon Oranı (%)	Ortalama Gövde Sayısı (no \pm S.H) ^a	Ortalama Gövde Boyu (cm \pm S.H) ^a	G.O.K ^b
1 hafta	100a	3,87 \pm 0.28b	0,92 \pm 0.05b	3,87
2 hafta	100a	6,95 \pm 0.47a	1,33 \pm 0.05a	6,95
3 hafta	100a	3,23 \pm 0.36b	0,66 \pm 0.05b	3,23
4 hafta	100a	5,53 \pm 0.60a	1,23 \pm 0.08a	5,53

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, $P \leq 0,05$).

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).



Şekil 3.27. 2 hafta boyunca soğuğa alıştıran *T. vulgaris* bitkisinden izole edilen gövde ucu eksplantlarında gözlenen gövde rejenerasyonları (Barlar 1cm).

3.3.3. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) Bitkisinin Kriyoprezervasyon Öncesi Sukroz Ön Kültürü

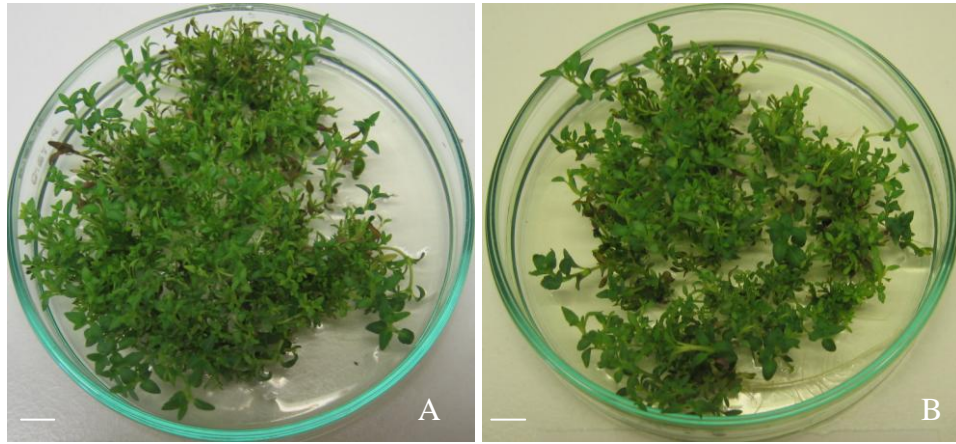
T. vulgaris bitkisinin kriyoprezervasyon öncesi ikinci aşamasında sukroz ön kültür çalışması yapıldı. Bu aşamada çeşitli sukroz derişimlerinde, farklı uygulama sürelerinin bitkinin rejenerasyonu üzerindeki etkileri değerlendirildi. Bu amaca yönelik, bitkiden alınan gövde ucu eksplantlarının 0,12, 0,25, 0,50, 0,75 ve 1 M sukroz derişimleri içeren yarı-katı MS.0 besiyerinde 24, 48 ve 72 saat etkileşimi sağlandı. Sukroz ön kültürü sonucu tekrar rejenerasyon besiyerine aktarılan gövde uçlarının 4 haftalık kültür sonucu rejenerasyon oranları, ortalama gövde boyu ve gövde sayısı kaydedildi (Çizelge 3.31). Bu veriler ışığında gövde oluşturma kapasitesi hesaplandı ve kriyoprezervasyon öncesi optimum sukroz ön kültür besiyeri belirlendi. Çalışmaya ek olarak 24 saatlik periyotlarda 0,12 M' dan 0,50 M' a ve 0,12 M' dan 1 M' a arttırılan (gövde ucu eksplantları birer gün arayla, bir öncekinden daha yüksek sukroz derişimini içeren besiyerlerine aktarıldı, böylece örneklerin sukroz derişimleri aşamalı olarak arttırıldı) sukroz derişimlerinin bitki rejenerasyonu üzerindeki etkisi de incelendi (Çizelge 3.31). Gövde oluşturma kapasiteleri değerlendirildiğinde en iyi sukroz ön kültür uygulamasının 0,25 M sukrozda 48 saatlik inkübasyonun olduğu belirlendi (Şekil 3.28). Sonuç olarak, *Thymus vulgaris* bitkisinin kriyoprezervasyonu öncesinde, 2 haftalık soğuğa alıştırma periyodunu takiben, gövde ucu eksplantlarının 0,25 M sukrozda 48 saat inkübe edilmesine karar verildi.

Çizelge 3.31. *T. vulgaris* bitkisine ait gövde ucu eksplantlarının sukroz önkültür aşamasından sonra rejenerasyon besiyerindeki gelişimleri.

Sukroz ön kültür	Rejenerasyon Oranı (%)	Ortalama Gövde sayısı (no ± S.H) ^a	Ortalama Gövde Uzunluğu (cm ± S.H) ^a	G.O.K ^b
<i>24 saat</i>				
0,12M	86,67ab	3,62 ± 0,38c	1,39 ± 0,12b	3,14c
0,25M	95,00a	6,37 ± 0,52b	1,42 ± 0,06b	6,05b
0,50M	68,33b	4,93 ± 0,61c	0,99 ± 0,07bc	3,37c
0,75M	26,67c	7,25 ± 1,46b	0,85 ± 0,06c	1,93d
1,00M	26,67c	6,19 ± 0,97b	1,27 ± 0,18b	1,65d
<i>48 saat</i>				
0,12M	95,00a	9,63 ± 0,70a	1,79 ± 0,09ab	9,15a
0,25M	98,33a	10,20 ± 0,72a	1,51 ± 0,05b	10,03a
0,50M	70,00b	5,98 ± 0,55bc	1,34 ± 0,11b	4,19c
0,75M	23,33c	6,71 ± 1,18b	0,86 ± 0,11c	1,57d
1,00M	6,67d	5,50 ± 1,66bc	1,70 ± 0,54ab	3,67c
<i>72 saat</i>				
0,12M	93,33a	4,48 ± 0,49c	2,06 ± 0,17a	4,18c
0,25M	100,00a	6,78 ± 0,54b	1,68 ± 0,08ab	6,78b
0,50M	75,00b	5,33 ± 0,45bc	0,97 ± 0,06bc	4,00c
0,75M	35,00c	6,81 ± 0,76b	0,92 ± 0,07bc	2,38d
1,00M	0,00	0	0	0
<i>Kademeli olarak artırılan sukroz derişimi</i>				
0,12 - 0,50M	80,00b	4,50 ± 0,42c	0,98 ± 0,06bc	3,60cd
0,12 - 1,00M	30,00c	8,22 ± 0,95b	0,68 ± 0,05c	2,47d

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi.

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).



Şekil 3.28. 0,25M sukroz içeren yarı-katı MS besiyerinde 48 saat inkübe edilen *T. vulgaris* gövde uçlarında gözlenen gövde rejenerasyonları (Barlar).

3.3.4. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) Bitkisinin PVS-2 Vitrifikasyon Tekniği ile Kriyoprezervasyonu

İki hafta süreyle +4 °C' ta soğuğa alıştıran gövde kültürlerinden izole edilen gövde ucu eksplantları 0,25 M sukroz içeren MS besiyerinde 48 saat inkübe

edildikten sonra kriyoviallere alınıp 1 ml LS solüsyonu ile 30 dakika süreyle oda sıcaklığında muamele edildi. LS uygulamasını takiben, solüsyon uzaklaştırılıp örneklerin üzerine 1 ml PVS2 solüsyonu eklenip 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 ve 120 dakikalık periyotlarla 0 °C' ta muamele edildi. Her bir inkübasyon periyodundan sonra örneklerin bir bölümü kriyovialler içerisinde doğrudan sıvı azota (SA +) transfer edildi. Sıvı azotta en az bir saat tutulan örnekler 40°C sıcak su banyosunda çözülüp, 1,2 M sukroz içeren sıvı MS besiyeriyle yıkandıktan sonra 1 mg/l KIN ve 0,3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerine transfer edildi. Örneklerin diğer bir kısmı ise (kontrol grubu) sıvı azota daldırılmadan, 30 dakika 1,2 M sukroz içeren sıvı MS besiyeri ile yıkayıp 1 mg/l KIN ve 0,3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerine transfer edildi. Dört haftalık rejenerasyon periyodunu takiben canlılık ve rejenerasyon oranları, eksplant başına düşen gövde sayısı ve gövde boyu sonuçları alınıp değerlendirildi (Çizelge 3.32).

Çizelge 3.32. Farklı PVS2 uygulama sürelerinin, vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezerve edilen *T. vulgaris* gövde uçlarının rejenerasyonu üzerindeki etkisi.

PVS2 Uygulama Süresi (dakika)	Canlılık (%)	Rejenerasyon (%)	Ortalama Gövde Sayısı (no ± S.H.) ^a	Ortalama Gövde Boyu (cm ± S.H.) ^a	G.O.K. ^b
Kontrol					
15	55,6b	53,7b	22,17±3,84ab	1,02 ± 0,07a	11,90
30	53,7b	51,9b	30,14 ±3,87a	1,03 ± 0,04a	15,64
45	49,1bc	49,1c	17,76±3,22ab	0,86 ± 0,07ab	8,43
60	71,7a	71,7a	18,28±2,99ab	0,79 ± 0,06b	13,11
75	76,7a	76,7a	16,56±2,75ab	0,81 ± 0,04b	12,70
90	50,9b	47,4c	14,81±2,52ab	1,03 ± 0,06a	7,02
105	1,9d	1,9d	1,00±0,00b	0,34 ± 0,00b	0,02
120	10,5c	8,8d	6,80±4,86b	0,57 ± 0,05b	0,71
SA (+) ^c					
15	24,3a	24,3a	15,31 ± 5,21a	0,67 ± 0,07ab	3,72
30	20,3a	20,3a	13,55 ± 5,28a	0,47 ± 0,03ab	2,75
45	5,3b	5,3b	18,67 ± 8,99a	0,74 ± 0,11a	0,99
60	18,3a	18,3a	11,18 ± 5,69a	0,43 ± 0,05b	2,05
75	3,3b	3,3b	14,50±13,50a	0,52 ± 0,22ab	0,48
90	3,3b	1,7b	4,00 ± 0,00a	0,78 ± 0,00a	0,07
105	1,8b	1,8b	5,00 ± 0,00a	0,44 ± 0,00b	0,09
120	1,8b	1,8b	20,00 ± 0,00a	0,48 ± 0,00ab	0,36

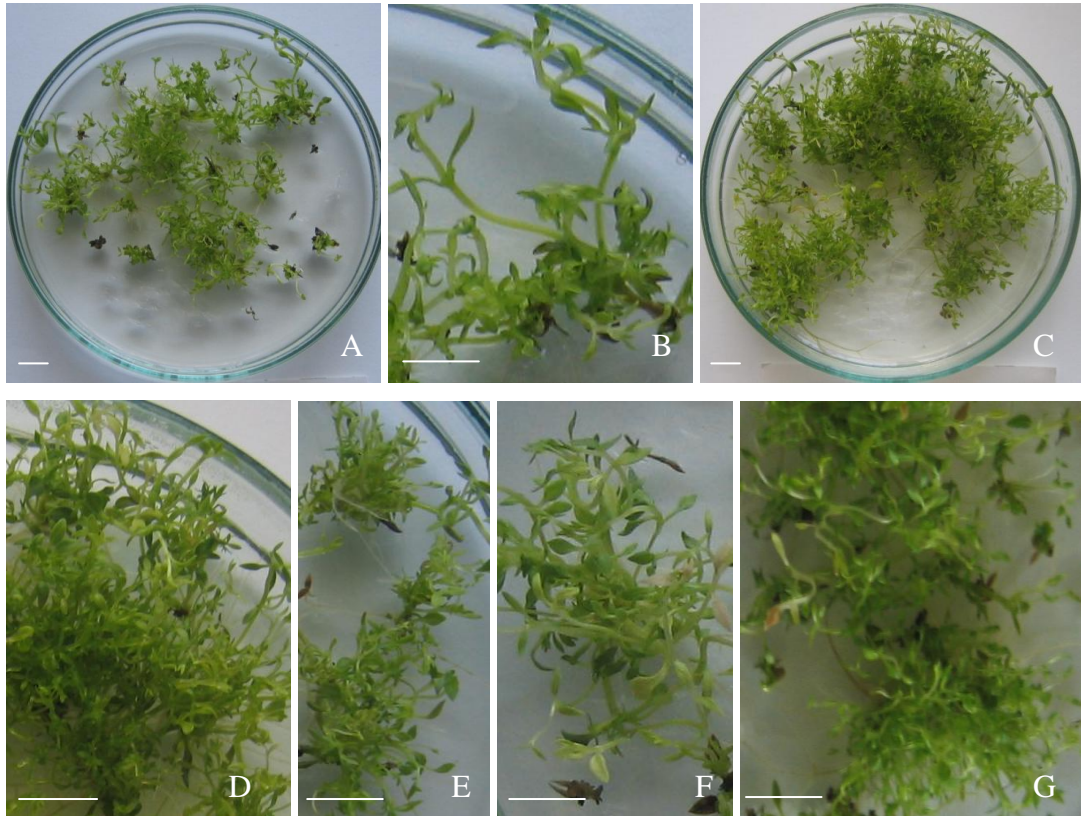
^aİstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, P≤0,05)

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

SA (+)^c: Sıvı azot grubu sonuçları.

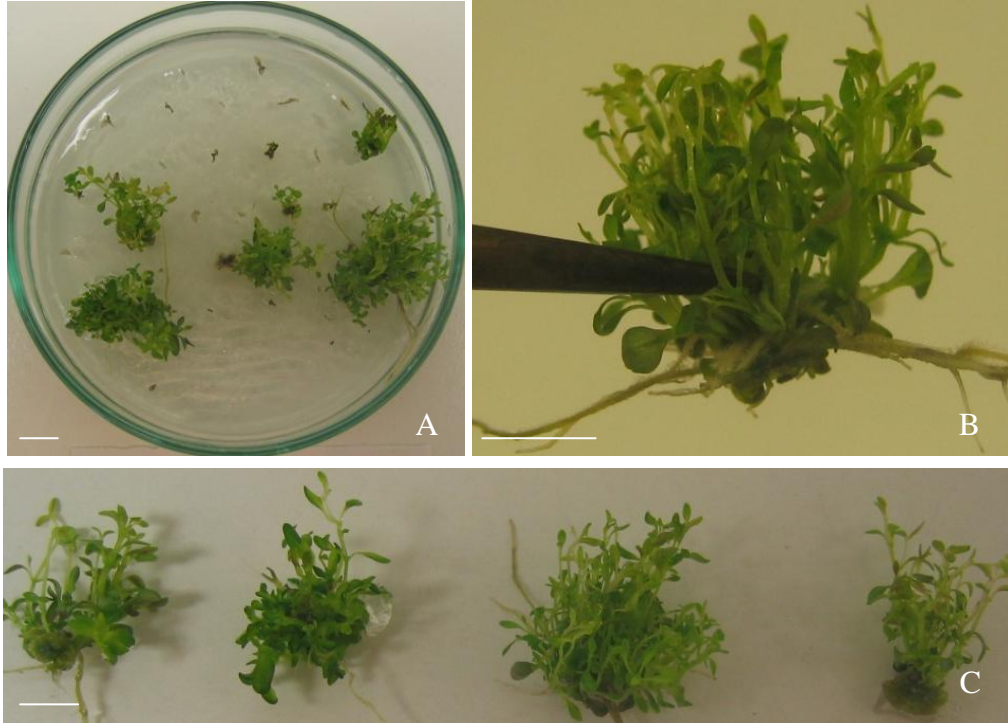
PVS2 ile muamele edilen kontrol grubu örneklerde %76,7 canlılık ve rejenerasyon oranı ile en fazla başarı 75 dakikalık PVS2 muamelesi sonucu elde

edildi (Şekil 3.29A, B). 90 dakikaya kadar olan PVS2 uygulamalarında canlılık ve rejenerasyon oranlarının %50' nin üzerinde olduğu ve 105 ve 120 dakikalık uygulamalarda ise PVS2 çözeltisinin bitki için toksik etki gösterdiği belirlendi. 30 dakika PVS2 uygulamasında da %50' nin üzerinde canlılık ve rejenerasyon, ayrıca eksplant başına ortalama 30 gövde elde edildi (Şekil 3.29C, D). 60 dakika PVS2 uygulamasında ise %71,7 oranında canlılık ve rejenerasyon, eksplant başına ortalama 18,28 gövde elde edildi (Şekil 3.29E, F, G).

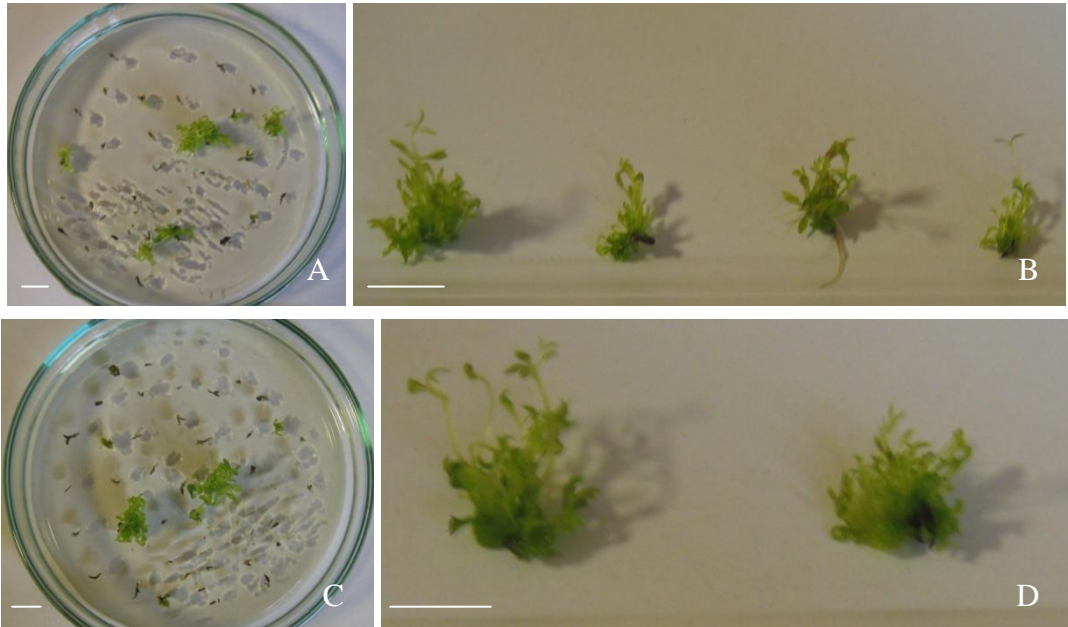


Şekil 3.29. *Thymus vulgaris* bitkisinden alınan gövde ucu eksplantlarının (A, B)75 dakika; (C, D) 30 dakika; (E, F, G) 60 dakika PVS2 çözeltisi ile muamalesinden sonraki dört haftalık gelişme periyodunda oluşturdukları çoklu gövdeler (Barlar 1cm).

T. vulgaris bitkisinin PVS2 vitrifikasyon tekniği ile kryoprezervasyonunda, sıvı azot içerisinde en az 1 saat bekletilen örneklerde %24,3' lük bir değerle en yüksek rejenerasyon oranı veren ve ortalama 15,31 gövde elde edilen, 15 dakikalık PVS2 uygulaması olduğu görüldü (Çizelge 3.32, Şekil 3.30). 30 ve 60 dakikalık PVS2 uygulamasının ardından sıvı azota daldırılan örneklerde de sırasıyla % 20,3 ve %18,3 gibi canlılık ve rejenerasyon oranları elde edildi (Şekil 3.31).



Şekil 3.30A-C. 15 dakikalık PVS2 muamalesinin ardından sıvı azotta saklanan *T. vulgaris* gövde ucu eksplantlarının rejenerasyon besiyerinde dört haftalık kültürlenmesi sonucu oluşturdukları çoklu gövdeler (Barlar 1cm).



Şekil 3.31 (A, B) 30 dakikalık; ve (C, D) 60 dakikalık PVS2 muamalesinin ardından sıvı azotta saklanan *T. vulgaris* gövde ucu eksplantlarının rejenerasyon besiyerinde dört haftalık kültür sonucu oluşturdukları çoklu gövdeler (Barlar 1cm).

3.3.5. *T. vulgaris* Bitkisinin Enkapsülasyon-vitrifikasyon Yöntemiyle Kriyoprezarvasyonu

T. vulgaris bitkisinden alınan gövde ucu eksplantları, daha önce optimize edilen soğuğa alıştırma ve sukroz ön kültür aşamalarının ardından sodyum aljinat ile enkapsüle edildi ve kriyoviallere alınıp LS solüsyonuyla muamele edildi. Uygulamanın ardından örneklerden LS solüsyonu uzaklaştırıldı ve PVS2 solüsyonu eklenip 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 ve 120 dakikalık periyotlarla 0°C' ta muamele edildi. Kontrol grubu 1,2 M sukroz içeren sıvı MS besiyeri ile yıkanıp kriyo korucu solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra 1 mg/l KIN ve 0,3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerine alındı ve 4 hafta süreyle canlılık ve rejenerasyonları değerlendirildi (Çizelge 3.33). Diğer grup PVS2 uygulamasının ardından sıvı azota daldırıldı. Sıvı azot sonrası (en az 1 saat sıvı azotta bekletilen) örnekler çözüldükten sonra rejenerasyon besiyerine aktarılarak, 4 hafta süreyle canlılık ve rejenerasyonları değerlendirildi (Çizelge 3.33). Enkapsüle edilen örneklerden sadece PVS2 ile muamele edilmeyen kontrol grubunda %23.33 canlılık ve rejenerasyon elde edildi (Şekil 3.32). Enkapsülasyon-vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyon deneyinde 15, 30, 45 ve 60 dakikalık PVS2 muamelesi sonucunda canlılık ve rejenerasyon görülmedi. 75, 90, 105 ve 120 dakikalık PVS2 uygulamalarında ise oldukça düşük değerler elde edildi. Sıvı azota daldırılan örneklerde de sonuç olumsuz olmuştur. Bununla beraber, 120 dakika PVS2 çözeltisiyle muamele edildikten sonra kriyoprezerve edilen örneklerde %11.67 oranında canlılık görüldü, ancak rejenerasyon oranı oldukça düşüktü (Çizelge 3.33).



Şekil 3.32. (A, B, C) PVS2 ile muamele edilmeden yarı-katı MS besiyerine aktarılan sentetik tohumların çimlenmesi ve oluşturdukları çoklu gövdeler (Barlar 1cm).

Çizelge 3.33. Farklı PVS2 uygulama sürelerinin, Enkapsülasyon-vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezerve edilen *T. vulgaris* bitkisine ait gövde uçlarının rejenerasyonu üzerindeki etkisi.

PVS2 Uygulama Süresi (dakika)	Canlılık (%)	Rejenerasyon (%)	Ortalama Gövde Sayısı (no ± S.H.) ^a	Ortalama Gövde Boyu (cm ± S.H.) ^a	G.O.K. ^b
Kontrol					
0	23,33a	23,33a	26,43 ± 7,37a	0,83 ± 0,07a	6,17
15	1,67c	1,67c	6,00 ± 0,00b	0,62 ± 0,00a	0,10
30	0,00c	0,00c	-	-	0,0
45	0,00c	0,00c	-	-	0,0
60	0,00c	0,00c	-	-	0,0
75	5,00b	3,33b	2,50 ± 1,50b	0,92 ± 0,19a	0,13
90	1,67c	1,67c	1,00 ± 0,00b	0,30 ± 0,00a	0,02
105	1,67c	1,67c	2,00 ± 0,00b	0,50 ± 0,00a	0,02
120	3,33bc	3,33b	2,50 ± 0,50b	0,40 ± 0,10a	0,08
SA (+)^c					
0	0,00c	0,00b	-	-	0,0
15	0,00c	0,00b	-	-	0,0
30	0,00c	0,00b	-	-	0,0
45	0,00c	0,00b	-	-	0,0
60	1,67c	0,00b	-	-	0,0
75	0,00c	0,00b	-	-	0,0
90	0,00c	0,00b	-	-	0,0
105	11,67a	3,33a	1,00 ± 0,00b	0,30 ± 0,00a	0,03
120	5,00b	0,00b	-	-	0,0

^aİstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, $P \leq 0,05$)

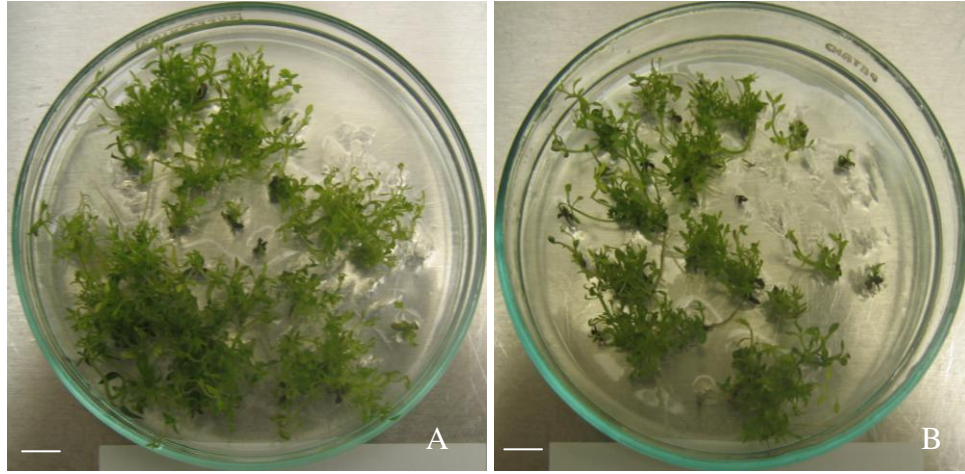
^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

SA (+)^c: Sıvı azot grubu örnekler.

3.3.6. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) Bitkisinin Damlacık Dondurma Tekniği ile Kriyoprezervasyonu

T. vulgaris bitkisinin damlacık dondurma tekniği ile kriyoprezervasyonunda, soğuğa alıştırma ve sukroz önkültür aşamalarını takiben gövde ucu eksplantları, aliminyum şeritler üzerine damlatılan 3-5 μ l' lik PVS2 solüsyonuyla 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 ve 120 dakikalık periyotlarla 0°C' ta muamele edildi. Kontrol grubu 1.2M sukroz içeren sıvı MS besiyerinde yıkanıp rejenerasyon besiyerine aktarıldı ve 4 haftalık kültürün ardından rejenerasyon sonuçları değerlendirildi (Çizelge 3.34). Kontrol grubunda 15, 30, 75 ve 90 dakikalık PVS2 uygulamasında %70' in üzerinde rejenerasyon elde edildi. 90 dakikalık PVS2 uygulamasında %90,7 canlılık, %88,9

rejenerasyon oranı ve gövde başına düşen ortalama 20,3 gövde sayısı ile en iyi sonucu verdi (Şekil 3.33).



Şekil 3.33A-B. *Tymus vulgaris* bitkisinin damlacık dondurma tekniğiyle kriyoprezervasyonunda, kontrol grubu gövde uçlarından rejenere olan gövdeler (Barlar 1cm).

Çizelge 3.34. Farklı PVS2 uygulama sürelerinin, damlacık dondurma tekniği ile kriyoprezerve edilen *T. vulgaris* bitkisine ait gövde uçlarının rejenerasyonu üzerindeki etkisi.

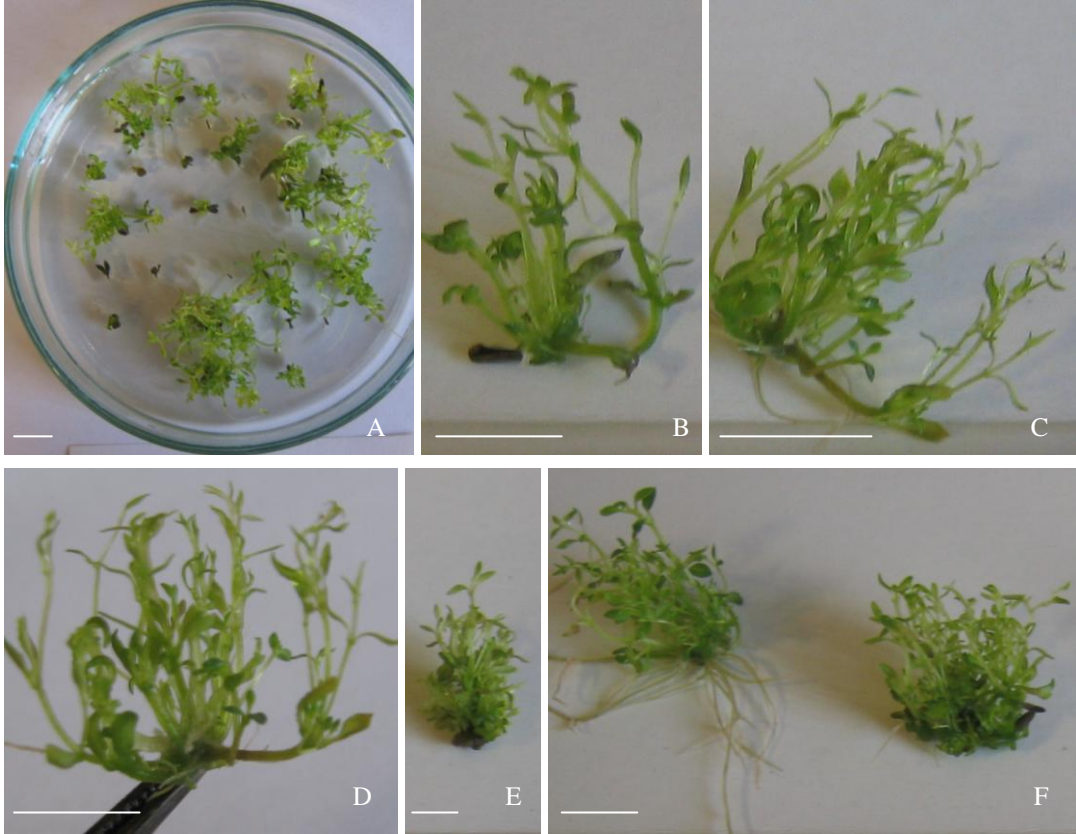
PVS2 Uygulama Süresi (dakika)	Canlılık (%)	Rejenerasyon (%)	Ortalama Gövde Sayısı (no ± S.H.) ^a	Ortalama Gövde Boyu (cm ± S.H.) ^a	G.O.K. ^b
Kontrol					
15	73,3b	76,7b	4,8 ± 0,8b	0,7 ± 0,05b	3,5
30	70,0b	80,0b	4,8 ± 0,4b	0,8 ± 0,05a	3,4
45	66,7bc	66,7c	2,4 ± 0,2b	0,4 ± 0,02b	1,6
60	50,0bc	66,7c	2,7 ± 0,3b	0,5 ± 0,03b	1,4
75	70,0b	70,0bc	2,7 ± 0,2b	0,4 ± 0,01b	1,9
90	88,9a	90,7a	20,3 ± 2,7a	0,9 ± 0,03a	18,0
105	26,7c	46,7c	3,3 ± 0,4b	0,7 ± 0,04ab	0,9
120	0,0d	1,7d	-	-	-
SA (+)^c					
15	13,0c	7,4c	2,5 ± 0,64c	0,4 ± 0,05b	0,18
30	11,7c	5,0c	5,0 ± 4,00bc	0,6 ± 0,18a	0,25
45	17,6bc	9,8b	6,0 ± 1,67b	0,6 ± 0,05ab	0,59
60	25,9b	11,1b	6,0 ± 1,37b	0,7 ± 0,09a	0,67
75	16,7bc	10,0b	13,3 ± 4,42a	0,7 ± 0,07a	1,33
90	85,0a	80,0a	15,8 ± 2,4a	0,7 ± 0,05a	12,63
105	5,9bc	3,9d	7,5 ± 0,50b	0,6 ± 0,18ab	0,28
120	0,0d	0,0d	-	-	0,00

^aİstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, $P \leq 0,05$)

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

SA (+)^c: Sıvı azot grubu örnekler.

Damlacık dondurma tekniğinde, sıvı azotta saklanan örneklerde de 90 dakikalık PVS2 uygulaması %85 canlılık oranı, %80 rejenerasyon oranı ve eksplant başına ortalama 15,8 gövde sayısı ile en iyi sonuçları verdi (Çizelge 3.34; Şekil 3.34).



Şekil 3.34 (A-F) *Tymus vulgaris* bitkisinin damlacık dondurma tekniğiyle kriyoprezervasyonunda, sıvı azotta saklanan gövde uçlarından rejenere olan gövdeler (Barlar 1cm).

3.3.6.1. *T. cariensis* Bitkisinin Damlacık Dondurma Tekniği ile Kriyoprezervasyonu

T. vulgaris bitkisinin kriyoprezervasyonu için denenen ve en iyi sonucu veren damlacık dondurma tekniği *T. cariensis* bitkisinin uzun süreli saklanması için denendi. 2 haftalık soğuğa alıştırmaya ve sukroz ön kültür aşamalarının ardından *T. cariensis* gövde ucu eksplantları PVS2 çözeltisi ile 90 dakika boyunca muamele edildi. Kontrol ve sıvı azot grubuna ait sonuçlar Çizelge 3.35’ de verildi. Çalışmada kontrol grubuna ait canlılık ve rejenerasyon oranları sırasıyla %65 ve 60; sıvı azot grubunda ise %20 ve 18,33 olarak kaydedildi. Kontrol grubunda eksplant başına düşen ortalama gövde sayısı 2,52 (Şekil 3.35A), sıvı azot grubunda bu değer 2,73’

tür (Şekil 3.35B-E). Ayrıca sıvı azot grubunda 15 dakikalık PVS2 uygulaması da olumlu sonuç vermiştir (% 22 canlılık ve rejenerasyon) fakat bu uygulama sonucunda eksplant başına ortalama gövde sayısı (1) ve buna bağlı hesaplanan gövde oluşturma kapasitesi düşüktür (0,2).

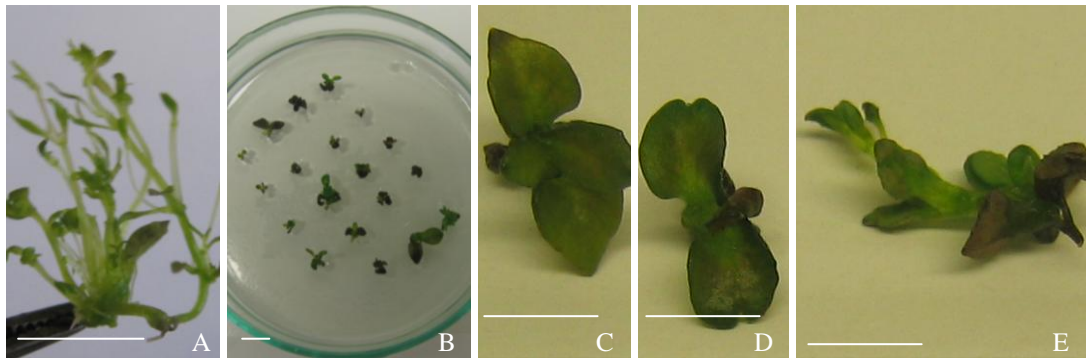
Çizelge 3.35. *Thymus cariensis* droplet-vitrifikasyon tekniğiyle kriyoprezervasyon kontrol ve sıvı azot sonuçları.

PVS 2 uygulama süresi	% Canlılık	% Rejenerasyon	Ortalama gövde sayısı (no \pm s.h) ^a	Ortalama gövde uzunluğu (cm \pm s.h) ^a	G.O.K ^b
Kontrol					
15	25c	25bc	1,0 \pm 0,00c	0,40 \pm 0,00b	0,3
30	60a	60a	2,0 \pm 0,37ab	0,41 \pm 0,06b	1,2
45	0,0e	0,0e	-	-	-
60	0,0e	0,0e	-	-	-
75	33b	33b	2,0 \pm 0,45ab	0,34 \pm 0,02c	0,7
90	65a	60a	2,5 \pm 0,21a	0,39 \pm 0,01bc	1,5
105	60a	60a	2,0 \pm 0,38ab	0,44 \pm 0,01ab	1,2
120	33b	33b	1,0 \pm 0,00c	0,30 \pm 0,00c	0,3
SA (+)^c					
15	22,2c	22,2c	1,0 \pm 0,00c	0,30 \pm 0,0c	0,2
30	9,1d	9,1d	1,5 \pm 0,14bc	0,3 \pm 0,0c	0,1
45	0,0e	0,0e	-	-	-
60	0,0e	0,0e	-	-	-
75	0,0e	0,0e	-	-	-
90	20cd	18,3cd	2,73 \pm 0,43a	0,53 \pm 0,03a	0,5
105	0,0e	0,0e	-	-	-
120	0,0e	0,0e	-	-	-

^aSH: Standart hata, İstatistiksel analizler χ^2 testi ve ANOVA ile gerçekleştirildi. (LSD test, $P \leq 0,05$)

^bG.O.K: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi (Rejenerasyon oranı x ortalama gövde sayısı / 100).

^cSA (+): Sıvı azot grubu örnekler.



Şekil 3.35. *Thymus cariensis* bitkisinin 90 dakikalık PVS2 uygulaması ile damlacık dondurma tekniği kullanılarak kriyoprezervasyonu, (A) kontrol; (B-E) sıvı azot grubuna ait eksplantlerden elde edilen gövdeler (Barlar 1cm).

4. TARTIŞMA

Florsilva (Bologna, İtalya)'dan temin edilen *Thymus vulgaris* tohumlarının dekontaminasyonunda, Özudoğru ve arkadaşları (2005) tarafından yerfistığı tohumlarının dekontaminasyonu için geliştirilmiş olan yöntem (%70 etanol, 5 dakika; %10 H₂O₂, 5 dakika; %20 Domestos (ticari çamaşır suyu), 15 dakika; her bir uygulamanın ardından dekontamine distile su ile 3 kez yıkama) denendi ve yarı-katı MS.0 besiyerine aktarılan tohumlardan %100 oranında dekontaminasyon ve %79,75 oranında çimlenme sağlandı. Erdağ ve Yürekli tarafından 2000 yılında *T. sipyleus* Boiss. tohumlarının dekontaminasyonu için kullanılan yöntemde başlangıçta 3 kez distile suyla yıkanan tohumlar, %4,5 sodyum hipoklorit çözeltisi ile 10 dakika ve %70 etanol çözeltisi ile 10 dakika muamele edilmiştir. Dekontaminasyonu sağlanan tohumlar, bitkinin doğal ortamdaki toprak şartlarına göre modifiye edilen MS1 (standart MS besiyerinden farkı, 2000 mg/l NH₄NO₃; 510 mg/l Na₃PO₄; 220 mg/l CaCl₂.2H₂O; 17 mg/l MnSO₄.4H₂O) ve MS2 (standart MS'ten farkı, 2000 mg/l NH₄NO₃; 340 mg/l Na₃PO₄; 660 mg/l CaCl₂.2H₂O; 17 mg/l MnSO₄.4H₂O) besiyerlerine aktarılmıştır (Standart MS: NH₄NO₃ 1650 mg/l; CaCl₂.2H₂O 440 mg/l; MnSO₄ . 4H₂O 22.3 mg/l). MS1'e aktarılan tohumlardan %1, MS2'ye aktarılan tohumlardan %26 oranında çimlenme sağlanmıştır. Fraternalle ve arkadaşları tarafından 2003 yılında yapılan bir çalışmada ise *T. mastichina* tohumları %50' lik etanol ile yüzey dekontamineizasyonunu takiben %0,1' lik HgCl₂ ile 10 dakika muamele edilmiş, 5 dakika dekontamine distile su ile yıkandıktan sonra dekontamine filtre kağıtları ile fazla suyu alınıp yarı-katı MS besiyerine aktarmışlardır. Beş hafta sonra çimlenen bitkiciklerden izole edilen gövde uçları çalışmada eksplant olarak kullanmıştır. Saez ve arkadaşları tarafından 1994 yılında yapılan bir çalışmada da *T. piperella* tohumları kullanılmış ve tohumlar birkaç damla Tween 20 içeren distile suda 5 dakika bekletildikten sonra, %7' lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 20 dakika yıkayıp distile su ile durulanmış, daha sonra % 70' lik etanolde 5 dakika tutulmuştur. Uygulamanın ardından 5, 10 ve 15 dakika dekontamine distile suyla yıkandıktan sonra, tohumlar çeşitli oranlarda oksin ve sitokininleri (BA, KIN, IAA, NAA) içeren CMS besiyerinde (Collet, 1985; sukroz içermeyen ve 6 g/l Difco Bacto-agar ile katılaştırılmış olan besiyeri, MS besiyerinden farklı olarak NH₄NO₃, KH₂PO₄ ve CaCl₂ tuzlarının yerine NH₄H₂PO₄ ve Ca(NO₃)₂; %50 oranında azaltılmış KNO₃ ve MgSO₄; %60 oranında azaltılmış FeNaEDTA içerir) çimlenmeye alınmıştır.

Çimlenen tohumlardan izole edilen gövde ucu eksplantları, bitkinin mikroçoğaltımı ve köklenmesinin optimizasyonu için kullanılmıştır. Çalışmadaki en iyi sonuç, eksplant başına 5,1 gövde sayısı ile 6,6 μM BA ve 2,8 μM IAA içeren besiyerinde elde edilmiştir. Yukarıda bahsedilen kekik tohumlarının dekontaminasyonuna yönelik yöntemlerinin ortak noktaları, uygulama süreleri ve derişimleri farklı olmakla birlikte, hemen her yöntemde etil alkol ve sodyum hipoklorit kullanılmasıdır. Tohum dekontaminasyon yönteminin uygulama şekli, eksplantın çözeltilerle muamele süresi ve çözeltilinin derişimi eksplantın çeşidine ve alındığı kaynağa bağlı (tohumun alındığı ana bitkinin bulunduğu ortamın nemi, sıcaklığı, bitki gövdesinin toprağa mesafesi vb.) olduğu gibi, çalışma yapan kişinin tercihinde de bağlı olduğu söylenebilir.

Olgun *T. longicaulis* ve *T. cariensis* bitkilerinden elde edilen eksplantların dekontaminasyonunda da *T. vulgaris* tohumlarının dekontaminasyonunda kullanılan etil alkol ve ticari çamaşır suyu (domestos) kullanılmıştır. Tohum dekontaminasyonu sırasında, örnekler yüzey dekontamineizasyonu için %70' lik etil alkol ile 5 dakika mumele edilmiş, olgun materyalin dekontaminasyonu sırasında ise örnekler sadece alkole batırılıp çıkarılmış ve dekontamine filtre kağıdı üzerinde kurutulmuştur. Tohum kabuğu endosperm ve embriyonun %70' lik alkol içerisinde dehidrate olmasını engeller, fakat gövde ucu ve nodal eksplantler doğrudan alkole maruz kaldıklarından daha çabuk dehidrate olup hasar görebilmektedir (özellikle yumuşak dokuya sahip ve otsu bitkiler için), bu nedenle eksplantler alkol ile kısa süreli muamele edildiler. Aynı şekilde tohum dekontaminasyonunda %20 gibi yüksek olan çamaşır suyu derişimi kullanılırken, olgun materyal için denenecek olan oran en fazla %4 olarak belirlenmiş ve %2,5' in üzerindeki çamaşır suyu derişiminin esplantler üzerinde toksik etki yaptığı gözlenmiştir. Eksplantler üzerinde %1 ile %4 arasında farklı derişimlerdeki çamaşır suyu çözeltisi, 30 ve 60 dakikalık periyotlarda denenmiştir. Denemelerde en iyi sonucu gövde ucu eksplantları vermiştir. Gövde ucu eksplanlarının nodal eksplantlara oranla dekontaminasyonda daha başarılı sonuç vermesinin nedeni, gövde ucu eksplantlarının görece topraktan daha uzakta bulunması, dolayısıyla daha az kontaminasyon içermesi olabilir. Optimize edilen dekontamineizasyon yöntemi ile en başarılı sonuçlar %1,5' lik çamaşır suyu ile 60 dakika, %2,5' lik çamaşır suyu ile 30 dakika uygulamaları ile elde edilmiştir. Bu

uygulamalarla *T. longicaulis* bitkisinde sırasıyla %59 ve %29 rejenerasyon oranı elde edilirken, aynı yöntem *T. cariensis* bitkisinde denendiğinde %51 ve %66 rejenerasyon oranı sağlamıştır. Canlılık ve rejenerasyon oranları, takip eden alt kültür aşamalarında artış göstermiştir. Casado ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan bir çalışmada, *Lamiaceae* ailesine ait *Santolina canescens* Lagasca bitkisine ait olgun materyalden alınan gövde ucu eksplantları, 20 damla Tween 20 damlatılan %1,2' lik sodyum hipoklorit çözeltisi ile 15 dakika muamele edildikten sonra üç kez 5'er dakika dekontamine distile su ile durulanıp çeşitli derişimlerde BA içeren yarıkatı MS besiyerlerine aktarılmıştır. Dört haftalık kültür periyodu sonunda hiçbir bulaş görülmediği ve tüm eksplantların canlılığını koruduğu belirlenmiştir. Erdağ ve Yürekli tarafından 2000 yılında *T. sipyleus* Boiss. tohumlarının yanısıra, yaprak ve yaprak sapından aldıkları yaklaşık 1 cm' lik eksplantların dekontaminasyonu için kullandıkları yöntemde, içine 1 damla Tween 20 damlattıkları %10' luk sodyum hipoklorit çözeltisiyle bitki parçalarını 8, 9 ve 10 dakika muamele etmişler ve 0,4 mg/l NAA ve 3 mg/l BA içeren MS besiyerinde %100 oranında kallus elde etmişlerdir. 2006 yılında Khan ve arkadaşları tarafından, *Kalanchoe tomentosa* bitkisinden alınan gövde uçları, öncelikle musluk suyunda yıkanıp ardından %0,1' lik merkürük klorit solüsyonuna daldırılarak dekontamine edilmiştir. Çalışmada merkürük klorit solüsyonuna yüzey gerilimini indirgemek için 1-2 damla Tween 20 damlatılmış ve gövde ucu eksplantları 3-4 dakika bu çözeltiyle muamele edilmiş, daha sonra dekontamine distile su ile 5 dakika durulanmıştır. Araştırmacılar bu şekilde 4 haftalık alt kültür periyodunun ardından %95' ten fazla oranda başarı elde etmişlerdir. Bu denemede başlangıç materyalinin yalnızca %3'ünde bakteri bulaşı görülmüştür. Otsu ve yumuşak dokuya sahip olan bitkilerden alınan eksplantların dekontamineizasyonunda, dokunun hasar görebilme ihtimalini ortadan kaldırmak amacıyla dekontaminasyon sırasında kullanılan çözelti derişimleri ve uygulama süreleri önem taşır. Yüksek derişimde uygulanan dekontaminasyon çözeltisi bitki dokusuyla doğrudan etkileşimde olacağından, dekontaminasyon sonrası rejenerasyon ve hatta canlılığı olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle çalışılacak olan her bitki türü ya da grubu için, temelde benzer çözeltiler kullanılsa bile, çözelti derişimi ve uygulama süresi gibi faktörlerin optimize edilmesi gerekir.

T. vulgaris bitkisinde en uygun rejenerasyon besiyerinin belirlenmesi için ilk olarak, hücre bölünmesinin uyarılması ve yan sürgün dormansisinin kırılması (Krikorian, 1995) gibi iki önemli görevi yerine getiren sitokinin bitki büyüme düzenleyicilerinden benzil adenin (BA), kinetin (KIN) ve thidiazuron (TDZ) farklı derişimlerde yarı-katı MS besiyerine eklenerek denendi. Bunlardan en yaygın olarak kullanılan BA ve KIN purin halkasına sahip olan sentetik sitokinin bitki büyüme düzenleyicileridir. Farklı derişimlerde kullanılan BA ile *T. vulgaris* gövde ucu eksplantlarında %41,6 ile %65, nodal eksplantlarda %15 ile %45 arasında değişen rejenerasyon oranları elde edildi. Gövde ucu ve nodal eksplantların rejenerasyonunda görülen bu farklılıktan dolayı çalışmaya en iyi sonucu veren gövde ucu eksplantlarıyla devam edildi. Yine benzer şekilde farklı derişimlerde denenen TDZ ve KIN bitki büyüme düzenleyicilerinde ise sırasıyla % 45 ile %61,7 ve %20 ile %85 arasında değişen rejenerasyon oranları elde edildi.

Hücre bölünmesi, hücresel döngünün farklı aşamalarında etkili olan sitokinin ve oksin bitki büyüme düzenleyicilerinin birlikte bulunmasıyla düzenlenir. Oksinler DNA replikasyonunda etkin olurken, sitokininler mitozun gerçekleşmesini sağlayan bazı olayların kontrolünde rol oynar (Vesely ve ark., 1994). Bu nedenle kültürlerdeki oksin ve sitokinin konsantrasyonları kontrollü ve dengeli olmalıdır. Bu amaca yönelik, farklı derişimlerdeki (0.01, 0.05, 0.1, ve 1 mg/l) çeşitli oksinler (IBA; IAA; NAA; 2,4-D) *T. vulgaris* bitkisinde, bir önceki denemede en iyi sonucu veren 1 mg/l KIN içeren yarı-katı MS besiyerine eklenerek, bitkisinin rejenerasyon ve gövde oluşturma kapasiteleri üzerine etkileri incelendi.

Gibberelinler, çiçeklenmeyi, tohum çimlenmesini, hücre bölünmesini ve uzamasını artırarak bitkinin boyca büyümesini düzenlerler. Bazı gibberelinler, bitki türüne bağlı olarak değişmekle birlikte, bazı özgün enzimlerin sentezini ve aktivitesini artırır veya azaltırlar [örneğin alevron (bitkisel protein kristali) hidrolitik enzim düzeyinin artırılması gibi]. Gibberelik asitler bitki doku kültürü ortamına eklendiklerinde, kök, sürgün ya da somatik embriyoların formasyonunu indirger ya da engeller fakat tam tersi etki de yapabilir (Brock ve Kaufman, 1991). Gibberelinlerin yan kök ve sürgün oluşumunun gerçekleştirilmesi ya da

engellenmesine neden olan bazı farklılıklar, gibberelinlerin meristematik başlangıcı inhibe etmelerinden dolayıdır (Thorpe ve Murashige, 1970), fakat öncül formdaki organların büyüme ve gelişmesi için gibberelinlerin yardımına gereksinim duyulur. Meristem ve sürgün kültürlerinde sürgün gelişimi gibberelinlerin eklenmesiyle artırılabilir (Fry ve Street, 1980). *T. vulgaris* bitkisinin *in vitro* ortamda sürgün gelişimini artırmak için, bitkiden alınan gövde ucu eksplantları, 1 mg/l KIN, veya 1 mg/l KIN ve 0,1 mg/l NAA içeren yarı-katı MS besiyerine çeşitli derişimlerde gibberelik asit (GA₃) eklenerek kültürlenmiştir.

Brassica campestris (Chi ve Pua, 1989), *Capsicum annuum* (Hyde ve Phillips, 1996), *Chicorium intybus* (Bais ve ark., 2000) ve *Vanilla planifolia* (Giridhar ve ark., 2001) gibi bazı otsu bitkilerin *in vitro* çoğaltımında, sürgün gelişimi ve çoğaltılması amacıyla gümüş nitrat (AgNO₃) kullanılmıştır. AgNO₃, etilen biyosentezini düzenler, baskılar ya da etilenin etkisini önler, AgNO₃ etkisi bitki türüne göre değişiklik gösterebilir (Ozudogru ve ark., 2005). Meyve olgunlaşması, çiçeklenme ve yaprak absisyonu gibi olayların düzenlenmesinde görev alan etilen gazı, ortamda yüksek derişimlerde bulunduğunda, mikrotübül ve mikroflament yerleşimini değiştirerek hücre uzamasını baskılayıp, hücrenin genişlemesine yol açar (Apelbaum ve Burg, 1971; Steen ve Chadwick, 1981). Ayrıca etilen gazı, *in vitro* kültürlerde, alt kültür zamanına bağlı olarak, büyüme ve organogenezi uyarabilir ya da baskılayabilir (Huxter ve ark., 1981) *T. vulgaris* bitkisi üzerinde AgNO₃ etkisi, 1 mg/l KIN ve 1 mg/l KIN ile 0,1 mg/l NAA içeren besiyerlerine çeşitli derişimlerde (1; 2; 4; 6 ve 8 mg/l) eklenmesi yoluyla test edilmiştir. Sadece 1 mg/l KIN ve çeşitli derişimlerde AgNO₃ içeren yarı-katı MS besiyerlerinde elde edilen rejenerasyon oranı (%83,3-98,3), 1 mg/l KIN ve 0,1 mg/l NAA ile çeşitli derişimlerde AgNO₃ içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edilen sonuçlardan (%28,3-55) oldukça yüksektir. Burada görülen düşük rejenerasyon oranınının, bir oksin olan NAA tarafından, ortamda mevcut olan AgNO₃'ın tolere edebileceğinden daha yüksek oranda etilen biyosentezini teşvik etmiş olabileceği düşünülebilir. Etilen, her bitkide bulunabilen bir bitki büyüme düzenleyicisi olarak bilinir ve bitkinin büyüme ve gelişmesine etki eder (Yang, 1985; Yang ve Hoffman, 1984). *In vitro* çalışmalarda etilen, kallus oluşumu, sürgün rejenerasyonu ve *in vitro* somatik embriyogenezi teşvik eder (Roustan ve ark., 1990). Bu nedenle etilen

üretimini ya da etilen etkinliğinin düzenlenmesiyle, bazı doku kültürlerinin büyüme ve gelişmesi bir dereceye kadar kontrol edilebilir (Giridhar ve ark., 2003). $AgNO_3$ etilen aktivitesini inhibe edici olarak bilinir (Beyer, 1976a). Gümüş iyonları, çiçeklenme ve büyümenin yavaşlatılması, absisyon gibi klasik yanıtlarda, eksojen olarak uygulanan etilenin aktivitesini özgül olarak bloke eder. Bu bulgular $AgNO_3$ 'ün doku kültürü çalışmalarında kullanılmasına izin verir. Kültür ortamına $AgNO_3$ eklenmesi, dikotil ve monokotil bitki kültürlerinin her ikisinin rejenerasyonunda oldukça büyük bir artış sağlar (Beyer, 1976b).

Farklı derişimlerde ve kombinasyonlarda denenen çeşitli sitokinler, oksinler, gibberelik asit ve gümüş nitratın, rejenerasyon oranı, eksplant başına elde edilen ortalama gövde sayısı ve bu değerlere dayanarak hesaplanan gövde oluşturma kapasitesi indeksleri karşılaştırıldığında, *T. vulgaris* bitkisi için en uygun rejenerasyon besiyerinin 1 mg/l KIN ve 0,3 mg/l GA_3 içeren yarı-katı MS besiyeri olduğu görülmüştür. Bu besiyeri kompozisyonu daha sonra *T. longicaulis* ve *T. cariensis* bitkilerinin *in vitro* rejenerasyonu amacıyla da denenmiş ve sırasıyla %97,5 ve %95,7 oranında bitki rejenerasyonu, 3,1 ve 1,27 eksplant başına düşen ortalama gövde sayısı elde edilmiştir. 1999 yılında Mendes ve Romano *T. mastichina* bitkisinin *in vitro* çoğaltımında BA, KIN ve 2ip bitki büyüme düzenleyicilerini kullanmışlardır. En iyi sonuç 0,05 mg/l BA içeren modifiye CMS (Collet, 1985) besiyerinde (makro elementler ve demir CMS'ye, mikro elementler MS'e göre modifiye edilmiştir) elde edilmiştir. Bu çalışmada, eksplant başına düşen ortalama gövde sayısı 7,4, ortalama gövde boyu 1 cm olarak bulunmuştur. Saez ve arkadaşları tarafından 1994 yılında yapılan bir çalışmada *T. piperella* bitkisinin *in vitro* çoğaltımı için BA ve KIN sitokinin bitki büyüme düzenleyicileri ile NAA ve IAA oksin bitki büyüme düzenleyicilerini farklı derişimlerde ve kombinasyonlarda denemişler, en iyi sonucu 6,6 μM BA ve 2,8 μM IAA içeren yarı-katı CMS besiyerinde elde etmişlerdir. Bu çalışmada eksplant başına düşen gövde sayısı 5,1 olarak bulunmuştur. Sunulan tez çalışmasında ise, *T. vulgaris* bitkisinin *in vitro* rejenerasyonu için optimize edilen besiyerinde eksplant başına elde edilen gövde sayısı 8,64, ortalama gövde boyu 1,02 cm olarak belirlenmiştir.

Mikroçoğaltım yöntemlerinde son aşama *in vitro* çoğaltılan bitkilerin toprağa aktarılarak dış ortama adaptasyonunun sağlanmasıdır. İklimlendirilmesi gerçekleştirilemeyen bitkilerin mikroçoğaltım yöntemi başarısız kabul edilir. İklimlendirilmenin yapılabilmesi için bitkilerin toprakta canlılıklarını sürdürebilmeleri gerekir, bunun için de gelişmiş bir kök yapısının sağlanması büyük önem taşır. Bu amaca yönelik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan yöntem, ya hiçbir büyüme düzenleyicisi içermeyen ya da çeşitli derişimlerde oksin büyüme düzenleyicileri ile desteklenmiş besiyerine aktarılan gövdelerde köklenmenin teşvik edilmesidir. Oksinler hücre büyümesi, hücre duvarının asitleştirilmesi, hücre bölünmesinin başlaması, organize olmayan dokularda (kallus) ya da organlarda (genellikle kökler) meristem artışının organizasyonu ve vaskular dokuların farklılaşmasının teşvik edilmesinde güçlü bir etkiye sahiptirler. Ayrıca organize dokularda apikal dormansinin sürdürülmesi, kök formasyonunun düzenlenmesi gibi olaylarda önemli bir rol oynarlar (Gaspar ve ark., 1996). Doku kültürü çalışmalarında, diğer sentetik oksinlerden 2,4-D ve NAA yaygın olarak kullanılır. Sunulan tez çalışmasında, yukarıda bahsi geçen IBA, NAA, IAA ve 2,4-D oksin bitki büyüme düzenleyicilerinin köklenme üzerine etkileri, *T. vulgaris* bitkisinde test edilmiştir. *T. vulgaris* bitkisine ait gövdeler, yukarıda bahsedilen dört oksin çeşidinin farklı derişimlerini içeren yarı-katı MS besiyerinde köklenmeye alındı. En iyi sonuç %92,5 köklenme oranı, 17,15 gövde başına düşen ortalama kök sayısı ve bu verilere dayanılarak hesaplanan 15,86 kök oluşturma kapasitesi indeksiyle 0,05 mg/l 2,4-D içeren yarı-katı besiyerinde köklenen gövdelerden elde edildi. Ayrıca *T. vulgaris* için belirlenen en uygun köklenme besiyeri, *T. longicaulis* ve *T. cariensis* bitkilerinin *in vitro* köklenmesinde test edildiğinde, her iki kekik türünde de %100 oranında köklenme elde edilirken, gövde oluşturma kapasitesi indeksleri sırasıyla 11,95 ve 17,67 olarak hesaplandı. Gövde başına oluşan ortalama kök sayısının fazla olması, toprağa aktarılan bitki gövdelerinin ortama daha iyi adapte olarak başarılı bir şekilde iklimlendirilmesini sağlar. Dikkati çeken bir husus IBA, NAA ve IAA oksin bitki büyüme düzenleyicilerin besiyerindeki derişimleri artırıldığında köklenme üzerindeki etkilerinin de artmasıdır (örneğin, 0,01, 0,05, 0,1 ve 1 mg/l NAA içeren yarı-katı MS besiyerlerinde sırasıyla, 3,86, 6,71, 11,27 ve 15,02 kök oluşturma kapasitesi indeksi hesaplandı).

Bunlardan farklı olarak 2,4-D oksin büyüme düzenleyicisi içeren yarı-katı MS besiyerinde 0,05 mg/l derişim en yüksek sonucu verirken, 0,1 ve 1 mg/l derişimlerde sırasıyla 8,19 ve 0 (köklenmeye alınan gövdelerde kök oluşumu gözlenmedi ve gövdeler bir süre sonra canlılıklarını kaybetti) değerinde bir sonuç elde edildi. Bu sonuca dayanılarak, *T. vulgaris*' in köklenmesi için en başarılı sonucu veren 2,4-D' nin derişiminin 0,05 mg/l' den daha yüksek olduğunda toksik etkiye yol açtığı söylenebilir. Bazı moleküllerle konjuge olabilen oksinler, oksidatif yıkımdan korunurlar ve gerektiği zaman enzimatik olarak serbest kalabilirler. Örneğin indol asetik asit (IAA) şekerlerle konjuge olabilir (Cruciferae ailesi üyelerinde yaygındır). Sentetik IAA ve IBA (indol bütirik asit) bitki kültür besiyerlerinde yaygın olarak kullanılır. Bu oksinler besiyerinde denatüre olmaya eğilimlidirler ve bitki dokularında hızla metabolize olabilirler. Bu özellikleri, gelişme döneminde daha az oksine gereksinim duyulduğu evrelerde faydalı olabilir (örneğin köklenmede, Gaspar ve ark., 1994). Bu bilgiler ışığında, besiyerinde bulunan 2.4-D oksin bitki büyüme düzenleyicisinin ortamda herhangi bir molekülle konjuge olamadığı ve artırılan miktarlarının köklenme ve bitki gelişimi üzerinde baskı oluşturabileceği sonucuna varılabilir.

In vitro köklendirilen *T. vulgaris*, *T. longicaulis* ve *T. cariensis* bitkileri toprağa aktararak iklimlendirilmişlerdir. Bitkiler *in vitro*' da aseptik şartlarda ve yüksek oranda neme sahip bir ortamdadır. Bu nedenle köklendirilen bitkiler, ortamda olabilecek patojen mantar ve bakteri gibi tehditleri uzaklaştırmak amacıyla otoklav edilerek dekontamine edilen toprağa aktarıldı. *In vitro* şartlarda çoğaltılmış olan bitkilerde, kültür ortamındaki yüksek nem içeriği nedeniyle stomalar sürekli açık olduğundan, iklimlendirme sırasında dış ortamdaki düşük nem içeriğinden olumsuz etkilenmemesi amacıyla, bitkinin dış koşullara yavaş yavaş adapte olması için saksıların üstü şeffaf plastik ile kapatıldı ve belli periyotlarda üzerine delikler açılarak ortama adaptasyonu sağlandı. 2 hafta sonunda üzeri tamamen açılan saksılarda bulunan her üç kekik türünün başarıyla bir şekilde toprağa adapte olduğu görüldü.

Mendes ve Romano 1999 yılında, *T. mastichina* bitkisinden aldıkları 2 cm uzunluğunda tekli gövdelerin *in vitro* köklenmesi için, 1 mg/l derişimde IAA, IBA ve NAA oksin bitki büyüme düzenleyicisi içeren yarı-katı CMS besiyeri kullanmışlardır. Çalışmada en iyi sonuç 1 mg/l NAA içeren besiyerine aktarılan gövdelerden elde edilmiştir (%100 köklenme oranı, gövde başına ortalama 25,6 kök). 2006 yılında Iapichino ve arkadaşları tarafından *T. capitatus*, *T. serpyllum* L. ve *T. vulgaris* L., bitkilerinden 10 cm uzunluğunda kesilen yumuşak gövdeleri 500 ppm IBA içeren solüsyona (% 90 etanolde çözülüp, son derişimi %20 etanol: %80 distile su (v/v)) 30 saniye daldırılıp plastik saksılara aktarmışlardır. 4 hafta sonra sırasıyla, %94,3, %93 ve %80 köklenme oranı, 14,3, 4,9 ve 2,4 gövde başına ortalama kök sayısı elde etmişlerdir. Saez ve arkadaşları tarafından 1994 yılında *in vitro* çoğaltılan *T. piperella* bitkisinden alınan gövdelerin köklenmesi için farklı derişimlerde IAA ve NAA içeren yarı-katı CMS besiyeri kullanılmış ve en iyi sonuç 2,8 µM IAA içeren besiyerinde elde edilmiştir. Bu besiyerinde köklendirilen bitkilerin %71' i başarılı bir şekilde iklimlendirilmiştir.

Gövde ucu ya da nodal segmentler kullanılarak yapılan mikropropagasyon tekniğinin, 15 alt kültür sonunda bir eksplantten yaklaşık 10^5 bitki eldesine imkan verebilen bir teknik olduğu belirlenmiştir (George ve Ravishankar, 1997). *In vitro* şartlarda gelişen bitkilerin rejenerasyonu, nod ve gövde ucu gibi, öncü meristemlerin bulunduğu bitki kısımlarından sağlandığında, *in vitro* koşullarda, hücre bölünmesi ve farklılaşması sırasında genetik kararlılığın sürdürülebildiği bilinir (Ostry ve ark., 1994), bununla birlikte *in vitro* uygulamalar sırasında genetik değişikliğe yol açabilecek risklerin varlığı da göz ardı edilmemelidir (örneğin, eksplant ve bitkilerin maruz kaldığı stres, oksin ve sitokinin oranları, ortam koşulları, Modgil ve ark., 2005). Bu değişiklikler isteğe bağlı gerçekleşmez, sıklıkla kalıtsaldır ve *in vitro* şartlarda çoğaltılan bitkilerin tümüne yayılabilir (Breiman ve ark., 1987). DNA düzeyinde gerçekleşen bu değişikliklerin belirlenmesinde kullanılan çok sayıda moleküler belirteç vardır. RAPD bu tekniklerden en yaygın olarak kullanılan moleküler belirteçtir. Az miktarda genomik DNA gereksinimi, dizi ön bilgisine ihtiyaç duyulmaması, radyoaktif uygulama gerektirmemesi ve bilginin hızlı ve kolay transferinin sağlanmasıyla diğer metotlara görece üstünlük sağlar (Williams ve ark., 1990). RAPD tekniğinin tekrarlanabilirliği, deney koşullarının optimizasyonu

sağlanabilir. Bu durum, tez çalışması kapsamında her bir primer ile yapılan tekraralarda benzer bant profilleri elde edilmesiyle de doğrulanmıştır. Literatürde, mikroçoğaltılan bitkilerde genetik değişikliklerin olduğuna dair çalışmaların yanısıra, genetik kararlılığın sürdürülebilirliğine dair de pek çok çalışma bulunmaktadır. 2002 yılında Palombi ve arkadaşları tarafından *Actinidia deliciosa* A. Chev. (Kivi) bitkisine ait *in vitro* büyütülen bitkilerde genetik kararlılık RAPD PCR tekniği ile incelenmiştir. 1 mg/l BA içeren yarı-katı MS besiyerinde 12 kez alt kültürlenen bitkilerle anaç bitkinin 10 adet primer kullanılarak genetik kararlılıklarının karşılaştırıldığı çalışmada %55 oranında polimorfizm belirlenmiştir. 1997 yılında Hashmi ve arkadaşları *in vitro* çoğaltılan *Prunus persica* L. (şeftali) bitkisinin genetik kararlılığını RAPD belirteçleri kullanarak analiz etmişlerdir. Çalışmada anaç bitki ile *in vitro* çoğaltılan bitki örnekleri 60 adet primer kullanılarak karşılaştırılmış ve primerlerden yalnızca 10 tanesinde polimorfik bant elde edilmiştir.

1998 yılında Rout ve arkadaşları tarafından *Zingiber officinales* Rosc. bitkisi, 4 mg/l BA, 1 mg/l IAA ve 100 mg/l adenin sülfat içeren yarı-katı MS besiyerinde 8 haftalık periyotlarda alt kültürlenerek gövdeler elde edilmiş, ardından köklendirilerek iklimlendirilmiştir. Araştırmacılar toprağa aktarılan iki haftalık bitki örneklerini RAPD belirteçleri kullanarak anaç bitkiyle karşılaştırmışlar ve elde edilen PCR ürünlerinden hiç birinde polimorfizm belirlememişlerdir. Venkatachalam ve arkadaşları 2007 yılında *Musa* sp. (muz) bitkisinin, yüksek oranda bitki büyüme düzenleyicileri içeren (örneğin, 53,28 µM BA 55,8 µM KIN gibi) farklı periyotlarda (örneğin, 3 hafta; 3 haftalık periyotlarda 3 alt kültür; 4 haftalık periyotlarda 4 alt kültür gibi) *in vitro* çoğaltılan sürgünlerinde genetik kararlılığı RAPD belirteçleriyle incelemişlerdir. 50 adet RAPD primerinin kullanıldığı çalışmada anaç bitkiyle karşılaştırılan örneklerden elde edilen PCR ürünlerinin hiç birinde polimorfik bant gözlenmemiştir. Peredo ve arkadaşları 2009 yılında *Humulus lupulus* L. (şerbetçiotu) bitkisinin 2 yıllık *in vitro* kültürlerini RAPD belirteçleri kullanarak karşılaştırmışlardır. 1, 3, 9 ve 12. alt kültürlerden alınan 10 adet bitkiden özütlenen genomik DNA örnekleri, 13 adet RAPD primeri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen bantlar incelendiğinde, bitkilerde hiçbir polimorfizm görülmemiştir. Sunulan tez çalışmasında da, *in vitro* şartlarda çoğaltılan *T. vulgaris* bitkisine ait 0 (klon bitkilerin elde edilmesinde anaç bitki olarak kullanılan, *in vitro* şartlarda çimlendirilen kekik

fidesi), 2, 4, 6, 8, ve 10. alt kültürlerden elde edilen örnekler, rastgele seçilmiş 20 adet 10 bazlık primer kullanılarak RAPD PCR ile amplifiye edilmiştir. Test edilen 20 primerden 19' u ile toplam 229 bant elde edilmiş, primerlerden birinde yapılan her iki tekrarda da hiçbir bant elde edilmemiştir. Elde edilen bantların büyüklükleri 770 ile 3450 bp arasında değişmektedir. Ayrıca her bir primerden, primer başına 4 ile 21 arasında değişen, ortalama 12 bant elde edilmiştir. Karşılaştırılan örneklerin hiç birisinde polimorfizm gözlenmemiştir.

Bazı olgun bitki hücre, doku ve organların korunmasına yönelik yöntemler, monoklonal kültürlerin ya da seçilen genotiplerin ileri aşamada germplazmalarının korunması için gereklidir. Kültürleri saklamaya yönelik pek çok yaklaşım, deney materyalinin türe özgü karakteristik özelliklerinin kararlılığını sürdürmeyi ve altkültürler sırasında karşılaşılabilecek riskleri (kontaminasyon, kültürlerin dejenerasyonu gibi) en aza indirmeyi hedefler. Germplazma koleksiyonlarını korumaya yönelik iki biyoteknolojik yaklaşım, geleneksel yöntemlere tamamlayıcı olarak, özellikle dikkat çekmektedir; orta dereceli saklama ve kriyoprezervasyon (Scowcroft, 1984). Orta dereceli saklama, bitki dokularını, bitki türüne bağlı olarak, birkaç ay ile birkaç yıl arasında saklamaya yönelik yapılan çalışmalardır. Geleneksel yöntemlerle korunması mümkün olmayan (saklamaya elverişsiz tohuma sahip olma gibi) değerli bitki germplazmalarının korunmasını mümkün kılar. Ayrıca orta dereceli saklama vejetatif olarak çoğaltılan (klon) değerli bitkilerin karakteristik özelliklerinin en yüksek oranda korunarak saklanmasına imkan tanır (tohum alındığı bitkiden farklı karakteristik özellik gösterebilir). Orta dereceli saklama (yavaşlatılmış büyüme) terimi, bitkinin büyütüldüğü ortam şartlarını modifiye edilmesi yoluyla büyümenin sınırlandırılması ve mümkün olan en az seviyeye indirilmesi anlamında kullanılır. Orta dereceli saklamada, minimum düzeyde büyüme koşullarının sağlanması için, sukroz ya da mannitol ile osmatik stresin ayarlanması (Westcott, 1981), sıcaklık ve/veya ışık şiddetinin azaltılması (Withers, 1991), büyümeyi en alt düzeye indireyecek kültürlerin kurulması (Engelmann, 1997; Gupta, 2001; Mandal, 1995) gibi bazı yöntemler kullanılmaktadır. Çalışmamızda *T. vulgaris* bitkisinin *in vitro* rejenerasyonu için optimize edilen besiyerine aktarılan gövdeler +4°C' ta ve karanlıkta 12 ay süre ile başarılı bir şekilde saklanmışlardır. Çalışmada ilk 5 aylık süreçte bitkilerde canlılık oranı %100' dür. Bu oran 12 aylık gövdelerde %36,8, 13 aylık gövdelerde %25,3'e düşmüştür. Bununla birlikte, 12 ay saklanan gövdelerden

alınan gövde ucu eksplantlarının taze besiyerine aktarılarak 4 hafta süreyle standart kültür şartlarında (23°C sıcaklık, 16/8 saat fotoperiyot) kültürlenmesi sonucu elde edilen rejenerasyon oranı %78,3 iken bu oranın 13. ayda %3,3'e düştüğü görülmektedir. Bu sonuçlara dayanarak, normal alt kültür koşullarına 3-4 hafta dayanabilen (kültüre alınan bitkilerin büyüme ve gelişmesi sırasında, metabolik aktivitelerinin bir sonucu olarak kültür kabı içinde biriken gaz kompozisyonu ve besiyerine salınan fenolik bileşenler, ayrıca besiyeri kompozisyonunun içerdiği minerallerin bitkiler tarafından özütlenerek tükenmesi nedeniyle) *T. vulgaris* bitkisinin, 1 mg/l KIN ve 0,3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerinde, +4°C' ta ve karanlık ortamda 12 ay kadar saklanabileceği söylenebilir. Hassan ve arkadaşları 2007 yılında *Allium sativum* L. (sarımsak) bitkisini 0,1, 0,2 ve 0,4 M sorbitol ya da sukrozlu besiyerinde +4°C' ta, karanlıkta 18 ay saklamışlardır. 18 ay sonra %100 canlılık ve geri kazanım elde etmişlerdir. Bekheet 2007 yılında *Cynara scolymus* L (enginar) bitkisini 2 mg/l BA ve 5 mg/l NAA içeren yarı-katı MS besiyerinde 5°C' ta ve karanlık ortamda 12 ay kadar başarılı bir şekilde saklayabilmiştir. 2001 yılında Negash ve arkadaşları tarafından Musaceae ailesine ait enset bitkisinin üç çeşidini 10 µM BA, %0,1 ya da %2 derişimlerde mannitol içeren yarı-katı MS besiyerinde 15 ve 18°C' ta (16 saat aydınlık/8 saat karanlık) 6 ay başarı ile saklamışlardır. Gonçalves ve arkadaşları 2007 yılında *Drosophyllum lusitanicum* (L.) bitkisini 60 g/l sukroz ve 0,91 µM zeatin bitki büyüme düzenleyicisi içeren yarı-katı MS besiyerinde +5 °C' ta 8 ay başarıyla saklayabilmişlerdir.

Kriyoprezervasyonun, bitki mataryallerinin uzun süreli saklanması için etkili yöntem olduğu bilinmektedir. Bitki dokularının kriyoprezervasyonu için, yavaş soğutma, vitrifikasyon, enkapsülasyon-dehidratasyon, damlacık-dondurma gibi bir dizi farklı yöntem kullanılmaktadır ve her yöntemin kendine özgü üstünlükleri ve sınırlılıkları bulunmaktadır (Scottez ve ark., 1992). Kriyoprezervasyon tekniğinin etkinliğini arttırmak ve kriyoprezerve edilecek bitki dokularında olası kriyohasarlara engellemek amacıyla, dokular kriyoprezervasyon tekniği öncesi bir takım uygulamalarla kriyoprezervasyona hazırlanır. Eksplantların soğuğa alıştırılması, ozmotik aktif kimyasallarla kültürlenmek ve stres önleyici ajanların kullanımı, eksplantların kriyodehidratasyonuna hazırlık için önemli adımlardan bazılarıdır. Soğuğa alıştırma aşaması, ılıman ve tropik iklimlerde yaşayan bitkilerin

kriyoprezervasyon sonrasında hem canlılık (Sakai 1960; Sakai ve Nishiyama, 1978) hem de rejenerasyonun artması açısından çok etkili olmuştur (Reed, 1988). Önkültür aşamaları odunsu ve otsu bitkilerde farklılık göstermektedir. Odunsu bitkilerde, +4-5 °C koşullarında 3 haftalık önkültür süreci, elma ve armut gibi bitkilerde sıvı azot sonrasında canlılığı arttıran bir etken olarak rapor edilmiştir (Niino ve ark., 1992a, b). Otsu bitkilerde ise, sadece ozmotik aktif şekerler ile yapılan önkültürleme süreçleri rahatlıkla kullanılabilir. Önkültür sürecinin, şeker ve şeker alkolleri gibi endojen kriyoprotectorların hücre içinde birikimini teşvik ettiği ve membran kararlılığını arttırdığı da bildirilmiştir (Crowe ve ark., 1984a, b). *T. vulgaris* bitkisinde kriyoprezervasyon öncesi soğuğa alıştırma ve sukroz ön kültür çalışmaları yapıldı. *T. vulgaris* bitkisi için en uygun soğuğa alıştırma periyodu 2 hafta (%100 rejenerasyon oranı; eksplant başına ortalama 6,95 gövde sayısı), en uygun sukroz önkültür uygulaması da 0,25M sukroz içeren yarı-katı MS.0 besiyerinde 48 saat inkübasyon (%98,33 rejenerasyon oranı; eksplant başına ortalama 10,2 gövde sayısı) olarak belirlendi.

Ön koşullandırmanın ardından eksplantlar PVS2 vitrifikasyon ve enkapsülasyon-vitrifikasyon yöntemlerinde LS (kriyo koruyucu solüsyon) çözeltisi ile ozmorumaya tabi tutulurlar. LS çözeltisi, dokuların vitrifikasyon süreçlerine hazırlanmasında ozmorumuyucu olarak kullanılmaktadır. Bu çözeltinin dokulardaki, dehidratasyon ve soğuk toleransının arttırması açısından oldukça önemli olduğu çalışmalarla kanıtlanmıştır (Nishizawa ve ark. 1992; Sakai ve ark. 1991). Bu adımda hücrelerde vitrifikasyon solüsyonlarının neden olacağı hasarların engellenmesi ve dokuların dehidratasyona karşı dirençlerini arttırmak amaçlanmaktadır. Çünkü bazı otsu ve odunsu bitkilerde sadece şeker alkolleri kullanılarak yapılan önkültürleme uygulamaları kriyoprezervasyon sonrasında istenilen canlılığı sağlamamaktadır. Örneğin, LS kullanımıyla birlikte %50 PVS2 uygulanmasının wasabi bitkisinin gövde uçlarının sıvı azot sonrasındaki canlılıklarını arttırdığı görülmüştür (Matsumo ve ark. 1994). Dehidratasyon aşamasında LS çözeltisinden arındırılan eksplantlar farklı sürelerde ve farklı sıcaklıklarda (0°C - 25°C) 1-2 ml vitrifikasyon solüsyonlarıyla (PVS2 gibi) muamele edilirler. Ancak, bu süre içerisinde kriyoprotectorların toksik etkileri de göz ardı edilmemelidir. Bu nedenle vitrifikasyon çözeltilerinin eksplantlar üzerindeki uygulama süresi çok iyi optimize

edilmelidir. En uygun etkileşim süresi hem eksplantları sıvı azota girmeden vitrifiye edebilmeli hem de onların canlı kalmalarını sağlamalıdır. *T. vulgaris* bitkisinin vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyonunda, soğuğa alıştırma ve sukroz ön kültür aşamalarından sonra kriyoviallere alınan örnekler kriyo koruyucu solüsyonla (LS) muamele edilmişlerdir. LS' nin uzaklaştırılmasından sonra örnekler PVS2 ile belli sürelerde muamele edilip sıvı azota daldırıldı (kontrol grubu sıvı azota aktarılmadan rejenerasyon besiyerine alındı). Kontrol grubunda 75 dakika PVS2 çözeltisi ile muamele edilen gövde ucu eksplantlarından %76,7 canlılık ve rejenerasyon oranı elde edildi. 90 dakikaya kadar olan PVS2 uygulamalarında canlılık ve rejenerasyon oranları %50' nin üzerinde olduğu belirlendi. Bununla birlikte 105 ve 120 dakikalık uygulamalarda ise PVS2 çözeltisinin bitki için toksik etki gösterdiği gözlemlendi. *T. vulgaris* bitkisine ait gövde uçlarının PVS2 vitrifikasyonunun ardından sıvı azota aktarılan örneklerde ise en yüksek rejenerasyon oranı (%24,33) 15 dakika PVS2 uygulaması ile elde edildi. Eksplantların PVS2 ile inkübasyon süresi ve PVS2 uygulama sıcaklığının da sıvı azot sonrasında canlılık ve rejenerasyonu sağlayan önemli faktörler olduğu bilinmektedir (Matsumoto ve ark., 1994). PVS2 solüsyonu, içeriğindeki DMSO nedeniyle toksik bir etkiye sahiptir. 25°C' ta yapılan çalışmalarda, DMSO' nun hücrelere çok hızlı girişi nedeniyle, eksplantlardaki canlılığın hızlı bir şekilde kaybolduğu, ancak 0°C' ta uygulanan PVS2' nin ise canlılığı daha uzun süre koruduğu belirlenmiştir. Bu nedenle de 0°C'ta PVS2 uygulaması tercih edilmiştir. Sonuç olarak, kriyokoruyucu solüsyon olarak kullanılan PVS2 çözeltisinin, toksik bileşenleri nedeniyle bitkide 90 dakikanın üzerindeki uzun uygulama peryotlarında olumsuz sonuçlar ortaya koyabileceği düşünülebilir. Ayrıca PVS2 solüsyonun ortamdan uzaklaştırılması için kullanılan yoğun sukroz içerikli (1.2 M) sıvı MS.0 besiyerinin de bitkide aşırı dehidratasyon nedeniyle olumsuz etkiler ortaya koyabileceği de göz ardı edilmemesi gereken bir faktördür.

Enkapsülasyon-vitrifikasyon tekniğinde, sentetik tohum ve PVS2 vitrifikasyon tekniklerinin avantajlarını birleştirmek amacıyla geliştirilmiştir (Matsumoto ve Sakai, 1995). *T. vulgaris* bitkisinin enkapsülasyon-vitrifikasyon yöntemiyle kriyoprezervasyonunda, kontrol grubu ve sıvı azota daldırılan eksplantların geri kazanımı başarılı sonuçlar vermedi. Enkapsüle edilen örneklerden sadece PVS2 ile muamele edilmeyen kontrol grubunda %23,33 canlılık ve rejenerasyon elde edildi. Enkapsülasyon-vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyon

deneyinde canlılık ve rejenerasyon, 15, 30, 45 ve 60 dakika PVS2 ile muamele edilen setlerde sıfır olarak belirlendi. 75, 90, 105 ve 120 dakika PVS2 uygulamalarında ise oldukça düşük değerler elde edildi. Sıvı azota daldırılan örneklerde de sonuç olumsuz olmuştur. Sıvı azot uygulamasında ilgi çeken bir nokta ise 120 dakika PVS2 çözeltisiyle muamele edildikten sonra kriyoprezerve edilen örneklerde %11,67 oranında canlılık görülmesidir. Fakat rejenerasyon oldukça düşük olduğundan sonuç başarılıdır. Na-aljinat kapsül dayanıklılığı ve sertlik derecesi, Na-aljinat derişimi ve kalsiyum çözeltisi içindeki polimerizasyon süresinin optimize edilmesi yoluyla değiştirilebilir. Ancak burada dikkat edilmesi gereken nokta, sentetik tohumların sıvı azota aktarım sırasında bütünlüklerini koruyabilecek kadar sert ve dayanıklı, aynı zamanda kapsül içindeki eksplantın gelişip büyümesine izin verecek oranda yumuşak olmasının sağlanmasıdır. Diğer bir deyişle, Na-aljinat derişimi öyle optimize edilmelidir ki, hem tomurcukların gelişimine izin vermeli hem de sıvı azot sonrasında sentetik tohumun bütünlüğü bozulmamalıdır. Örneğin, Matsumato ve Sakai 1995 yılında, wasabi bitkisinin gövde ucu eksplantlarını sukroz ön kültür aşamasının ardından sodyum aljinat ile enkapsüle etmişlerdir. Kapsülleri LS uygulamasının ardından PVS2 çözeltisiyle 70 ile 100 dakika 100 rpm çalkalamalı inkübatörde muamele etmişlerdir. PVS2 uygulamasının ardından sıvı azot içerisine daldırılan örnekler çözme aşamasından sonra rejenerasyon besiyerine alınmıştır. Çalışmada enkapsülasyon-dehidratasyon yöntemine göre %30 daha fazla jenerasyon elde edilmiştir.

Sunulan tez çalışmasında üç farklı tek aşamalı dondurma tekniği kullanılarak *T. vulgaris* bitkisi kriyoprezerve edildi. Çalışmada en iyi sonuç damlacık dondurma tekniği kullanılarak yapılan kriyoprezervasyonda elde edildi. Teknik temel olarak vitrifikasyon yöntemleriyle aynıdır. Ancak diğer vitrifikasyon yöntemlerinden ayrılan en temel özelliği, eksplantların yaklaşık 3-5 mm x 10-15 mm alüminyum folyolar üzerinde bulunan yaklaşık 4 µl PVS2 damlacıklarının içerisine yerleştirilmesi esasına dayanmaktadır. Eksplantların 23°C' de veya 0°C' de belirli bir süre dehidratasyonunu takiben, folyoların, içlerine sıvı azot doldurulmuş kriyoviallere aktarılması ile gerçekleşir ve kriyoviallerin de sıvı azot tankına daldırılmasıyla kriyoprezervasyon tamamlanır. Çözme işlemi 1,2 M sukroz içeren besiyerinde 25°C' ta ultra hızlı bir şekilde gerçekleştirilir ve ardından eksplantlar rejenerasyon besiyerine aktarılır. Damlacık-dondurma ve vitrifikasyon tekniğinin en

önemli özelliği, geniş bir genotip aralığındaki bitkilere uygulanabilmesidir (Sakai ve Engelmann 2007). Teknik günümüzde en çok kullanılan kriyoprezervasyon yöntemlerinden birisidir. *T. vulgaris* bitkisinin damlacık-dondurma tekniği ile kriyoprezervasyonunda, kontrol grubunda 15, 30, 75 ve 90 dakikalık PVS2 uygulamalarında %70' in üzerinde rejenerasyon elde edilmiştir. 90 dakikalık PVS2 uygulaması %90,7 canlılık, %88,9 rejenerasyon oranı ve gövde başına düşen ortalama 20,3 gövde sayısı ile en iyi sonucu vermiştir. Damlacık dondurma tekniğinde sıvı azot grubunda da 90 dakikalık PVS2 uygulaması %85 canlılık oranı, %80 rejenerasyon oranı ve eksplant başına ortalama 15,8 gövde sayısı ile en iyi sonuçları vermiştir. *T. vulgaris* bitkisinin kriyoprezervasyonu için denenen ve en iyi sonucu veren damlacık-dondurma tekniği (90 dakika 0°C' ta PVS2 uygulaması) *T. cariensis* bitkisi için denendi. Çalışmada kontrol grubuna ait canlılık ve rejenerasyon oranları sırasıyla %65 ve 60; sıvı azot grubunda bu oran %20 ve 18,33' e düşmüştür. Kontrol grubunda eksplant başına düşen ortalama gövde sayısı 2,52, sıvı azot grubunda bu değer 2,73' tür. Marco-Medina ve arkadaşları 2010 yılında *Thymus moroderi* bitkisini damlacık dondurma tekniği kullanarak kriyoprezerve etmişlerdir ve 30 dakika 0°C' ta PVS2 uygulaması ile en başarılı sonucu almışlardır.

Literatürde *Lamiaceae* ailesinden *Lavandula* sp. (lavanta) ve *Mentha* sp. (nane) bitkilerine ait kriyoprezervasyon çalışmaları da bulunmaktadır. Örneğin *Lavandula* sp. hücre süspansyon kültürleri başarılı bir şekilde kriyoprezerve edilmiştir (Tanaka ve Takahashi, 1995). *Mentha* cinsi ise oldukça fazla çalışılmıştır. 1990 yılında Towill, nane bitkisinin gövde uçlarını (*Mentha aquatica* x *M. spicata*) vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezerve etmiştir. Vitrifikasyon yönteminde %35 etilen glikol, 1 M Dimetil sülfoksit (DMSO) ve %10 polietilen glikol-8000 içeren vitrifikasyon çözeltisi kullanılmıştır. Hem *in vitro* hem de *ex vitro* nane bitkisinin gövde ucu eksplantları, iki aşamalı soğutma ve vitrifikasyon tekniğiyle kriyoprezerve edilmiştir (Towill, 2002). 1999 yılında Hirai ve Sakai, *in vitro* çoğaltılan *Mentha spicata* L. nodal tomurcuklarının aljinat kapsüllerle çevrilmiş meristemlerini vitrifikasyon tekniği ile başarılı bir şekilde kriyoprezerve etmişlerdir. Towill ve Bonnart 2003 yılında *in vitro* büyütülen farklı *Mentha* türlerinde (*Mentha aquatica*, *M. arvensis*, *M. piperita*, *M. spicata* 'N83-5', *M. spicata* 'Native' ve *M. aquatica* x *M. spicata*) vitrifikasyon sırasında görülebilecek potansiyel hasarları (örneğin, dondurma ve çözme sırasında hücre dışı buz oluşumu nedeniyle meydana

gelebilecek olası yaralanmalar) incelemişlerdir. Volk ve Walters 2006 yılında *M. x piperita* bitkisinin gövde uçlarında kriyokoruyucu çözeltilerin olası toksik etkilerini incelemişlerdir. PVS2 çözeltisinin 4 bileşenini 0 ve 22°C' ta kriyoprezerve edilecek eksplantla muamele etmişler ve sonuçları incelemişlerdir. 2006 yılında Keller ve arkadaşları, Volk tarafından yayınlanan vitrifikasyon temelli bir protokolü modifiye etmişlerdir. Senula ve arkadaşları 2007 yılında, *M. x piperita*, *M. x villosa* ve *M. spicata* bitkilerinde damlacık dondurma tekniği kullanarak kriyoprezervasyon yapmışlar ve %89 geri kazanım elde etmişlerdir. 2009 yılında Uchendu ve Reed, *M. x piperita* subsp. *citrata*, *M. canadensis*, *M. mistralis* ve *M. cunninghamii* bitkilerini kontrollü soğutma, enkapsülasyon-dehidratasyon ve vitrifikasyon olmak üzere üç yöntem kullanarak kriyoprezerve etmişlerdir. Kontrollü soğutma tekniği ile %93, vitrifikasyon tekniği ile %73, enkapsülasyon-vitrifikasyon tekniği ile %71 geri kazanım elde etmişlerdir.

Sunulan tez çalışmasının temel hedeflerinden biri de, *T. vulgaris* bitkisi için en iyi sonucu veren damlacık-dondurma yöntemi ile kriyoprezervasyon tekniğinin, *T. cariensis* başta olmak üzere, ileriye dönük çalışmalarda da, yine *Thymus* cinsine ait türlerde (*T. spyleus*, *T. pulvinatus*, *T. cherlerioides*) ve *Lamiaceae* ailesine ait endemik ve kaybolma riski taşıyan bazı cinslere (*Salvia*, *Sideritis*, *Lamium*, *Phlomis*, *Thymbra*) ait bitki türleri üzerinde uygulamaktır. Tez çalışması kapsamında en iyi sonuçları veren damlacık-dondurma tekniğinin, farklı bitki gurupları üzerinde uygulanabilir özellikte olmasının ileriye dönük çalışmalarda bize büyük avantajlar sağlayabileceğini düşünebiliriz. Bu teknik *Musa* sp. (muz) bitkisinin meristemleri (Panis ve ark., 2005), *Phoenix* sp. (hurma) bitkisinin embriyonik kültürleri (Feki ve ark., 2009), *Pelargonium* sp. (sardunya) bitkisinin gövde ucu eksplantları (Gallard ve ark., 2008), *Solanum tuberosum* (patates) apikal tomurcukları (Panta ve ark., 2006), *Olea europaea* (zeytin) embriyonik kültürleri (Sanchez-Romero ve Panis, 2008) ve *Colocasia esculenta* bitkisinin gövde ucu eksplantları (Sant ve ark., 2008) olmak üzere çok farklı aileden bitkinin kriyoprezervasyonunda başarılı sonuçlar vermiştir.

5. SONUÇLAR

Thymus vulgaris tohumlarının dekontaminasyonu için Ozudogru ve arkadaşları (2005) tarafından yerfıstığı tohumlarının dekontaminasyonu için geliştirilmiş olan yöntem kullanılmış ve böylece %100 oranında temiz eksplant ve yaklaşık %80 oranında çimlenme sağlanmıştır. Dekontaminasyonu sağlanan tohumlar için çimlenme besiyeri olarak bitki büyüme düzenleyicilerini içermeyen yarı-katı MS.0 kullanılmıştır.

Olgun *T. longicaulis* ve *T. cariensis* bitkilerinden alınan bitki parçaları ile yapılan dekontaminasyon denemelerinde, nodal eksplantlerde, hem kontaminasyon oranının çok daha yüksek olduğu görülmüş, hem de bu eksplant türü ile elde edilen bitki rejenerasyonları görece daha düşük olmuştur. Gövde ucu eksplantlarının ise dekontaminasyonu başarılı olmuş, bitki rejenerasyonları da sağlanabilmistir. Bu nedenle ilerleyen çalışmalarda bitki materyali olarak gövde ucu eksplantları kullanılmıştır. Ayrıca uygulanan dekontaminasyon yöntemi gerek morfolojik (*T. longicaulis*, *T. cariensis*'e göre daha tüylü, daha sert, koyu renkli ve küçük yapraklıdır, gövdeleri daha kısa yapılı sürgünlere sahiptir, yaprak ve gövde üzerindeki salgı keseleri daha fazladır) gerekse yaşama ortamları (*T. longicaulis*, *T. cariensis*'e göre daha soğuk ve deniz seviyesinden daha yüksek yerlerde yaşamaktadır) birbirinden farklı olan iki ayrı tür için de başarılı sonuç vermiştir. Tüm dekontaminasyon denemelerinde elde edilen sonuçlara dayanarak, en elverişli olan uygulamaların %1,5' lik çamaşır suyu ile 1 saat veya %2,5' lik çamaşır suyu ile 30 dakika olduğuna karar verilmiştir. Bu dekontaminasyon yönteminin diğer kekik türlerinde de olumlu sonuçlar verebileceği düşünülmektedir.

T. vulgaris bitkisi için belirlenen, en iyi rejerasyon oranı, eksplant başına düşen gövde sayısı ve bu verilere dayanılarak hesaplanan gövde oluşturma kapasitesi indeksi, 1 mg/l KIN ile 0,3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyerinde elde edildi. *T. vulgaris* için belirlenen en uygun rejenerasyon besiyeri birbirinden oldukça farklı özellikte *T. longicaulis* ve *T. cariensis* türlerinde denendi ve her iki kekik türünde de başarılı sonuçlar elde edildi. Bu sonuçlara dayanarak, *T. vulgaris* için optimize edilen rejenerasyon besiyerinin pek çok kekik türünde uygulanabilir olduğu düşünülebilir.

Ayrıca literatürde günümüze dek yapılan *Thymus* cinsine ait mikroçoğaltım çalışmalarında, ilk defa TDZ, 2,4-D, GA₃ ve AgNO₃ bitki büyüme düzenleyicileri tarafımızca uygulandı.

In vitro çoğaltılan *T. vulgaris* gövdelerinin, toprağa aktarılarak iklimlendirilmesi öncesinde yapılan köklendirme çalışmasında, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen veya farklı derişimlerde IBA, NAA, IAA ve 2,4-D oksin bitki büyüme düzenleyicileri içeren yarı-katı MS besiyerleri kullanıldı. Bu çalışmada en iyi sonuç 0,05 mg/l 2.4-D içeren yarı-katı besiyerinde elde edildi (%92,5 köklenme oranı ve 15,86 kök oluşturma kapasitesi indeksi). Daha sonra *T. vulgaris* için belirlenen en uygun köklenme besiyeri, *T. longicaulis* ve *T. cariensis* bitkisinde *in vitro* köklenme için denendi, her iki kekik türünde %100 köklenme oranı elde edilirken, kök oluşturma kapasitesi indeksleri sırasıyla 11,95 ve 17,67 olarak hesaplandı. 0,05 mg/l 2.4-D içeren MS besiyerinde köklendirilen *T. vulgaris*, *T. longicaulis* ve *T. cariensis* bitkilerine ait gövdelerin iklimlendirmesinde %100 başarı elde edilmiştir.

In vitro çoğaltılan *T. vulgaris* bitkisinin genetik kararlılığında meydana gelebilecek olası değişiklikler RAPD belirteçleri kullanılarak araştırıldı. 1 mg/l KIN ve 0,3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı besiyerinde 4 haftalık periyotlarla ardarda 10 kez alt kültürlenen *T. vulgaris* bitkisinin 2, 4, 6, 8 ve 10. alt kültür periyotları sonunda elde edilen genomik DNA' lar ile başlangıç materyalinden (gövde uçlarının izole edilerek besiyerine aktarılması yoluyla *in vitro* klonal gövde hattının elde edilmesinde kullanılan, *T. vulgaris* tohumunun çimlendirilmesi sonucu elde edilen fide) izole edilen genomik DNA, 20 adet rastgele seçilmiş, 10 baz uzunluğunda primerler kullanılarak RAPD PCR yöntemi ile amplifiye edildi. Elde edilen PCR ürünlerinin bant profilleri %1' lik agaroz jelde yürütülerek karşılaştırıldı ve hiçbir polimorfik bant görülmedi. Bu sonuçlara dayanarak, çalışmamızda kekik bitkisinin klonal çoğaltımı için optimize edilen rejenerasyon yönteminin, elde edilen kekik bitkilerinin genetik kararlılığının korunmasında olumsuz bir etkiye yol açmadığı düşünülebilir. Günümüze kadar yapılmış olan çalışmaların taranması sonucunda, *in vitro* çoğaltılan *Thymus* cinsine ait türlerin hiç birisinde moleküler belirteç kullanılarak genetik

kararlılığın incelenmediği görülmüştür. Bu bağlamda da yapılan tez çalışması literatürde bir ilktir.

T. vulgaris bitkisinin *in vitro* çoğaltımı için optimize edilen, 1 mg/l KIN ve 0,3 mg/l GA₃ içeren yarı-katı MS besiyeri, *T. vulgaris* bitkisinin orta dereceli saklanması da denenmiştir. Buna göre, besiyerine aktarılan gövde kültürleri, +4°C' ta ve karanlıkta 12 ay boyunca, alt kültürlenmeden başarılı bir şekilde saklanmıştır. Standart kültür şartlarında, 23°C sıcaklık, 16/8 saat fotoperiyotta kültüre alınan bitkilerin büyüme ve gelişmesi sırasında, metabolik aktivitelerinin bir sonucu olarak kültür kabı içinde biriken gaz kompozisyonu ve besiyerine salınan fenolik bileşenler, ayrıca besiyeri kompozisyonunun içerdiği minerallerin bitkiler tarafından özütlenerek tükenmesi nedeniyle, genellikle 3-4 haftalık periyotlarda taze besiyerine aktarılmaları gerekmektedir (Huxter ve ark., 1981; Kumar ve ark., 1987). Orta dereceli saklama sırasında kültür sıcaklığının ve ortam ışık şiddetinin ve/veya aydınlık sürenin düşürülmesi, bitki metabolizmasının yavaşlamasına ve dolayısı ile metabolizma sonucu ortaya çıkan ve bitki gelişimini olumsuz bir şekilde etkileyen faktörlerin azalmasını sağlayarak, bitki türüne göre değişebilmekle birlikte, görece daha uzun sürelerde taze besiyerine aktarıma gereksinim duyulmadan kültürlemeyi mümkün kılmaktadır (Pierik, 1993). Buna göre, sunulan tez çalışması kapsamında *T. vulgaris* bitkisinin orta dereceli saklanması literatürde ilk defa tarafımızdan gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında, *in vitro* çoğaltım ve orta süreli saklamaya ek olarak, *T. vulgaris* bitkisinin uzun süreli saklanması amacıyla kriyoprezervasyon (germplazmanın sıvı azot içinde uzun süreli saklanması) yöntemlerinin geliştirilmesi de amaçlanmıştır. Bunun için PVS2 vitrifikasyonu temeline dayanan üç farklı tek aşamalı dondurma tekniği uygulanmıştır (PVS2 vitrifikasyon, enkapsülasyon-vitrifikasyon ve damlacık-dondurma). Ayrıca, sıvı azot içinde saklama öncesinde, *T. vulgaris* gövde kültürlerinin farklı sürelerde (1, 2, 3 veya 4 hafta) +4°C' ta, karanlıkta tutulması yoluyla gerçekleştirilen soğuğa alıştırma aşamasının ve bu kültürlerden izole edilen gövde ucu eksplantlarının farklı derişimlerde sukroz içeren yarı-katı MS besiyerlerine aktararak farklı sürelerde kültürlenmesi yoluyla sukroz

ön kültür aşamasının da optimize edilmesine çalışılmıştır. *T. vulgaris* bitkisi için optimize edilen en uygun soğuğa alıştırma periyodunun 2 hafta, en ideal sukroz ön kültür uygulamasının da 0.25M sukroz içeren yarı-katı MS.0 besiyerinde 48 saatlik inkübasyon olduğu belirlendi.

T. vulgaris bitkisi için denenen tek aşamalı dondurma teknikleri içinde en iyi sonuç (sıvı azotta saklama sonucu elde edilen canlılık ve rejenerasyon oranı) damlacık dondurma yöntemiyle kriyoprezerve edilen gövde uçlarından elde edilmiştir. PVS2 vitrifikasyon tekniğinde, sıvı azota aktarılmamış olan kontrol grubu örneklerde, PVS2 ile muamele süresinin arttırılması sonucu canlılık ve rejenerasyon oranının azalmış olması, gövde uçlarının PVS2 çözeltisinin içerdiği DMSO gibi toksik bileşenlerden olumsuz yönde etkilenmiş olduklarını göstermektedir. Buna bağlı olarak, sıvı azotta saklanan örneklerde görülen düşük canlılık ve rejenerasyon oranları da, PVS2 solüsyonunun damlacık-dondurma yöntemine göre daha yüksek hacimde ve daha yavaş soğutma hızında uygulandığında, kekik gövde uçlarının uzun süreli saklanmasında gerekli olan kriyo-korumayı teşvik etmede yetersiz kaldığını göstermektedir.

Enkapsülasyon-vitrifikasyon yönteminde, sentetik tohum eldesi ile tomurcukları, etraflarında oluşturulan kapsül sayesinde PVS2'nin zararlı etkilerinden nispeten korumak amaçlanmış, ancak Na-aljinat kapsül, besiyeri içeriğinin eksplante ulaşmasında ve eksplantin gelişip büyümesinde fiziksel bariyer gibi rol oynayarak tomurcukların gelişiminde engelleyici bir etken olmuştur. Daha önce de bahsedildiği gibi, kapsül dayanıklılığı ve sertlik derecesi, Na-aljinat derişimini ve kalsiyum çözeltisi içindeki polimerizasyon süresinin optimize edilmesi yoluyla değiştirilebilir. Ancak tekniğin kriyoprezervasyon amacıyla kullanımında dikkat edilmesi gereken nokta, sentetik tohumların sıvı azotta saklama sırasında ve sonrasında bütünlüklerini koruyabilecek kadar sert ve dayanıklı, aynı zamanda kapsül içindeki eksplantin gelişip büyümesine izin verecek oranda yumuşak olmasının sağlanmasıdır. Bu da, %3' ten daha düşük Na-aljinat konsantrasyonlarının kullanımını elverişsiz kılmaktadır.

Damlacık dondurma tekniğinde ise, kriyoprezerve edilecek gövde ucu eksplantları PVS2 çözeltilisinin toksik etkisini en aza indirecek miktarlarda (3-5 µl) kullanıldığından, ayrıca yöntemde, sıvı azota aktarım anında, kullanılan alüminyum folyonun ısı geçirgenlik özelliklerine bağlı olarak, diğer yöntemlere oranla çok daha hızlı bir soğutma sağlandığından, PVS2 solüsyonu ile etkileşim süresindeki artış, sıvı azota aktarılmayan kontrol grubu örneklerin canlılığını ve rejenerasyon yeteneğini olumsuz yönde etkilemediği gibi, kriyoprezervasyon sonrasında bitkinin canlılığı ve rejenerasyon yeteneğinin geri kazanılmasında da olumlu sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Dolayısıyla, *T. vulgaris* için olumlu sonuç veren bu teknik yakın türler ve hatta aynı ailenin farklı cinsleri üzerinde de denenebilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, kriyoprezervasyonun, yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olan türlerin korunması için oldukça umut verici bir yöntem olduğunu göstermektedir. Çalışmamızın hedeflerinden birisi de bu amaca yönelik olmuştur. Daha önce de sıkça bahsedildiği gibi, başarılı bir şekilde mikroçoğaltımı yapılan *T. cariensis* bitkisi Türkiye'ye özgü ve kaybolma tehlikesi altında olan bir tür olup, *T. vulgaris* bitkisinin kriyoprezervasyonu için optimize edilen damlacık dondurma tekniği ile başarılı bir şekilde kriyoprezerve edilebilmiştir.

İleriye yönelik çalışmalarda kekik bitkisi için denenip olumlu sonuçlar elde ettiğimiz dekontaminasyon, mikroçoğaltım ve kriyoprezervasyon tekniklerini, Türkiye için endemik ve kaybolma riski taşıyan, aynı aileye mensup diğer bazı türlerde de (örneğin, *Salvia* sp. (adaçayı), *Sideritis* sp. (dağ çayı), *Tymbra* sp (kara kekik), *Origanum* sp. (İzmir kekiği), *Lavandula* sp. (lavanta) denenecektir. Ayrıca Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Bitki Kriyoprezervasyonu Laboratuvarı'nda bir kriyobank kurulması da amaçlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Accart, F., Monod, V., Poissonnier, M., Dereuddre, J., Pâques, M., (1993). Cryoconservation d'apex de *Populus tremula* x *alba* cultivés *in vitro* transformés génétiquement ou non. Ann Recherches Sylvicoles 1993: 23–29.
- Adzet, T., Granger, R., Passet, J. and San Martin, R., (1977). Chimiotypes de *Thymus mastichina* L. Plant. Me'd. Phytother., 11, 275-280.
- Agrawal, A., Swennen, R., Panis, B., (2004). A comparison of four methods for cryopreservation of meristems in banana (*Musa* spp.). CryoLetters 25: 101–110.
- Al-Ababneh, S.S., Karam, N.S., Shibli, R.A., (2002). Cryopreservation of sour orange (*Citrus aurantium* L.) shoot tips. *In vitro* Cell Dev Biol-Plant 38: 602–607.
- Al-Ababneh, S.S., Shibli, R.A., Karam, N.S., Shatnawi, M.A., (2003). Cryopreservation of bitter almond (*Amygdalus communis* L.) shoot tips by encapsulationdehydration and vitrification. Adv Hortic Sci 17: 15–20.
- Amvam Zollo, P.H., Biyiti, L., Tchoumboungang, F., Menut, C., Lamaty, G. and Bouchet, P.H., (1998) Aromatic plants of tropical Central Africa, Part XXXII, Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. Flavour Fragr. J., 13, 107-114.
- Aoshima, Y., (1997). Cryopreservation of multiple shoots of tea (*Camellia sinensis* L.O. Kuntze) by alginate encapsulation-dehydration. Tech Bull Shizuoka Tea Exp Stat 21: 13–21.
- Apelbanm, A., Burg, S.P., (1971). Altered cell microfibrillar orientation in ethylenetreated *Pisum sativum* stems. Plant. Physiol. 48:648-652.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., (2001). Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kültürü ve Uygulamaları, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya. 8:262-281.
- Bais, H.P., Sudha, G.S., Ravishankar, G.A., (2000). Putrescine and silver nitrate influences shoot multiplication, *in vitro* flowering and endogenous titers of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local. J. Plant growth Regul. 19: 238-248.

- Balandrin, M.J., Klocke, J.A., (1988). Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. In: Bajaj Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plant*, vol. 4. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 3-36.
- Baser, K.H.C., Ozek, T., Tumen, G., (1992). Essential oils of *Thymus cariensis* and *Thymus haussknechtii*, two endemic species in Turkey. *Journal of essential oil research*, v. 4 (6), p. 659-661.
- Baytop, T., (1999). Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Nobel Tıp Kitapevi (2. Baskı).
- Bekheet, S.A., (2007). *In vitro* Preservation of Globe Artichoke Germplasm. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 17(1): 1-9.
- Benli, M., Yiğit, N., (2005). Ülkemizde Yaygın Kullanımı Olan Kekik (*Thymus vulgaris*) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 3(8): 1-8.
- Benson, E.E., (1999). An introduction to plant conservation biotechnology In: Benson E.E. (ed.) *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor & Francis, London. pp. 3-39.
- Benson, E.E., (2004). Cryoconserving algal and plant diversity: Historical perspectives and future challenges. In: Fuller, B., Lane, N., Benson, E.E. (eds.) *Life in the Frozen State*. CRC Press, London, pp. 299–328.
- Benson, E.E., (2008). Cryopreservation Theory. Chapter 2. In: Reed B.M. (ed.) *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, Springer, USA. pp. 15-32.
- Beyer, E.M. (1976a). Ethylene antidote. *HortScience*, vol. 11, no. 3, p. 174-175.
- Beyer, E.M. (1976b). Silver ion: a potent anti-ethylene agent in cucumber and tomato. *HortScience*, vol. 11, no. 3, p. 175-196.
- Bournman, C.H., (1994). Micropropagation and Somatic embriyogenesis. In: Hayward, M.D., Bosemark, N.O., Romgaso, I. (eds.), *Plant Breeding; Principles and Prospects*, pp. 246-260, Chapman and Hall, London.
- Bravo, L.A., Zuniga, G.E., Alberdi, M., Corcuera, L.J., (1998). The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation. *Physiol Plant* 103: 12–23.

- Breiman, A., Ritem, A.D., Barp, A., Shaskin, H., (1987). Heritable somaclonal variation in wild barley (*Hordeum spontaneum*). *Theor Appl Genet* 74: 104-112.
- Brison, M., de Boucaud, M.T., Dosba, F., (1995). Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of two interspecific *Prunus* rootstocks. *Plant Sci* 105: 235-242.
- Brock, T.G., Kaufman, P.B., (1991). Growth regulators: an account of hormones and growth regulation. In: Bidwell, R. G. S., (ed.). *Plant physiology, a treatise*, Vol. X, Growth and development. San Diego: Academic Press 277-340.
- Brown, D.C.W., Thorpe, T.A., (1995). Crop improvement through tissue culture. *World J. Microb. Biotech.*, 11: 409-415.
- Burke, M.J., (1986). The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In: Leopold AC (ed) *Membrane, Metabolism and Dry Organisms*. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY, pp 358-364.
- Casado, J.P., Navarro, M.C., Utrilla, M.P., Martinez., A., Jimenez, J., (2002). Micropropagation of *Santolina canescens* Lagasca and *in vitro* volatiles production by shoot explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 147-153, 2002.
- Chang, Y., Barker, R.E., Reed, B.M., (2000). Cold acclimation improves recovery of cryopreserved grass (*Zoysia* and *Lolium* sp.) *CryoLetters* 21: 107-116.
- Charoensub, R., Phansiri, S., Sakai, A., Yongmenitchai, W., (1999). Cryopreservation of cassava *in vitro* grown shoot tips cooled to -196°C by vitrification. *CryoLetters* 20: 89-94.
- Charoensub, R., Phansiri, S., Sakai, A., Yongmanitchai, W., (2004). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of cassava. *CryoLetters*, 25 (1): 51-58.
- Chen, T.H.H., Kartha, K.K., Gusta, L.V., (1985). Cryopreservation of wheat suspension culture and regenerable callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 4: 101-109.
- Chen, Y., Wang, J.H., (2003). Cryopreservation of carrot (*Daucus carota* L.) cell suspensions and protoplasts by vitrification. *CryoLetters* 24: 57-64.

- Chi, G. L., Pua, E.C., (1989). Ethylene inhibitors enhance *de novo* shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* spp. *chinensis* (Chinese cabbage) *in vitro*. *Plant Sci.* 64: 243-25.
- Cho, E.G., Hor, Y.L., Kim, H.H., Ramanatha, Rao. V., Engelmann, F., (2002). Cryopreservation of *Citrus madurensis* zygotic embryonic axes by vitrification: Importance of pregrowth and preculture conditions. *CryoLetters* 23: 325–332.
- Collet, G.F., (1985). Enracinement amélioré lors de la production *in vitro* de rosiers. *Rev. Suisse Viticult. Arborzc. Hort.*,17: 259-263.
- Corredoira, E., San-José, MC., Ballester, A., Vieitez, AM., (2004). Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut. *CryoLetters* 25: 33–42.
- Crowe, J.H., Crowe, L.F., Chapman, D., (1984a). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. *Science* 233: 701–703.
- Crowe, J.H., Crowe, L.F., Chapman, D., (1984b). Infrared spectroscopic studies on interactions of water and carbohydrates with a biological membrane. *Arch Biochem Biophys* 232: 400–407.
- Dağcı, E.K., İzmirli, M., Dığrak, M., (2002). Kahramanmaraş İlinde Yetişen Bazı Ağa Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. *KSU Fen ve Mühendislik Dergisi* 5(1) 38-46, Kahramanmaraş.
- Davis, P.H., (1965). *Flora of Turkey and East Aegean Islands*. VII. *Edinburg Univ. Edinburg*, p. 349-382.
- Debergh, P.C., Read, P.E., (1993). Mikropropagation. In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (eds.), *Mikropropagation – Technology and Application.*, pp. 1-15, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Hollanda.
- De Carlo, A., Benelli, C., Lambardi, M., (2000). Development of a shoot-tip vitrification protocol and comparison with encapsulation-based procedures for plum (*Prunus domestica* L.) cryopreservation. *CryoLetters* 21: 215–222.
- Dereuddre, J., Fabre, J., Bassaglia, C., (1988). Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var. Eolo) apical and axillary shoot tips excised from different aged *in vitro* plantlets. *Plant Cell Rep* 7: 170–173.

- Dereuddre, J., Blandin, S., Hassen, N., (1991). Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen. 1. Effects of preculture. *CryoLetters* 12: 125–134.
- Dittbrenner, A., Hensen, I., Wesche, K., (2005). Genetic structure and random amplified polymorphic DNA diversity of the rapidly declining *Angelica palustris* (*Apiaceae*) in Eastern Germany in relation to population size and seed production. *Plant Species Biology* 20: 191-200.
- Duelli, P., Obrist, M.K., (2003). Biodiversity indicators: the choice of values and measures. In: Büchs, W. (Ed.), *Biotic Indicators for Biodiversity and Sustainable Agriculture*. Agric. Ecosyst. Environ. 98, 87–98.
- Dussert, S., Engelmann, F., Chabrillange, N., Anthony, F., Noirot, M., Hamon, S., (1997). *In vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.) germplasm. In: Razdan MK & Cocking EC (eds) *Conservation of Plant Genetic Resources In vitro*, Vol. 1 (pp 287–305). Science Publishers, Inc., New Hampshire, USA.
- Dülger, B., Gücin, F., Malyer, H., Bıçakçı, A., (1997). Antimicrobial Activity of Marigold (*Tagetes minuta* L.), *Acta Pharmaceutica Turcica*, 39, 3, 115-119.
- Dürger, B., Ceyhan, M., Alitsaous, M., Uğurlu, E., (1999). *Artemisia absinthium* L. (Pelin)'un Antimikrobiyal Aktivitesi. *J. Of Biology* , 23: 377-384.
- Elena-Rossello, J.A., (1976). *Projet d'une itude de taxonomic expeirimentale du genre Thymus*. These doct., Univ.Sc. et Tech. du Languedoc. Montpellier.
- Eminagaoglu, O., Tepe, B., Yumrutas, O., Akpulat, H.A., Daferera, D., Polissiou, M., Somken, A., (2007). The in vitro antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch.) Boiss. and *Satureja cuneifolia* ten. *Food Chemistry* 100; 339–343.
- Engelmann, F., (1997). *In vitro* conservation methods. In: Ford-Lloyd, B.V., Newbury, J.H., Callow, J.A. (eds.) *Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use*. CAB International, Wellingford, pp 119–162.
- Engelmann, F., (2004). Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In vitro Cell.& Dev. Biol.-Plant* 40: 427-433.
- Erdağ, B., Yürekli, K., (2000). *Thymus sipyleus* Boiss. (Lamiaceae)'un *In vitro* Çoğaltılması. *Turk J. Biol.* 24, ek Sayı, 81-86.

- Eröztürk, N., (2000), Bir Yudum Sağlık, Anahtar Yayınları, İstanbul.
- Ertürk, Ö., Demirbağ, Z., (2003). *Scorzonare mollis* Bieb (Compositae) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi., Ekoloji Çevre Dergisi, 12(47)27-31.
- Evans, D.A., (1988). Applications of Somaclonal Variation . Biotechnology in Agriculture, 203-223.
- Fabre J., Dereuddre J., (1990). Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. CryoLetters 11: 413-426.
- Fahy, G.M., MacFarlane, D.R, Angell, C.A., Meryman, H.T., (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology 21: 407–426.
- Feki, L., Bouaziz, N., Sahnoun, N., Panis, B., Drira, N., (2009). Cryopreservation of date palm cv. Barhee proembryogenic masses using the ultra-rapid droplet freezing technique: expression of the osmotic stress gene and genetic stability. Meeting of the Workgroup 2 of the COST action 871 "Cryopreservation of crop species in Europe" Integration of Cryopreservation in Genebank Strategies. Gatersleben, Germany.
- Fraternale, D., Giamperi, L., Ricci, D., Rocchi, M.B.L., Guidi, L., Epifano, F., Marcotullio, M.C., (2003). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 87–97, 87.
- Fry, S.C., Street, H.E., (1980). Gibberellin-sensitive cultures. Plant Physiol. 65:472-477.
- Furmanowa, M., Olszowska, O., (1992). Micropropagation of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). In Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 19, pp. 230-243.
- Gallard, A., Panis, B., Dorion, N., Swennen, R., Grapin, A., (2008). Cryopreservation of Pelargonium apices by droplet-vitrifications. CryoLetters 29 (3):243-251.
- Gamborg, O.L., Murashige, T., Thorpe, T.A., (1976). Plant Tissue Culture Media. In vitro 12: 473-478.

- Gamez-Pastrana, R., Martinez-Ocampo, Y., Beristain, C.I., Gonzalez-Arno, M.T., (2004). An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation- vitrification. *CryoLetters* 25: 405–414.
- Garcia Martin, D., Fernandez Vega, F.I., Lopez de Bustamante, F.M. and Garcia Vallejo, C., (1974). Aceites esenciales de la provincia de Guadalajara. In M. Gavifia Mugica and J. Torner Ochoa (eds), *Contribución al estudio de los aceites esenciales españoles*. Ministry Agriculture, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madrid, pp. 405-420.
- Garcia Vallejo, M.C., Rebollar Reier, M.P., Garcia Martin, D., (1992) Composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L., en la Comunidad de Madrid. In Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (eds), *I Jornadas Iberoamericana de Plantas Medicinales, Aromáticas y de Aceites Esenciales*. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid, pp. 221-232.
- Gaspar, T., Kevers, C., Hausman, J., (1994). Peroxidase activity and endogenous free auxin during adventitious root formation. In: Lumsden, P.J., Nicholas, J.R., Davies, W.J., (ed.). *Physiology, growth and development of plants in culture*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 289-298.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penei, C., Greppin, H., Reid, D.M., Thorpe, T.A., (1996). Plant Hormones and Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 32:272-289.
- George, E.F., (1993). *Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1, The Technology*, Exegetics Ltd., England.
- George, P.S., Ravishankar, G.A., (1997) *In vitro* multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. *Plant Cell Rep.* 16, 490–494
- Giridhar, P., Indu, E.P., Vijaya Ramu, D., Ravishankar, G.A. (2003). Effect of silver nitrate on *in vitro* shoot growth of *Coffea*. *Tropical Science*, vol. 43, no. 3, p. 144-146.
- Giridhar, P., Obul Reddy, B., Ravishankar, G.A., (2001). Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andr. *Curr. Sci.* 81: 1166-1170.
- Gonçalves, S., Romano, A., (2007). *In vitro* minimum growth for conservation of *drosophyllum lusitanicum*. *Biologia plantarum* 51 (4): 795-798.

- Gonzalez-Arno, M.T., Engelmann, F., (2006). Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: Review and case study on sugarcane. *CryoLetters* 27: 155–168.
- Gonzalez-Arno, M.T., Engelmann, F., Huet, C., Urra, C., (1993). Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology. *CryoLetters* 14: 303–308.
- Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I., and Tsakinis, J., (2006). *J. Food Prod.*, 69, 2998.
- Granger, R., Passet, J., (1971). Types chimiques (chemotypes) de l'espèce *Thymus vulgaris* L. C. R. Acad. Sci. Paris, 273, 2350-2353.
- Granger, R., Passet, J., (1973). *Thymus vulgaris* spontane de France: Races chimiques et chemotaxonomie. *Phytochemistry*, 12, 1683-1691.
- Grospietch, M., Stodulkova, E., Zamecnik, J., (1999). Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips. *CryoLetters* 20: 339–346.
- Guarrera, P.M., Forti, G., Marignoli, S., (2005). *Ethnopharmacol J.*, 96, 3, 429.
- Gupta, S., (2001). ABA-induced growth retardation of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) *in vitro*. *Ind. J. Plant Genet. Res.*, 14: 312-313.
- Gürel, E., (1997). Plant tissue culture techniques and types of *in vitro* development occurring in cultures. Kızılırmak Fen Bilimleri Kongresi, Kırklareli Üniversitesi, 14-16 Mayıs 1997, pp. 23-36.
- Gürel, E., Uçar-Türker, A., (2001). Organogenesis. In: Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S. (eds.) *Bitki Biyoteknolojisi I – Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya. pp. 36-70.
- Haberlandt, G., (1902). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math.-Naturwiss. Kl., Abt. J.* 111, 69–92.
- Haberer, G., Kieber, J.J., (2002). Cytokinins. New Insights into a Classic Phytohormone. *Plant Physiology*, Vol. 128, pp. 354–362.

- Halmagyi, A., Deliu, C., Coste, A., (2005). Plant regrowth from potato shoot tips cryopreserved by a combined vitrification-droplet method. *CryoLetters* 26: 313–322.
- Hartman, H.T., Kester, D.E., (1975). *Plant propagation – Principles and Practices*. Prentice-Hall. Inc., New Jersey.
- Hashmi, G., Huettel, R., Meyer, R., Krusberg, L., Hammerschlag, F., (1997). RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Reports*. 16:624-627.
- Hassan, N.A., El-Halwagi, A.A., Gaber, A., El-Awady, M., Khalaf, A., (2007). Slow-growth *in vitro* Conservation of garlic Cultivars Grow in Egypt: Chemical Characterization and molecular Evaluation. *Global Journal of Molecular Sciences* 2 (2): 67-75.
- Hay, R.K.M., Waterman, P.G., (1993). *Volatile Oil Crops: Their Biology, Biochemistry, and Production*. Longman Scientific & Technical; John Wiley, 185 pp.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumasho, T., (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.*, 6: 271-282.
- Hirai, D., Sakai, A., (1999a). Cryopreservation of *in vitro*-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification. *Plant Cell Rep* 19: 150–155.
- Hirai, D., Sakai, A., (1999b). Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato Res* 42: 153–160.
- Hirai, D., Sakai, A., (2003). Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Rep* 21: 961–966.
- Hirai, D., Shirai, K., Shirai, S., Sakai, A., (1998). Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) by encapsulation–vitrification. *Euphytica* 101: 109–115.

- Hornung, R. Domas, R., Lynch, P.T., (2001). Cryopreservation of plumular explants of coconut (*Cocos nucifera* L.) to support programmes for mass clonal propagation through somatic embryogenesis. *CryoLetters* 22: 211–220.
- Huang, C.N., Wang, J.H., Yan, Q.S., Zhang, X.Q., Yan, Q.F., (1995). Plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspension cells cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Rep* 14: 730–734.
- Huxter, T.J., Reid, D.M., Thorpe, T.A., (1981). Shoot initiation in light- and darkgrown tobacco callus: the role of ethylene. *Physiol. Plant.* 53:319-326.
- Hyde, C.L., Phillips, G.C., (1996). Silver nitrate promotes shoot development and plant regeneration of chile pepper (*Capsicum annum* L.) via organogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 32: 72-80.
- Iapichino, G., Arnone, C., Bertolino, M., Roxas, A.U., (2006). Propagation of Three *Thymus* Species by Stem Cuttings. Dipartimento di Agronomia Ambientale e Territoriale, Sezione di Orticoltura e Floricoltura, Università di Palermo, Italy. Proc. Ist IC on Labiatae (Eds.) B. Ruffoni et al. *Acta Hort.* 723.
- Ishikawa, K., Harada, K., Mii, M, Sakai. A., Yoshimatsu, K., Shimomura, K., (1997). Cryopreservation of protocorms of Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. *Plant Cell Rep* 16: 754–757.
- Jovanovic, G.S., Marin, P.D., Dzamic, A., Ristic, M., (2009). Essential Oil composition of *Thymus longicaulis* from Serbia. *Chemistry of Natural Compounds, Vol. 45, No. 2.*
- Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F., Rhee, Y., (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in Matzke, M.A. and Matzke, A.J.M. (Eds.), *Plant Gene Silencing. Plant Molecular Biology* 43: 179–188. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Kamiya, T., Sasaki, K., Yoshimatsu, K., Shimomura, K., (1995). Cryopreservation of hairy roots of *Atropa belladonna* by vitrification. *Proc Japan Soc Plant Tissue Cult., 14th Annual Meet Rep*:112.
- Kawiak, A., Lojkowska, E., (2004) Application of MPD in the determination of genetic fidelity in micropropagated *Drosera* plantlets. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40(6): 592-595.

- Keller, E.R.J., Senula, A., Leunufna, S., Grbe, M., (2006). Slow growth storage and cryopreservation - tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *Int. J. Refrigeration* 29: 411-417.
- Khan, S., Naz, S., Ali, K., Zaidi, S., (2006). Direct organogenesis of *Kalanchoe tomentosa* (*Crassulaceae*) from shoot-tips. *Pak. J. Bot.*, 38(4): 977-981.
- Kırbağ, S., (1999). *Hypericum perforatum* L. 'un Değişik Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkileri., *Journal of Qafqaz University* , 2(1) 102-108.
- Kim, H.H., Cho, E.G., Baek, H.J., Kim, C.Y., Keller, E.R.J., Engelmann, F., (2004). Cryopreservation of garlic shoot tips by vitrification: Effects of dehydration, rewarming, unloading and regrowth conditions. *CryoLetters* 25: 59–70.
- Kim, H.H., Yoon, J.W., Kim, J.B., Engelmann, F., Cho, E.G., (2005). Thermal analysis of garlic shoot tips during a vitrification procedure. *CryoLetters* 26: 33–44.
- Krikorian, A.D., (1995). Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Davies, P. J., (ed.) *Plant hormones*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 774-796.
- Kryszczuk, A., Keller, J., Grbe, M., Zimnoch-Guzowska, E., (2006). Cryopreservation of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips using vitrification and droplet method. *J Food Agricult Environm* 4: 196–200.
- Kumar, P.P., Reid, D.M., Thorpe, T.A. (1987). The role of ethylene and carbon dioxide in differentiation of shoot buds in excised cotyledons of *Pinus radiata in vitro*. *Physiol. Plant.*, 69: 244-252.
- Kuriyama, A., Watanabe, K., Ueno, S., Mitsuda, H., (1989). Inhibitory effect of ammonium ions on recovery of cryopreserved rice cells. *Plant Sci* 64, 231-235.
- Lambardi, M., De Carlo, A., (2003). Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. In: Jain S.M. and K. Ishii (eds.) *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Kluwer Ac. Pub., Dordrecht, pp. , pp. 815-840.
- Lambardi, M., Fabbri, A., Caccavale, A., (2000). Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro* grown shoot tips. *Plant Cell Rep* 19: 213–218.

- Lambardi, M., Ozudogru, E.A., Previati, A., (2009). *In vitro* Conservation and cryopreservation of Ornamental Plants. In: S. M. Jain & Ochatt J. (eds) Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants. Springer, Berlin (*in press*).
- Lambardi, M., Sharma, K.K., Thorpe, T.A., (1993). Optimization of *in vitro* bud induction and plantlet formation from mature embryos of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, Vol. 29, Num. 4, 189-199.
- Lamb, C.J., Beachy, R.N., (1989). Plant Gene Transfer. In: Lamb, C.J., Beachy, R.N. (eds.), Proceedings of a UCLA Symposium, Utah, April 1-7, 1989, Wiley-Liss, New York.
- Lê, C.L., (1989). Microbouturage *in vitro* du thym (*Thymus vulgaris* L.). *Revue suisse Vitic. Arboic. Hortic.*, 21: 355-358.
- Lee, S.P., Chen, T.H.H., Fuchigami, L.H., (1991). Changes in the translatable RNA population during abscisic acid induced freezing tolerance in bromegrass suspension culture. *Plant Cell Physiol* 32: 45–56.
- Leunufna, S., Keller, E.R.J., (2003). Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.). *Plant Cell Rep.* 21: 1159–1166.
- Lovelock, J.E., Bishop, M.W.H., (1959). Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature (London)* 183: 1394–1395.
- Loziene, K., Venskutonis, P. R., Sipailiene, A., Labokas, J. (2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry* 103: 546-559.
- Luo, J., Reed, B.M., (1997). Abscisic acid-responsive protein, bovine serum albumin, and proline pretreatments improve recovery of *in vitro* currant shoot-tip meristems and callus cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 34: 240–250.
- Maheswari, N., Rajyalahsmi, K., Baneja, K., Dhir, S.K., Chowdry, C.N., Maheswari, S.C., (1995). *In vitro* culture of wheat and genetic transformation. Retrospect and prospect. *Critic. Rev. Plant Sci.*, 14 (2): 149-178.
- Mahindru, S.N., (1992). *Indian Plant Perfumes*. Metropolitan Phototype Settera Printers Ltd. India.

- Makowska, Z., Keller, J., Engelmann, F., (1999). Cryopreservation of apices isolated from garlic (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves. *CryoLetters* 20: 175–182.
- Mandal, B.B., (1995). Methods of *in vitro* conservation: principles, prospects and constraints, in *Plant Germplasm Conservation: Biotechnological approaches*. Rana, R.S., Chandel, S.R., Bhat, B.B., Mandal, J.L., Karihaloo, Bhat, K.V., Pandey, R., (eds.). NBPGR, New Delhi, India, pp:83-87.
- Marco-Medina, A., Casas, J.L., Swennen, R., Panis, B., (2010). Cryopreservation of *Thymus moroderi* by Droplet vitrification. *Cryoletters* 31 (1), 14-23.
- Mari, S., Engelmann, F., Chabrillange, N., Huet, C., Michaux-Ferrière, N., (1995). Histocytological study of coffee (*Coffea racemosa* and *C. sessiliflora*) apices of *in vitro* plantlets during their cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters* 16: 289–298.
- Martinez, M.T., Ballester, A., Vieitez, A.M., (2003). Cryopreservation of embryogenic cultures of *Quercus robur* using desiccation and vitrification procedures. *Cryobiology* 46: 182–189.
- Mateo, C., Morera, M.P., Sanz, J., Caldron, J., Hernandez, A., (1978). Estudio analítico de aceites esenciales procedentes de plantas esparfias. 1. Especies del género *Thymus*. *Riv. Ital.*, 60,621-627.
- Matsumoto, T., Sakai, A., Yamada, K., (1994). Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia Japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Rep* 13: 442–446.
- Matsumoto, T., Sakai, A., (1995). An approach to enhance dehydration tolerance of alginate-coated dried meristems cooled to -196°C . *CryoLetters* 16: 299–306.
- Matsumoto, T., Takahashi, C., Sakai, A., Nako, Y., (1998). Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of hybrid statice by three different procedures. *Scientia Hort* 76: 105-114.
- Mazur, P., (2004). Principles of cryobiology, In: Fuller, B., Lane, N., Benson, E.E., (eds.) *Life in the Frozen State*. CRC Press, London, pp. 3–66.
- Mendes, M.L., Romano, A., (1999). *In vitro* cloning of *Thymus mastichina* L. Field-grown Plants. In: Giberti, G. *et al.* (eds.) *Agr. Production, Post-Harvest Techniques, Biotechnology*. Acta Hort. 502.

- Mix-Wagner, G., Conner, A.J., Cross, R.J., (2000). Survival and recovery of asparagus shoot tips after cryopreservation using the “droplet” method. *N Z J Crop Hort Sci* 28: 283–287.
- Modgil, M., Mahajan, K., Chakrabarti, S.K., Sharma, D.R., Sobti, R.C., (2005). Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. *Scientia Horti* 104: 151-160.
- Monier, M., (1990). Induction of embryogenesis in callus culture. In: Pollard, J.W., Walker, J.M. (eds.), *Plant Cell and Tissue Culture*, pp. 141-148, Humana Press, New Jersey.
- Montes Guyot, M.A., Valenzuela L., Wilkomirsky, F., (1981). Aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *An. R. Acad, Farm.*, 47, 285-292.
- Morales, R., (1986). Taxonomia de 10s generos *Thymus* (excluida la seccion *Serpyllum*) y *Thymbra* en la peninsula Ibe'rica. *Ruizia*, 3, 5-324.
- Morales, R., (2002). The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: Stahl Biskup E. and Sáez F. (eds.) *Thyme - The genus Thymas*, Taylor and Francis, London, New York, pp. 1-43.
- Mossa, J.S., Al-Yahya, M.A., Hassan, M.M.A., (1987). Physicochemical characteristics and spectroscopy of the volatile oil of *Thymus vulgaris* growing in Saudi Arabia. *Int. J. Crude Drug Res.*, 25, 26-34.
- Muldrew, K., Acker, J.P., Elliott, A.W., Mc Gann, L.E., (2004). The water to ice transition: implications for living cells. In: Fuller, B., Lane, N., Benson, E.E. (eds.) *Life in the Frozen State*, CRC Press, London, pp. 67–108.
- Munthali M.T., Newburry H.J., Ford-Lloyd B.V., (1996). The detection of somaclonal variants of beet using MPD. *Plant Cell Reports* 15: 474-478.
- Murashige, T., (1977). *Plant Cell and Organ Cultures as Horticultural Practises*. *Acta. Horti*. 78: 17-30.
- Murashige T., Skoog F., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

- Negash, A., Krens, F., Schaart, J., Visser, B., (2001). *In vitro* conservation of enset under slow-growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66: 107–111.
- Niino, T., Sakai, A., (1992). Cryopreservation of alginate-coated *in vitro*-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. *Plant Sci* 87: 199–206.
- Niino, T., Tanaka, D., Ichikawa, S., Takano, J., Ivette, S., Shirata, K., Uemura, M., (2003). Cryopreservation of *in vitro*-grown apical shoot tips of strawberry by vitrification. *Plant Biotech* 20: 75–80.
- Niino, T., Sakai, A., Enomoto, S., Magoshi, J., Kato, S., (1992a). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of mulberry by vitrification. *CryoLetters* 13: 303–312.
- Niino, T., Sakai, A., Yakuwa, H., Nojiri, K., (1992b). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 28: 261–266.
- Niino, T., Hettiarachchi, A., Takahashi, J., Samarajeewa, P.K., (2000). Cryopreservation of lateral buds of *in vitro*-grown plants of innala (*Solemostemon rotundifolius*) by vitrification. *CryoLetters* 21: 349–356.
- Nikola S., Fontana E., Hoeberechts J., (2002). Cultural techniques to optimize the thyme (*Thymus vulgaris* L.) propagation. XXVIth International Congress and Exhibition. 11-17.08.2002, Toronto (Canada), (Abstract), p. 561.
- Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y., Matsuzawa, T., (1992). Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing method. *CryoLetters* 13: 379–388.
- Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y., Matsuzawa, T., (1993). Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Sci* 91: 67–73.
- Nitsch, J.P., Nitsch, C., (1969). Haploid plants from pollen grains, *Science*, vol 163, no: 3862, pp. 85-87.
- Noss, R.F., (1990). Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conserv. Biol.* 4, 355–364.

- Nunes, E.D.C., Benson, E.E., Oltramari, A.C., Araujo, P.S., Righetto, M., Viana, M., (2003). *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. *Biod. Conser.* 12, 837-848.
- Onishi, N., Sakamoto, Y., Hirosawa, T., (1994). Synthetic seed as an application of mass production of somatic embryos. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.*, 39:137-145.
- Ostry, M.E., Hackett, W., Michler, C., Serres, R., McCown, B., (1994). Influence of regeneration method and tissue source on the frequency of somatic variation in *Populus* to infection by *Septoria musiva*. *Plant Sci* 97: 5222-5226.
- Ozudogru, E.A., Ozden-Tokatli, Y., Akcin, A., (2005). Effect of silver nitrate on micropropagation of Virginia-type peanut (*Arachis hypogaea* L.). *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 41(2): 151-156.
- Ozudogru, E.A., Ozden-Tokatli, Y., Gumusel, F., Benelli, C., Lambardi, M., (2009). Development of a cryopreservation procedure for peanut (*Arachis hypogaea* L.) embryonic axes and its application to local Turkish germplasm, *Advances in Horticultural Science*, 23(1), 41-48.
- Palombi, M.A., Damiano, C. (2002). Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev) *Plant Cell Rep.* 20:1061–1066.
- Panis, B., (2008). Cryopreservation of monocots. In: Reed B.M. (ed.) *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, Springer, USA. pp. 241-251.
- Panis, B., Piette, B., and Swennen, R., (2005). Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Sci.* 168: 45–55.
- Panta, A., Panis, B., Ynouye, C., Criel, B., Swennen, R., Roca, W., (2006). Improvement of potato cryopreservation for the long-term conservation of Andean landraces at CIP. 43rd Meeting of the Society for Cryobiology in association with the Society for Low Temperature Biology. Hamburg, Germany.
- Pennycooke, J.C., Towill, L.E., (2001). Medium alterations improve regrowth of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) shoot tips by vitrification and encapsulation- dehydration. *CryoLetters* 22: 381–389.

- Peredo, E.P, Arroyo-Garcia, R., Revilla, M.A., (2009). Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. *Journal of Plant Physiology*, Vol.166; Issue 10: 1101-1111.
- Pierik, R.L.M., (1993). Mikropropagation: Technology and opportunities. In: Prakash J., Pierik, R.L.M. (eds.), *Plant Biotechnology. Commercial Prospects and Problems*. p. 9, Intercept Ltd. UK.
- Plessis, P., Leddet, C., Dereuddre, J., (1991). Resistance to dehydration and to freezing in liquid nitrogen of alginate coated shoot-tips of grape vine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay). *C R Acad Sci Paris 313 Sér III*: 373–380.
- Plessis, P., Leddet, C., Collas, A., Dereuddre, J., (1993). Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: Effects of pretreatment, cooling and postculture conditions. *CryoLetters* 14: 309–320.
- Poissonnier, M., Monod, V., Pâques, M., Dereuddre, J., (1991). Cryopreservation in liquid nitrogen of *Eucalyptus gunnii* shoot tips grown in vitro following encapsulation and dehydration. *Ann Rech Sylv AFOCEL1991 1992*: 5–23.
- Preece, J.E., Sutter, E.G., (1993). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (eds.), *Micropropagation Technology and Application*, pp. 71-95, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Previati, A., Benelli, C., Da Re, F., Ozudogru, A., Lambardi, M., (2008). Micropropagation and in vitro conservation of virus-free rose germplasm. *Propagation of Ornamental Plants* 8(2), 93-98.
- Quatrano, R.S., (1968). Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing DMSO. *Plant Physiol* 43: 2057–2061.
- Rashid, M.A., Hossain, M.A., Hasan, C.M., Reza, M.S., (1996). Antimicrobial diterpens from *Polvalthia longifolia* var *pendulla* (Annonaceae). *Phytotherapy Research* 10, 79 81.
- Raskin, I., Ripoll, C., (2004). Can an Apple a Day Keep the Doctor Away? *Curr. Pharmac. Design*. vol. 10:3419–3429.
- Redenbaugh, K., Fujii, J.A., Slade, D., (1988). Encapsulated plant embryos. In: Mizrahi, A. (ed.) *Biotechnology in Agriculture Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 9 (pp 225-248). Alan R Liss, Inc., New York.

- Redenbaugh, K., Paasch, B., Nichol, J., Kessler, M., Viss, P., Walker, K., (1986). Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. *Bio/Technology*, 4: 797-801.
- Reed, B.M., (1988). Cold acclimation as a method to improve survival of cryopreserved *Rubus* meristems. *CryoLetters* 9: 166–171.
- Reed, B.M., (1992). Cryopreservation of *Ribes* apical meristems. *Cryobiology* 29:740.
- Reed, B.M., (2002). Implementing Cryopreservation for Long-Term Germplasm Preservation in Vegetatively Propagated Species. In: Towill, L.E., Bajaj, Y.P.S. (eds). *Biotechnology in Agriculture and Forestry 50, Cryopreservation of Plant Germplasm II*. Springer.(pp. 22-33).
- Reed B.M., (2008) *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, Springer, USA.
- Reed, B.M., Schumacher, L., Wang, N., D'Achino, J., Barker, R.E., (2006). Cryopreservation of bermudagrass germplasm by encapsulation dehydration. *Crop Sci* 46:6–11.
- Reed, B.M., Uchendu, E., (2008). Controlled rate cooling. In: Reed B.M. (ed.) *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, Springer, USA. pp. 77-92.
- Reinoud, P., (1996). Cryopreservation of tobacco suspension cells by vitrification. Doctoral Paper, Rijks University, Leiden.
- Rota, M. C., Herrera, A., Martinez, R. M., Sotomayor, J. A., Jordan, M. J., (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* 19: 681-687.
- Roustan, J.P., Latche, A., Fallot, J. (1990). Control of carrot somatic embryogenesis by AgNO₃ an inhibitor of ethylene action effect on arginine decarboxylase activity. *Plant Science*, vol. 67, no. 1, p. 89-95.
- Saez, E., Sanchez, P., Piqueras, A., (1994). Micropropagation of *Thymus piperella*, *Plant Cell, Issue and Organ Culture* 39: 269-272.
- Sakai, A., (1960). Survival of a twig of woody plants at -196°C. *Nature* 185:393–394.

- Sakai, A., (1986). Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: Bajaj, Y.P.S. (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 1: Trees. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 113–129.
- Sakai, A., Engelmann, F., (2007). Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLett.* 28: 151–172.
- Sakai, A., Hirai, D., Niino, T., (2008). Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. pp. 33–57. Chapt. 3. Reed, B. M. Ed., Springer, New York, USA.
- Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I., (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9:30-33.
- Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I., (1991). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing method. *Plant Sci* 74:243–248.
- Sakai, A., Matsumoto, T., Hirai, D., Niino, T.I., (2000). Newly developed encapsulationdehydration protocol for plant cryopreservation. *CryoLetters* 21: 53–62.
- Sakai, A., Nishiyama, Y., (1978). Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen. *HortScience* 13: 225–227.
- Sánchez-Romero, C., Panis, B., (2008). Cryopreservation of olive embryogenic cultures. *Cryopreservation of crop species in Europe. Cryoplanet - Cost Action 871. Agrifood Research Working papers* 153. Oulu, Finland.
- Sant, R., Panis, B., Taylor, M., Tyagi, A., (2008). Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 92: 107–111.
- Schafer-Menuhr, A., Schumacher, H. M., Mix-Wagner, G., (1997). Long-term storage of old potato varieties by cryopreservation of shoot-tips in liquid nitrogen. *Plant Genetic Resources Newslett.* 111: 19–24.
- Sciioofs, J., (1992). Rapid clonal propagation; storage and exchange of *Musa* ssp. In: Baker F.W.G. (ed.), *Rapid propagation of fast growing woody species*. CAB Int., Oxon; UK pp. 29 40.

- Scowcroft, W.R., (1984). Genetic variability in tissue culture: Impact on germplasm conservation and utilization. IBPGR Technical Report, International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy, pp:41.
- Scottez, C., Chevreau, E., Godard, N., Arnaud, Y., Duron, M., Dereuddre, J., (1992). Cryopreservation of cold-acclimated shoot tips of pear *in vitro* cultures after encapsulation-dehydration. *Cryobiology* 29: 691–700.
- Scrijnenmakers, E.W.M., Van Iren, F., (1995). A two step or equilibrium freezing procedure for the cryopreservation of plant cell suspensions. In: Day, D.J. and McLellan, M.R.R. (eds.). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press., Totawa, NJ. Pp. 103-111.
- Senula, A., Keller, E.R.J., Sanduijav, T., Yohannes, T. (2007). Cryopreservation of cold-acclimated mint (*Mentha* spp.) shoot tips using a simple vitrification protocol. *CryoLetters* 28: 1-12.
- Shatnawi, M.A., Engelmann, F., Frattarelli, A., Damiano, C., (1999). Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of almond (*Prunus dulcis* Mill). *CryoLetters* 20: 13–20.
- Shibli, R.A., (2000). Cryopreservation of black iris (*Iris nigricans*) somatic embryos by encapsulation-dehydration. *CryoLetters* 21: 39–46.
- Shibli, R.A., Al-Juboory, K.H., (2000). Cryopreservation of “nabali” olive (*Olea europaea* L.) somatic embryos by encapsulation-dehydration and encapsulation vitrification. *CryoLetters* 21: 357–366.
- Stahl-Biskup, E., Sáez, F., (2002). *Thyme: The Genus Thymus. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles*. Taylor and Francis, London and New York. ISBN: 0-415-28488-0.
- Staritsky, G., Zandvoort, E.A., (1985). *In vitro* propagation and genetic conservation of tropical woody crops *Acta Bot. Neerl.* 34: 238.
- Steen, D.A., Chadwick, A.V., (1981). Ethylene effect in pica stem tissue. Evidence of microtubule mediation. *Plant Physiol.* 67:460-466.
- Suzuki, M., Akihama, T., Ishikawa, M., (2004). Cryopreservation of encapsulated gentian axillary buds following 2 step-preculture with sucrose and desiccation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Volume 83, Number 1, 115-121.

- Takagi, H., Thinh, N.T., Sakai, A., Senboku, T., (1997). Cryopreservation of taro *in vitro* grown shoot tips (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. I. Investigation of basic vitrification conditions. *Plant Cell Rep* 16: 594–599.
- Tan, A., (1996). Turkey; Country report to the FAO international technical conference on plant genetic resource, pp. 5-45.
- Tanaka, D., Niino, T., Isuzugawa, K., Hikage, T., Uemura, M., (2004). Cryopreservation of shoot apices of *in vitro* grown gentian plants: comparison of vitrification and encapsulation-vitrification protocols. *CryoLetters* 25: 167–176.
- Tanaka, A., Takahashi, J., (1995). In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 32 (ed.) Bajaj, Y.P.S. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp.500-508.
- Tanino, K.K., Chen, T.H.H., Fuchigami, L.H., Weiser, C.J., (1990). Metabolic alterations associated with abscisic acid-induced frost hardiness in bromegrass suspension culture cells. *Pl Cell Physiol* 31: 505–511.
- Tannoury, M., Vintejou, C., Dereudde, J., (1995). Cryoconservation par encapsulation et déshydratation d'apex d'oeillet (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivés *in vitro*. *Acta Bot Gallic* 142: 415–424.
- Thinh, N.T., Takagi, H., (2000). Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of terrestrial orchids (*Cymbidium* spp.) by vitrification. In: Engelmann, F., Takagi, H. (eds.) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Applications*. JIRCAS, Tsukuba and IPGRI, Rome, pp 441–443.
- Thorpe, T. A., (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37: 69-80.
- Thorpe, T.A., Murashige, T., (1970) Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures. *Can. J. Bot.* 48:277-285.
- Towill, L.E., (1990). *Plant Cell Reports*. 9:178-180.
- Towill, L.E., (2002). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 50. (eds.) Towill, L.E., Bajaj, Y.P.S. *Cryopreservation of Plant Germplasm II*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp. 151-163.

- Towill, L.E., Bonnart, R., (2003). Cracking in a vitrification solution during cooling or warming does not affect growth of cryopreserved mint shoot tips. *CryoLetters* 24:341-346.
- Treben, M., (2008). Tanrı'nın Eczanesinden Sağlık, Ruh ve Madde Yayıncılık (7. Baskı).
- Turner, S.R., Tan, B., Senaratna, T., Bunn, E., Dixon, K.W., Touchell, D.H., (2000). Cryopreservation of the Australian species *Macropidia fuliginosa* (*haemodoraceae*) by vitrification. *CryoLetters* 21: 379–388.
- Tyerman, S.D., Niemietz, C.M., Bramley, H., (2002). Plant aquaporins: Multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ* 25:173–194.
- Uchendu, E., Reed, B.M., (2009). Desiccation Tolerance and Cryopreservation of In-Vitro Grown Blueberry and Cranberry Shoot Tips. *Acta Horticulturae*. 810:567-574.
- Ulrich, J.M., Finkle, B.J., Moore, P.H., Ginoza, H., (1979). Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of a tropical plant. *Cryobiology* 16: 550–556.
- Valladares, S., Toribio, M., Celestino, C., Vietiez, A., (2004). Cryopreservation of embryogenic cultures from mature *Quercus suber* trees using vitrification. *CryoLetters* 25: 177–186.
- Vandenbussche, B., Weyens, G., De Proft, M.P., (2000). Cryopreservation of *in vitro* sugar beet (*Beta vulgaris* L.) shoot tips by a vitrification technique. *Plant Cell Rep* 19: 1064–1068.
- Vasil, I.K., Thorpe, T.A., (1994). *Plant Cell and Tissue Culture*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Vavilov, N., (1992). *Origin and geography of cultivated crops*. Cambridge Univ. Press, UK, pp. 532.
- Venkatachalam, L., Sreedhar, R.V., Bhagyalakshmi, N., (2007). Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers, *In vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 43:267–274.

- Vesely, J., Havlicek, L., Strnad, M., (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur. J. Biochem.* 224:771-786.
- Volk, G.M., Walters, C., (2006). Plant vitrification solution 2 (PVS2) lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology* 52:48-61.
- Vural, M., (2003). *Turkey's endangered plant species*. Workshop report on Biodiversity and Organic Agriculture in Turkey, pp. D168-183.
- Walton, M., (1993) Molecular markers: which ones to use? *Seed World* 131: 22-29.
- Wang, M., Ha, Y., (2007). An electrochemical approach to monitor pH change in agar media during plant tissue culture. *Biosensors and Bioelectronics* 22: 2718–2723.
- Wang, Q., Batuman, Ö., Li, P., Bar-Joseph, M., Gafny, R., (2002). A simple and efficient cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of 'Troyer' citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] by encapsulationvitrification. *Euphytica* 128: 135–142.
- Wang, Q., Laamanen, J., Uosukainen, M., Valkonen, J.P.T., (2005). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulationvitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell Rep* 24: 280–288.
- Werbrouck, S.P.O., Debergh, P.C., (1994). Applied aspects of plant regeneration (mikropropagation). In: Dixon, R.A., Gonzales, R.A. (eds.) *Plant Cell Culture – A Pratical Approach*, pp. 127-135, Oxford Uni. Press., New York.
- Wescott, R.J., (1981). Tissue culture storage of potato germplasm 2. Use of growth retardants. *Potato Res.*, 24:343-352.
- White, P.R., (1934). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol* 9:585–600.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc Acid Res* 18: 6531-6535.

- Withers, L.A., (1979). Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota*). *Plant Physiol* 63: 460–467.
- Withers, L.A., (1991). Biotechnology and plant genetic resources conservation. In: Paroda, R.S., Arora, R., (eds.). *Plant Genetic Resources, Conservation and Managment. Concepts and approaches*. International Board for Plant Genetic Resources, New Delhi, pp. 273-297.
- Withers, L.A., King, P.J., (1979a). The freeze preservation of cultured plant cells. *Experientia* 35: 984.
- Withers, L.A., King, P.J., (1979b). Proline: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea mays* L. *Plant Physiol* 64: 675–678.
- Wilson, E.O., (1988). *Biodiversity*. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R., (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105: 940-949.
- Yang, S.F., Hoffman, N.E. (1884). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, vol. 35, p. 155-189.
- Yang, S.F. (1985). Biosynthesis and action of ethylene. *HortScience*, vol. 20, no. 1, p. 41-45.
- Yoshimatsu, K., Yamaguchi, H., Shimomura, K., (1996). Traits of *Panax ginseng* hairy roots after cold storage and cryopreservation. *Plant Cell Rep* 15: 555–560.
- Zhao, Y., Wu, Y., Engelmann, F., Zhou, M., (2001). Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) in vitro plantlets. *CryoLetters* 22: 321–328.

7. ÖZGEÇMİŞ

03.08.1976 tarihinde İzmir’de doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi İstanbul’da tamamladı. 1996-2000 yılları arasında Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitimini, 2000-2004 yılları arasında Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2002-2004 yılları arasında Muğla Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi’nde araştırma görevlisi olarak çalıştı. 2004 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü’nde doktora programına kayıt yaptırdı. 2010 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde uzman olarak göreve başladı ve halen bu görevde çalışmalarına devam ediyor.

EKLER

EK 1. “THE SIVB 2010 İN VİTRO BIOLOGY MEETING” ADLI KONGREDE SUNULAN BİLDİRİNİN ÖZETİ

Development of efficient micropropagation and cryopreservation protocols for *Thymus* germplasm

Abstract:

Thymus is one of the most important genus of the *Lamiaceae* family, that serves as a natural source of phenolic oils, oleoresins, fresh and dried herbs, extensively used all around the world, both for medicinal and non-medicinal purposes. However, natural *Thymus* populations are unfortunately far from being adequate to support such a great and even growing demand for its products. Furthermore, interests of the cosmetic and food industries, focusing mainly on few selected chemotypes, lead to the loss of the others in nature, which indeed should be preserved to make available the access to a wide range of genetic diversity to be used as a possible source of natural products. In this sense, recently developed biotechnological approaches provide unique alternatives for the high-rate multiplication and long-term maintenance of plant germplasm. Among these, ‘*in vitro* micropropagation’ enables fast and safe propagation of clonal plants under controlled environmental conditions, free of biotic and abiotic stresses, while ‘cryopreservation’ make available the cost-effective long-term storage of their germplasm at ultra low temperatures (e.g., in liquid nitrogen at -196°C). At such temperature, almost all the biological reactions within the cells are hampered, paving the way to store the material for theoretically unlimited periods of time. Present study was conducted to develop such protocols for *Thymus* germplasm. Optimizations for micropropagation involved the use of cytokinins, auxins, silver nitrate and gibberellic acid, alone or in combination, for the induction of multiple shoots. Best shoot proliferation (97% of regeneration, with 8.6 shoots produced per explant) was obtained when semi-solid MS medium was supplemented with 1 mg l⁻¹ kinetin and 0.3 mg l⁻¹ GA₃. Rooting was easily obtained on semi-solid MS medium, either hormone-free or supplemented with auxins. Cryopreservation methods applied were vitrification-based one-step freezing approaches, namely (i) PVS2 vitrification, (ii) encapsulation-vitrification, and (iii) droplet-freezing. All three methods showed to be effective to induce cryotolerance of thyme shoot tips, obtained from *in vitro* propagated plantlets.

Keywords: Cryopreservation, *in vitro* micropropagation, *Thymus vulgaris* L.

**EK 2. “THE SIVB 2010 İN VİTRO BIOLOGY MEETING” ADLI
KONGREDE KAZANILAN ÖDÜLÜ BELGELEYEN YAZI**

Dear Ergun Kaya:

Congratulations on your selection as the 2010 recipient of the Philip R. White Award in the amount of \$650.00. The Student Affairs Committee has selected your abstract entitled, “Development of efficient micropropagation and cryopreservation protocols for Thymus germplasm,” as a 2010 award winner.

We have planned a special breakfast meeting on Wednesday, June 9, at 7:30 am for the Student Affairs Committee and 2010 Award recipients. You are invited to attend this important meeting and thank the committee members, as well as address any issues pertaining to student participation in the Society for In vitro Biology.

Your award will be presented during the SIVB Business Meeting on Monday, June 7, 2010. In order to receive your certificate, please plan on attending this meeting from 7:00 pm – 8:00 pm. On Tuesday, June 8, the Society will present a symposium on “How to Get the Most Out of a Scientific Conference” from 7:00 pm – 9:00 pm. This informal session will have experienced panelists who are willing to share their tips on how to get the most from a scientific conference. Whether you are looking for strategies on how to network and meet potential future employers, or find helpful approaches to making your conference experience productive and enjoyable, this is the place to be! During this session, a diverse panel of participants will solicit questions and discuss ways to make the most of your conference experience. Students are encouraged to attend all of these events to interact with the speakers, Education Committee, other student attendees, and members of the SIVB Board of Directors.

I have enclosed an Expense Reimbursement Form that must be submitted to the SIVB Business Office after the meeting in order for you to receive maximum reimbursement travel expenses up to the amount granted. Please note that you will receive the award only if you are able to attend the meeting. If the amount of the award is insufficient to allow you to cover your costs for travel and attendance at the meeting, you can use the receipt of this award as leverage to obtain further funding from other sources, including your institution.

The Society for In vitro Biology (SIVB) is pleased to recognize outstanding science and encourages scientific excellence at all levels. Congratulations again and I look forward to meeting you in St. Louis, Missouri.

Regards,

Marietta Wheaton Ellis

Meeting Secretariat

**EK 3. “28th INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS (IHC)”
ADLI KONGREDE SUNULAN BİLDİRİNİN ÖZETİ**

Development of in vitro propagation, slow growth storage and cryopreservation protocols for short-, medium- and long-term conservation of young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* and *T. longicaulis*)

Abstract :

Thyme is one of the most important genus of the Lamiaceae family, covering more than 400 perennial species of aromatic and medicinal shrubs/subshrubs. It serves as a natural source of phenolic oils, oleoresins, fresh and dried herbs. Non-medicinal use of the plant (e.g., food additives, cosmetic and alimentary industries, landscape plants) is also of great importance. However, natural thyme populations are unfortunately far from being adequate to support such a great and even growing demand for its products. In this sense, recently developed in vitro propagation techniques provide a unique alternative for the high-rate multiplication of plants of horticultural, economic and medicinal importance, and pave the way to medium- and long-term conservation of such valuable germplasm by means of slow growth storage and cryopreservation.

Present study was designated to develop effective protocols for in vitro propagation, slow growth storage and cryopreservation of young (i.e., shoot tips originating from young seedlings) and mature explants (i.e., shoot tips originated from mature plants) of two distant *Thymus* species, i.e., *T. vulgaris* and *T. longicaulis*, in order to ensure its applicability to a wide range of thyme germplasm. Optimizations for in vitro shoot proliferation included use of cytokinins (6-benzyladenine, kinetin and thidiazuron) alone or in combination with auxins, gibberellic acid and/or silver nitrate. Shoot rooting was easily obtained on semi-solid MS medium, either hormone-free or supplemented with auxins. Rooted plantlets were transferred to 250-ml plastic pots and acclimatized successfully by gradually reducing the relative humidity. Slow growth storage was achieved by keeping the in vitro shoot cultures at 4°C and in darkness up to 12 months. Three different vitrification-based one-step freezing techniques (PVS2 vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-freezing) were tested for cryopreservation, however initially all the preliminary steps of cryoprotection (i.e., cold-hardening, sucrose preculture) were also optimized.

Keywords: Conservation, propagation, thyme

EK 4. “THE SIVB 2011 IN VITRO BIOLOGY MEETING” ADLI KONGREDE SUNULAN BİLDİRİNİN ÖZETİ

An Endemic Species from Turkey “*T. cariensis* Hub.-Mor. & Jalas”; *in vitro* propagation and Cryopreservation

Abstract:

Among the aromatic plants belonging to the family Lamiaceae, the genus *Thymus* is remarkable for the numerous species and varieties of wild-growing plants. Many of these species are typical for the Mediterranean area. The genus *Thymus* is represented in Turkey by 38 species, and the ratio of endemism in the genus is 53%. Several *Thymus* species are locally known as “kekik” and their dried herbal parts are used in herbal tea, spices and traditional medicines. The essential oils of some *Thymus* spp. are characterized by the presence of high concentration of the isomeric phenolic monoterpenes thymol and/or carvacrol. *In vitro* propagation of *Thymus cariensis* Hub.-Mor. & Jalas (Lamiaceae), an endemic and from western Anatolia (Mugla to Fethiye 40th km) was investigated. Shoot segments (about 10 cm-long) of *T. cariensis* were washed thoroughly under running tap water for one hour, then soaked in 70% ethanol for 10-15 sec, and decontaminated by 30- min 2.5% and 60-min treatment with 1.5% commercial bleach, followed by rinses in sterile dH₂O. They were then cut into 1-1.5 cm-long shoot tip explants and used for *in vitro* propagation trials. Decontaminated explants transferred the best growth and rooting medium that previous studies was determined for *T. vulgaris* L. The optimized *in vitro* propagation protocol for *T. vulgaris* was then tested to initiate and establish micropropagation from mature shoot tips of *T. cariensis*, shoot proliferation 95.7% of regeneration, with 1.27 shoots produced per explant) was obtained when semi-solid Murashige and Skoog (MS) medium was supplemented with 1 mg l⁻¹ kinetin and 0.3 mg l⁻¹ GA₃. Shoot rooting was easily obtained on semi-solid MS medium, either hormone-free or supplemented with auxins. However, the best root apparatus (100% of rooted shoots with 11.95 adventitious roots per shoot) developed on MS medium supplemented with 0.05 mg l⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.. Rooted plantlets of both the species were transferred to 250-ml plastic pots and acclimatized successfully by gradually reducing the relative humidity. Cryopreservation methods applied were vitrification-based one-step freezing approach, namely droplet-freezing. *T. cariensis* was successfully cryopreserved using the droplet vitrification method. After cold adaptation (two week +4°C) and sucrose preculture (MS medium with 0.25M sucrose 48 hours), shoot tips were dehydrated with PVS2 at 0°C for 15-30-60-...120 minute and immersed liquid nitrogen. For thawing, shoot tips were transferred into 1.2M sucrose solution for 20 minute and then shoot tips was transferred MS medium was supplemented with 1 mg l⁻¹ kinetin and 0.3 mg l⁻¹ GA₃ that described regeneration medium. Best vitality (%20) and regeneration (%18.3) result were obtained when PVS2 at 0°C for 90 minute.

Keywords: *T. cariensis* Hub.-Mor. & Jalas, *in vitro* propagation, cryopreservation.

**EK 5. “THE SIVB 2011 IN VITRO BIOLOGY MEETING” ADLI
KONGREDE KAZANILAN ÖDÜLÜ BELGELEYEN YAZI**

Dear Ergun Kaya:

Congratulations on your selection as the 2011 recipient of the SIVB Student Travel Award in the amount of \$300.00. The Student Affairs Committee has selected your abstract #15201010-thymus entitled, “In vitro Propagation and Cryopreservation of an Endemic Species of Turkey, “*T. cariensis* Hub.-Mor. & Jalas,” as the 2011 award winner.

We have planned a special breakfast meeting on Tuesday, June 7, at 7:00 a.m. for the Student Affairs Committee and 2011 Award recipients. You are invited to attend this important meeting and thank the committee members, as well as address any issues pertaining to student participation in the Society for In vitro Biology.

Your award will be presented during the SIVB Business Meeting on Tuesday, June 7, 2011. In order to receive your certificate, please plan on attending this meeting from 5:00 pm – 5:30 pm. On Sunday, June 5, the Society will host a Keynote Symposium, which will be followed by the Opening Ceremony Reception. Following the reception is a special workshop on “Writing and Submitting a Scientific Paper.” This symposium will discuss issues associated with the paper submission process. Additionally, there will be a special networking luncheon session on Monday, June 6 to discuss the information presented at the Sunday session as well as to determine what other areas of career development are necessary to the young SIVB scientist and could be focused on for the 2012 Student Committee hosted sessions. Lastly, there will be a Career Workshop/Expo on Monday, June 6 from 5:00 pm – 6:00 pm where you can collect information, meet new people and learn to write an attractive CV. Students are encouraged to attend all of these events to interact with the Keynote Speaker, Education Committee, other student attendees, and members of the SIVB Board of Directors.

I have enclosed an Expense Reimbursement Form that must be submitted to the SIVB registration desk or the Business Office after the meeting in order for you to receive maximum reimbursement travel expenses up to the amount granted. Please note that you will receive the award only if you are able to attend the meeting. If the amount of the award is insufficient to allow you to cover your costs for travel and attendance at the meeting, you can use the receipt of this award as leverage to obtain further funding from other sources, including your institution.

The Society for In vitro Biology (SIVB) is pleased to recognize outstanding science and encourages scientific excellence at all levels. Congratulations again and I look forward to meeting you in Raleigh, North Carolina.

Regards,

Marietta Wheaton Ellis

SIVB Meeting Secretariat

EK 6.

In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant
DOI 10.1007/s11627-011-9347-6

MICROPROPAGATION

In vitro propagation from young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* and *T. longicaulis*) resulting in genetically stable shoots

Elif Aylin Ozudogru · Ergun Kaya · Emrah Kirdok · Saliha Issever-Ozturk

Received: 22 October 2009 / Accepted: 24 January 2011 / Editor: N.J. Taylor
© The Society for In Vitro Biology 2011

Abstract An efficient *in vitro* propagation protocol, applicable both to young and mature explants of two *Thymus* spp., results in genetically stable plantlets. *In vitro*-grown shoot tips of *Thymus vulgaris* L. were exposed to cytokinins (6-benzyladenine, kinetin, and thidiazuron) alone or in combination with auxins, gibberellic acid (GA₃) and/or silver nitrate in order to optimize *in vitro* shoot proliferation. Optimum shoot proliferation (97% regeneration rate, with 8.6 shoots produced per explant) was obtained when semi-solid Murashige and Skoog (MS) medium was supplemented with 1 mg L⁻¹ kinetin and 0.3 mg L⁻¹ GA₃. Rooting of the shoots was easily obtained on semi-solid MS medium that was either hormone-free or supplemented with auxins. However, the best root apparatus (92.5% rooting rate, with 19 adventitious roots per shoot) developed on MS medium supplemented with 0.05 mg L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Genetic stability was confirmed in the *in vitro*-germinated mother plant as well as the shoots that underwent two, four, six, eight, or ten cycles of *in vitro* subculturing by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. When applied to the micropropagation of mature shoot tips of *T. longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *subisophyllus* (Borbás) Jalas, the optimized *in vitro* propagation protocol resulted in a 97.5% shoot regeneration rate, with five shoots formed per explant,

and 100% rooting. Rooted plantlets of both species were transferred to 250-mL plastic pots and successfully acclimatized by gradually reducing the relative humidity.

Keywords *In vitro* proliferation · Genetic stability · RAPD · *T. longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *subisophyllus* (Borbás) Jalas · *T. vulgaris* L.

Introduction

Thymus, commonly called “thyme,” is one of the most important genera of the *Lamiaceae* family and includes more than 400 perennial species of aromatic and medicinal shrubs or subshrubs. It is native to the Mediterranean region (Sáez 2001; Morales 2002). Turkey contains the greatest diversity within this genus, with 38 species, 53% of which are endemic (Tumen *et al.* 1998).

Thymus spp. serve as a natural source of phenolic oils, oleoresins, fresh and dried herbs (Lawrence and Tucker 2002) and are extensively used all around the world, both for medicinal and non-medicinal purposes. Due to their antiseptic, carminative, antimicrobial and antioxidative properties (Letchamo *et al.* 1995; Baranauskiene *et al.* 2003), *Thymus* spp. have been used for many centuries in traditional medicine (Stahl-Biskup 2002). On the other hand, non-medicinal use of the plant is also of great economical importance in the world market. For instance, essential oils extracted from flowers and leaves are used widely in cosmetic and alimentary industries, serving as a preservative and aromatic additive for foods and pharmaceuticals. Leaves, either fresh or dry, are used to add flavor to foods (Senatore 1996; Simon *et al.* 1999). In addition to industrial and commercial use, *Thymus* species are also grown as landscape plants with beautiful white, cream, pink

E. A. Ozudogru (✉) · E. Kaya · E. Kirdok · S. Issever-Ozturk
Department of Molecular Biology and Genetics,
Gebze Institute of Technology,
Faculty of Science,
Istanbul Caddesi, No 101,
41400, Gebze, Kocaeli, Turkey
e-mail: elif@gyte.edu.tr

E. A. Ozudogru
e-mail: aylin_ozudogru@yahoo.com

Published online: 17 March 2011

 Springer

or violet flowers (Lawrence and Tucker 2002). World production of thyme oil is estimated to be US \$1.2 million (in <http://www.ienica.net>). The annual global trade of thyme is about 15,000 ton. Turkey is the largest producer and exporter, by about 11,000 ton (in <http://www.turkeyisready.com>), followed by Mexico, Greece, and Israel. The major countries importing *Thymus* from Turkey are the USA, Germany, Italy, and Canada (Sari and Oguz 2000).

Natural *Thymus* populations are far from being adequate to support such a large, and even growing, demand for its products. Furthermore, interests of the cosmetic and food industries in mainly a few chemotypes, lead to the loss of other species, such as *Thymus cariensis*, *Thymus cilicicus*, *Thymus sipyleus*, *Thymus pulvinatus*, and *Thymus cherlerioides* in nature (Rey and Sáez 2002). Preservation of a wide range of genetic diversity for use as possible sources of natural products is therefore important. Recently developed *in vitro* propagation techniques provide high-rate multiplication alternatives for plants of horticultural, economic and medicinal importance (Pati *et al.* 2006). *In vitro* propagation techniques also provide capacity for medium- to long-term conservation of such valuable germplasm by means of slow growth storage and cryopreservation (Previati *et al.* 2008). However, despite such advantages and potential applications, to date only a few reports exist detailing *in vitro* propagation of *Thymus* spp. (Furmanowa and Olszowska 1992; Baba Erdag and Yurekli 2000; Fratemale *et al.* 2003). Among these, only Furmanowa and Olszowska focused on *in vitro* propagation of *Thymus vulgaris*, initiating *in vitro* cultures using apical and axillary buds collected from plants grown in the field and multiplying nodal segments on semi-solid Nitsch and Nitsch medium (Nitsch and Nitsch 1969) containing kinetin and IBA or NAA. Additional reports provide protocols of micropropagation or organogenesis in *Thymus mastichina* L., *T. sipyleus* Boiss. and *Thymus piperella*. To date, therefore, a highly efficient micropropagation protocol that can be widely applied to the genus is still lacking.

The present study was undertaken to develop an effective *in vitro* propagation protocol both for young (shoot tips excised from *in vitro*-germinated young seedlings) and mature explants (shoot tips collected from mature plants) of two distant *Thymus* species, *i.e.*, *T. vulgaris* L. and *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *subisophyllus* (Borbás) Jalas.) The two species were selected for their valuable content of bio-active compounds. The availability of effective micropropagation protocols will allow the production of plants genetically identical to the selected donor plant and will facilitate commercial production of the phenolic monoterpenes. Therefore, reproduction by tissue culture must preserve the genetic stability of the selected shoot lines. Here, the reliability of the *in vitro* propagation protocol in regards to the genetic

stability of the produced plantlets was examined at the molecular level by random amplified polymorphic DNA (RAPD; Williams *et al.* 1990).

Materials and Methods

Plant material. Seeds of *T. vulgaris* were provided by Florsilva (Bologna, Italy). Shoot segments of *T. longicaulis* were obtained from mature plants in Gebze, Kocaeli, Turkey. As seeds of *T. vulgaris* could be obtained in high quantities, optimization of tissue culture procedures for multiple shoot proliferation, rooting and acclimatization were performed using shoot tips obtained from *in vitro*-germinated seedlings of this species.

Decontamination of seeds and shoot segments. Seeds of *T. vulgaris* were decontaminated according to the protocol previously developed for peanut seeds (Ozudogru *et al.* 2005). In short, the seeds were surface sterilized by soaking in 70% ethanol for 5 min and disinfected by a 5-min treatment with 10% H₂O₂ and a 15-min treatment with 20% commercial bleach (at 2% active chlorine, Domestos, Unilever, London, UK), with consecutive rinses in sterile dH₂O after each step.

Shoot segments of *T. longicaulis* about 10 cm long were washed thoroughly under running tap water for 1 h, then soaked in 70% ethanol for 10–15 s, dried under the sterile air current of a laminar flow hood for 25–30 min, and decontaminated by a 10-, 30- or 60-min treatment with 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, or 4% commercial bleach, followed by rinses in sterile dH₂O. The segments were then cut into 1- to 1.5-cm long shoot tip explants and used for *in vitro* propagation trials.

Germination of *T. vulgaris* seeds. Decontaminated seeds of *T. vulgaris* were germinated either *ex vitro* by sowing seeds in sterile soil in 1.8 L pots or *in vitro* by placing seeds on semi-solid MS medium (Murashige and Skoog 1962) devoid of growth regulators (MS.0) and maintained under the standard culture conditions described below. Germinated seedlings served as stock plants for the shoot-tip explants.

***In vitro* propagation of shoot tips on MS media supplemented with growth regulators.** Shoot tips of *T. vulgaris*, excised from *in vitro*-germinated seedlings at 1–1.5 cm in length, were cultured on MS medium supplemented with 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, or 3 mg L⁻¹ 6-benzyladenine (BA), kinetin (KIN), or thidiazuron (TDZ) and were maintained by monthly subcultures to fresh medium of the same type. Cytokinin type and concentration was then tested in combination with auxins (0.01, 0.05, 0.1, or 1.0 mg L⁻¹

indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-butyric acid (IBA), α -naphthaleneacetic acid (NAA) or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and/or silver nitrate (AgNO_3 , 1, 2, 4, 6, or 8 mg L^{-1}), and gibberellic acid (GA_3 , 0.1, 0.3, or 0.6 mg L^{-1}) for determination of the best *in vitro* proliferation conditions.

T. longicaulis shoot tips were cultured on semi-solid MS medium containing 1.0 mg L^{-1} KIN and 0.3 mg L^{-1} GA_3 , for induction of *in vitro* shoot proliferation.

Culture conditions. All MS media were supplemented with 30 g L^{-1} sucrose and gelled with 3 g L^{-1} phytigel (Sigma®, St. Louis, MO). The pH was adjusted to 5.8 with either 1 N NaOH or HCl prior to addition of phytigel and autoclaved for 20 min at 121°C (1.4 kg cm^{-2}). The cultures were incubated at 23±2°C, under a 16-h photoperiod, with light provided by cool daylight fluorescent lamps (36.3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

In vitro rooting and acclimatization. Multiple shoot clusters of *T. vulgaris* were transferred to MS medium supplemented or not with 0.01, 0.05, 0.1, or 1.0 mg L^{-1} of either IAA, IBA, NAA, or 2,4-D for rooting of the shoots. Rooted shoots were acclimatized under greenhouse conditions by transferring them into 250-mL plastic pots and gradually decreasing the relative humidity. Nitrogen-rich peat, of high nutrient retention and water-holding capacity, that was free of weed seeds and pathogens, was used during acclimatization. Plants were irrigated daily for the first 3 d, in 2-d intervals between the 4th and 7th days, and in 3-d intervals for the rest of the acclimatization period.

Micropropagated shoots of *T. longicaulis* were transferred to semi-solid MS medium, supplemented with 0.05 mg L^{-1} 2,4-D for rooting. Rooted plantlets were acclimatized under the same conditions as *T. vulgaris*.

Experimental design, data collection, and statistical analysis. More than 600 seeds were used for *in vitro* germination trials. About 3,000 seeds were sown in soil and left to germinate *ex vitro*. Germination rate (%), mean shoot number (no. ± standard error (SE)) and mean shoot length (cm ± SE) of the seedlings were recorded 6 wk later.

For *T. longicaulis*, 60 shoot tips were decontaminated, transferred to glass test tubes, containing 10 mL of semi-solid medium, and evaluated for the appearance of contamination. Experiments were repeated at least three times, and percentage of the shoot tips showing no contamination was recorded 4 wk later.

Three Petri dishes (replicates), each containing 30 shoot tips, were used for each *in vitro* proliferation treatment, and each experiment was repeated at least twice. Data of *in vitro* proliferation were recorded 4 wk after culture initiation and consisted of (a) the percentage of shoot tips that generated at least one elongated shoot, (b) the mean number of shoots

formed per regenerating explant (no ± SE), (c) the mean length of elongated shoots (cm ± SE), and (d) the SFC (shoot-forming capacity; Lambardi *et al.* 1993) index, which was calculated as follows:

$$\text{SFC} = (\text{average no of shoots per regenerating explant}) \times (\% \text{ of regenerating explant})/100$$

Rooting of shoots was evaluated 6 wk after transfer of elongated shoots onto rooting media. Shoots were considered rooted when at least one adventitious root of at least 0.3 cm in length was produced. Rooting data consisted of (a) the percentage of the rooted shoots, (b) the mean number of roots per rooted shoot (no. ± SE), (c) the mean length of roots per rooted shoots (cm ± SE), and (d) the RFC (root forming capacity) index, calculated by adapting the formula given above.

Statistical analysis of the non-parametric data (frequencies) was carried out by means of the test for homogeneity of proportions, and significant treatment differences were selected by a non-parametric statistical test, the post hoc multiple comparisons test (Marascuilo and McSweeney 1977). Discrete data were subjected to ANOVA, followed by the least significant difference test at $P \leq 0.05$ to compare means.

Detection of genetic stability of *T. vulgaris* shoots by RAPD analysis. Genomic DNA of the *in vitro*-germinated mother plant and *in vitro*-propagated shoots, obtained after two, four, six, eight, and ten cycles of monthly subculturing, were isolated by slightly modifying the protocol developed by Doyle and Doyle (1987). Following each subculture period, fresh leaves of all the *in vitro*-propagated plantlets (about 30 shoots) were bulked in order to obtain a minimum of 2 g of ground leaf extract. The leaves were incubated at 65°C for 1 h in 20 mL of CTAB 1 solution (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 0.2% (v/v) β -mercaptoethanol, 500 mg PVP). Ten milliliters of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) was added before centrifugation at 7,000×g for 30 min at room temperature. Supernatant was incubated again with 2 mL of CTAB 2 solution (10% CTAB and 0.7 M NaCl) before 20 mL of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) was added, followed by centrifugation at 8,500×g for 30 min at 4°C. Supernatant was removed and the DNA pellet washed with chilled ethanol solution (75% ethanol, 10 mM ammonium acetate), dried, and resuspended in 500 μL TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5 and 1 mM EDTA, pH 8.0). RNA and proteins were removed by 45-min RNase A (0.1 mg mL^{-1}) and 30-min Proteinase K (0.01 mg mL^{-1}) treatments at 37°C. DNA concentration was determined by spectrophotometer (DU® 530, Life Science UV/Visible Spectrophotometer, Beckman Coulter, High Wycombe, UK) and checked for integrity on 1% w/v agarose gel.

PCR amplification was performed in a 25 μ l reaction volume, containing 60 ng genomic DNA, 50 ng primer (Kits OPF and OPK, Operon Technologies, Alameda, CA), 2.5 μ l 10 \times buffer (containing 15 mM MgCl₂), 200 μ M dNTP mix, 1 u *Taq* DNA polymerase (Roche, Fribourg, Switzerland) and sterile dH₂O. Amplifications were performed in a Dual-block Thermocycler (PTC-200, Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc., Waltham, MA), using the following PCR program: 5 min initial denaturation step at 95°C, 35 cycles of 30 s at 95°C, 1 min at 35°C and 1 min 40 s at 72°C, followed by 8 min at 72°C for a final extension. Twenty arbitrary primers were tested (see Table 1) to obtain band profiles. For each primer, amplification reactions were repeated at least twice and only those producing reproducible band patterns were used. PCR products were separated on a 1% agarose gel using 1 \times TAE buffer and stained with ethidium bromide (0.1 μ g L⁻¹). Reaction mixture, devoid of genomic DNA, was used as a negative control. Positive control contained a genomic DNA isolated from fresh leaves of *T. longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*, collected from Bolu, Turkey. Size marker used was 1 kb GeneRuler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). DNA fragments were scored by their presence (1) or absence (0), and the ones at low intensities were scored only if they were reproducible in both the PCR runs.

Results and Discussion

In vitro propagation of *T. vulgaris*. Decontamination and germination of seeds. The decontamination protocol developed for peanut seeds (Ozudogru *et al.* 2005) was found to be effective for thyme seeds, with all seeds remaining free of contamination after this treatment. Decontaminated seeds were then germinated either *ex* or *in vitro*. Germination in soil was poor, at only 0.80% germination 45 d after sowing. Germination *in vitro*, however, produced a 79% germination rate 45 d after sowing, with all seeds producing multiple shoots (mean shoot number=3.07 \pm 0.22), with an average length of 1.73 \pm 0.01 cm (Fig. 1A).

Effect of cytokinins on multiple shoot formation. No statistical difference was observed between the different cytokinins in terms of overall average results (bold values in Table 2). However, for each cytokinin type, the applied concentrations significantly influenced the formation of multiple shoots. The greatest multiple shoot formation rate was obtained when tissues were cultured on MS medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ KIN. This enabled a 85% regeneration rate and produced an average of 5.0 healthy shoots more than 1 cm long per regenerating explant. Decreasing the KIN content by half produced only a slight decrease in regeneration rate (73.3%) and mean shoot

Table 1. Oligonucleotide sequences and RAPD amplification results of *Thymus vulgaris* shoots

Oligonucleotid primer	Sequence (5'-3')	No. of scored bands	No. of polymorphic bands	Polymorphism percentage (%)
F03	CCT GAT CAC C	17	–	0
F05	CCG AAT TCC C	16	–	0
F08	GGG ATA TCG G	13	–	0
F09	CCA AGC TTC C	20	–	0
F10	GGA AGC TTG G	21	–	0
F11	TTG GTA CCC C	4	–	0
F13	GGC TGC AGA A	9	–	0
F14	TGC TGC AGG T	10	–	0
F15	CCA GTA CTC C	6	–	0
F16	GGA GTA CTG G	18	–	0
F18	TTC CCG GGT T	–	–	–
K01	CAT TCG AGC C	11	–	0
K02	GTC TTC GCA A	14	–	0
K03	CCA GCT TAG G	14	–	0
K06	CAC CTT TCC C	13	–	0
K07	AGC GAG CAA G	11	–	0
K08	GAA CAC TGG G	9	–	0
K09	CCC TAC CGA C	6	–	0
K10	GTG CAA CGT G	4	–	0
K11	AAT GCC CCA G	13	–	0
Total		229	–	0

IN VITRO PROPAGATION OF THYMUS SPP.

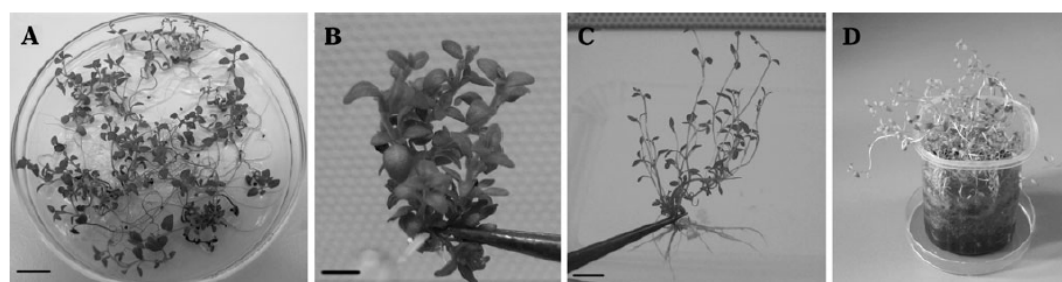


Figure 1. *In vitro* proliferation of *Thymus vulgaris*. **A**, *In vitro*-germinated seedlings, used as explant source (*bar*, 1.35 cm). **B**, Multiple shoots, obtained by culturing on semi-solid MS medium containing 1.0 mg L^{-1} KIN and 0.3 mg L^{-1} GA₃ (*bar*, 0.25 cm). **C**, A

rooted shoot, after the culture on semi-solid MS medium supplemented with 0.05 mg L^{-1} 2,4-D (*bar*, 1.50 cm). **D**, plants after acclimatization in 250-mL plastic pots.

number (3.1). On the contrary, increasing the KIN concentration had a detrimental effect on *in vitro* proliferation, evident especially in terms of regeneration rate (ranging between 20.0 and 53.3) and SFC index (ranging

between 0.9 and 2.4). Among these, 2.5 mg L^{-1} KIN was also effective for inducing multiple shoot formation (5.4), however the regeneration rate (46.7%), and hence the SFC index (2.5), were lower than that observed in the presence

Table 2. Effect of cytokinins on multiple shoot formation of *Thymus vulgaris*

Cytokinin concentration (mg L^{-1})	Regeneration rate (%) ^a	Mean shoot number (no. \pm SE) ^b	Mean shoot length (cm \pm SE) ^b	Shoot-forming capacity (SFC) index ^c
BA	53.0 A	4.4 \pm 0.5 A	0.7 \pm 0.04 B	2.3
0.5	41.6 b	4.0 \pm 0.8 a	0.6 \pm 0.08 a	1.7
1.0	53.3 a, b	5.1 \pm 1.6 a	0.7 \pm 0.07 a	2.7
1.5	51.7 a, b	2.9 \pm 0.4 a	0.6 \pm 0.07 a	1.5
2.0	65.0 a	4.4 \pm 1.4 a	0.8 \pm 0.06 a	2.9
2.5	56.7 a	6.0 \pm 1.2 a	0.8 \pm 0.13 a	3.4
3.0	50.0 a, b	3.9 \pm 0.7 a	0.6 \pm 0.09 a	1.9
KIN	53.9 A	4.2 \pm 0.3 A	1.1 \pm 0.05 A	2.3
0.5	73.3 a	3.1 \pm 0.5 b	1.4 \pm 0.11 a	2.3
1.0	85.0 a	5.0 \pm 0.6 a	1.1 \pm 0.12 a, b	4.2
1.5	53.3 b	4.5 \pm 0.9 a, b	0.9 \pm 0.10 b	2.4
2.0	45.0 b	2.9 \pm 0.3 b	1.1 \pm 0.13 a, b	1.3
2.5	46.7 b	5.4 \pm 0.8 a	0.9 \pm 0.13 b	2.5
3.0	20.0 c	4.5 \pm 1.4 a, b	0.9 \pm 0.16 b	0.9
TDZ	50.6 A	3.1 \pm 0.2 B	0.7 \pm 0.03 B	1.6
0.5	55.0 a, b	3.6 \pm 0.8 a	0.6 \pm 0.04 a, b	2.0
1.0	55.0 a, b	2.8 \pm 0.4 a, b	0.4 \pm 0.03 b	1.5
1.5	51.7 a, b	3.4 \pm 0.6 a	0.9 \pm 0.12 a	1.7
2.0	61.7 a	3.4 \pm 0.5 a	1.0 \pm 0.10 a	2.1
2.5	45.0 b	1.6 \pm 0.2 b	0.5 \pm 0.05 a, b	0.7
3.0	35.0 b	3.3 \pm 0.8 a, b	0.6 \pm 0.05 a, b	1.2

Different *capital letters* indicate significant differences between cytokinins. *Lower case letters* indicate significant differences between the different concentrations for each cytokinin. $P \leq 0.05$

SE standard error

^a Percentage values statistically analyzed by a non-parametric test, the post hoc multiple comparisons test (Marascuilo and McSweeney 1977)

^b Statistical analysis performed by ANOVA, followed by LSD test at $P \leq 0.05$

^c SFC = (average no. of shoots per regenerating explant) \times (% of regenerating explant) / 100

of 1.0 mg L⁻¹ KIN. Supplementing BA or TDZ in the proliferation medium did not yield shoot proliferation as satisfactorily supplementation with KIN. Indeed, the greatest regeneration rates were only 65.0% and 61.7% when the medium contained BA and TDZ, respectively. Such a favorable effect of KIN was also found when three different cytokinins (BA, KIN, and 2-isopentenyl adenine) were tested for efficiency in promoting *in vitro* regeneration of *T. vulgaris* (Furmanowa and Olszowska 1992), although the authors reported that the optimum concentration was lower (0.1 mg L⁻¹) than that reported here. In contrast, BA seemed to be more suitable when working with *T. piperella* (Sáez *et al.* 1994), *T. mastichina* L. (Mendes and Romano 1999; Fraternali *et al.* 2003) and *T. sipyleus* Boiss. (Baba Erdag and Yurekli 2000).

Accordingly, 1.0 mg L⁻¹ KIN was considered optimal for testing in combination with auxins and/or AgNO₃ and GA₃ in order to induce even greater *in vitro* proliferation (*see below*).

Effect of auxins on multiple shoot formation. Usually a combination of two or more different types of growth regulators is required for successful *in vitro* shoot proliferation, with the cytokinin–auxin interaction considered to be the most important for regulating plant growth (Evans *et al.* 1981). In accordance, overall mean results of the present study indicated that *T. vulgaris* shoot tips respond better when the medium is enriched with auxin, and that NAA was the most effective of the auxins tested here (Table 3). Indeed, addition of NAA to the KIN increased the average regeneration rate of shoot tips by 1.3, mean shoot number by 1.5, mean shoot length by 1.3, and SFC index by 1.9. Among the various concentrations tested, the inclusion of 0.1 mg L⁻¹ NAA resulted in a decrease in regeneration rate in comparison to KIN alone (85.0% vs. 66.7%). However, this medium formulation produced by far the best condition of shoot proliferation, as it enabled the proliferation of 9 shoots per regenerating explant and resulted in a very high SFC index (6.0). Moreover, the shoots were, on average,

Table 3. Effect of KIN (1 mg L⁻¹) and auxin combinations on multiple shoot formation of *Thymus vulgaris*

Auxin concentration (mg L ⁻¹)	Regeneration rate (%) ^a	Mean shoot number (no. ± SE) ^b	Mean shoot length (cm ± SE) ^b	Shoot-forming capacity (SFC) index ^c
IAA	60.4 B	3.2±0.3 BC	1.6±0.08 A	1.9
0.01	56.7 a	3.8±0.8 ab	1.6±0.12 a	2.1
0.05	65.0 a	2.7±0.5 b	1.9±0.19 a	1.7
0.1	63.3 a	4.5±0.8 a	1.8±0.16 a	2.8
1.0	56.7 a	1.8±0.3 b	0.9±0.09 b	1.0
IBA	64.6 B	5.2±0.8 AB	1.2±0.05 A	3.3
0.01	61.7 a, b	3.2±0.4 b	1.2±0.11 a	2.0
0.05	75.0 a	7.8±2.3 a	1.3±0.09 a	5.8
0.1	63.3 a, b	4.1±0.6 a, b	1.2±0.09 a	2.6
1.0	58.3 b	5.3±1.4 a, b	1.2±0.10 a	3.1
NAA	72.5 A	6.1±0.9 A	1.4±0.06 A	4.4
0.01	85.0 a	4.6±1.0 a	1.2±0.07 a	3.9
0.05	55.0 b	6.9±3.3 a	1.5±0.15 a	3.8
0.1	66.7 b	9.0±2.1 a	1.4±0.09 a	6.0
1.0	83.3 a	4.9±1.0 a	1.5±0.18 a	4.1
2,4-D	33.3 C	2.6±0.8 C	1.0±0.06 B	0.9
0.01	56.7 a	4.2±1.8 a	1.1±0.09 a	2.4
0.05	58.3 a	1.4±0.1 a	0.8±0.09 a, b	0.8
0.1	13.3 b	1.2±0.2 a	1.5±0.23 a	0.1 ^d
1.0	5.0 c	1.0±0.0 a	0.5±0.09 b	0.1 ^d

Different *capital letters* indicate significant differences between auxins., *Lower case letters* indicate significant differences between the different concentrations for each auxin. $P \leq 0.05$

SE standard error

^a Percentage values statistically analyzed by a non-parametric test, the post hoc multiple comparisons test (Marascuilo and McSweeney 1977)

^b Statistical analysis performed by ANOVA, followed by LSD test at $P \leq 0.05$

^c SFC=(average no of shoots per regenerating explant)×(% of regenerating explant)/100

^d Callus proliferation at the basal end of the explants

longer than those obtained in the presence of 1 mg L⁻¹ KIN alone (1.4 cm). When the NAA concentration was higher (1.0 mg L⁻¹) or much lower (0.01 mg L⁻¹), the regeneration rate increased to 83.3% and 85.0%, respectively. However, the mean shoot number obtained with these growth regulator concentrations was below 5, so these medium compositions were considered less effective than the one containing 0.1 mg L⁻¹ NAA. A combination of cytokinin and auxin was also reported to produce better callus proliferation in *T. sipyleus* Boiss. (Baba Erdag and Yurekli 2000). However, the situation was apparently different when working with *T. piperella* (Sáez *et al.* 1994) and *T. mastichina* L. (Mendes and Romano 1999; Fraternali *et al.* 2003), where supplementing the medium with only BA promoted better shoot growth. In the present study, the only exception to the beneficiary effect of auxins was observed when the medium was supplemented with 2, 4-D. In addition to being incompetent to support efficient *in vitro* shoot proliferation, this auxin also gave rise to abundant and undesired callus growth at the basal ends of shoot-tip explants when its concentration exceeded 0.05 mg L⁻¹.

Effect of AgNO₃ on multiple shoot formation. The differentiation, proliferation and growth of cells and tissues cultured *in vitro* are also affected by ethylene, a volatile hormone accumulating in the headspace of the culture vessels during the subculture cycles (Kumar *et al.* 1998). Plant responses to ethylene are highly variable, promoting

growth and regeneration in rice (Cornejo-Martin *et al.* 1979) but inhibiting plants such as apple (Lambardi *et al.* 1997) and peanut (Ozudogru *et al.* 2005). In the present study, incorporation of AgNO₃, a potent inhibitor of ethylene action (Beyer *et al.* 1984), to MS medium containing 1.0 mg L⁻¹ KIN and 0.1 mg L⁻¹ NAA had a negative effect on regeneration rate, mean shoot number, and mean shoot length of *T. vulgaris* shoot tips. This effect was regardless of its concentration (Table 4). However, when NAA was omitted from the medium, AgNO₃ produced a significant increase in regeneration rate (up to 98.3%) of the shoot tip explants, in comparison with that observed when KIN was present alone in the medium (85%, see Table 2). In particular, inclusion of 6 or 8 mg L⁻¹ AgNO₃ to the KIN-containing proliferation medium provided an increase in the average length of the developing shoots and the SFC index. These data correlate with a well-known fact that auxins usually stimulate ethylene production, while cytokinins block ethylene action (Gaspar *et al.* 1989).

Effect of GA₃ on multiple shoot formation. Gibberellins (GAs) can promote a wide range of physiological activities in plants, including dormancy breakage, seed germination, flowering, fruit development and stem elongation through the increase of cell division, cell wall formation and expansion (Huttly and Phillips 1995). GA often interacts with other plant hormones. For instance, ethylene blocks

Table 4. Effect of AgNO₃ on multiple shoot formation of *Thymus vulgaris*

AgNO ₃ concentration (mg L ⁻¹)	Regeneration rate (%) ^a	Mean shoot number (no. ± SE) ^b	Mean shoot length (cm ± SE) ^b	Shoot-forming capacity (SFC) index ^c
In combination with 1 mg L ⁻¹ KIN				
1.0	90.0 a	3.9±0.4 b	1.0±0.05 b	3.5
2.0	98.3 a	4.8±0.4 a, b	1.0±0.04 b	4.7
4.0	83.3 b	2.8±0.3 c	0.9±0.05 b	2.3
6.0	98.3 a	4.6±0.4 a, b	1.4±0.08 a	4.5
8.0	90.0 a	5.4±0.3 a	1.3±0.05 a	4.9
In combination with 1 mg L ⁻¹ KIN+0.1 mg L ⁻¹ NAA				
1.0	48.3 a, b	6.1±1.0 a	0.8±0.05 a	2.9
2.0	30.0 b	3.5±0.5 b	0.8±0.08 a	1.0
4.0	55.0 a	4.2±0.8 a, b	0.9±0.06 a	2.3
6.0	53.3 a	4.5±0.5 a, b	0.8±0.05 a	2.4
8.0	28.3 b	2.5±0.5 b	0.7±0.10 a	0.7

Different letters indicate the significant differences at $P \leq 0.05$ between different concentrations of AgNO₃, supplemented in combination with KIN alone or KIN and NAA

SE standard error

^a Percentage values statistically analyzed by a non-parametric test, the post hoc multiple comparisons test (Marascuilo and McSweeney 1977)

^b Statistical analysis performed by ANOVA, followed by LSD test at $P \leq 0.05$

^c SFC=(average no. of shoots per regenerating explant)×(% of regenerating explant)/100

the ability of stems to respond to GAs (Gaspar *et al.* 1996), while genes of GA biosynthesis in pea requires IAA for expression (Hedden and Phillips 2000). Previous reports have demonstrated contrasting effects of NAA and GAs in terms of root, shoot or somatic embryo formation (Gaspar *et al.* 1996). In the present study, *T. vulgaris* shoot tips did not benefit significantly from inclusion of GA₃ in the proliferation medium containing KIN and NAA. Only the maximum GA₃ concentration (0.6 mg L⁻¹) was able to provide a slightly better *in vitro* shoot proliferation in comparison to the medium containing KIN and NAA (6.4 vs 6.0 of SFC index, see also Table 3). In contrast, when GA₃ was used in combination with KIN only, a marked increase in all the parameters evaluated was observed. In particular, medium supplemented with 0.3 mg L⁻¹ GA₃ and 1 mg L⁻¹ KIN provided the best *in vitro* proliferation conditions for *T. vulgaris* shoots (Table 5, Fig. 1B), with an almost 97% regeneration rate, 8.6 shoots per explant and an SFC index of 8.3. Therefore, MS medium containing 1 mg L⁻¹ KIN and 0.3 mg L⁻¹ GA₃ was considered to be the best option for *in vitro* proliferation of thyme.

***In vitro* rooting and acclimatization of shoots.** Various growth regulators were tested for their ability to induce *de novo* root formation from *T. vulgaris* shoots. According to the overall results (indicated bold in Table 6), the highest rooting rate was induced by IBA, followed by NAA, IAA and 2,4-D. For both IAA and IBA, the rooting rate increased as the concentration of the growth regulators increased, reaching a maximum at the highest concentration tested (1.0 mg L⁻¹). Use of this maximum concentration of IAA and IBA also provided a significant increase in RFC

index. Similarly, increasing NAA concentration enhanced the rooting ability of shoots, reaching a rate of 90% rooting at 0.1 mg L⁻¹. At 1.0 mg L⁻¹ NAA, a slight decline in rooting percentage was observed, but overall rooting ability was not negatively affected, as mean root number and RFC index were increased further. For the rooting of *T. mastichine* L., NAA (100%), IBA (100%), and IAA (80%) were also effective (Mendes and Romano 1999). In this study, the best shoot rooting was achieved when the medium was supplemented with 0.05 mg L⁻¹ 2,4-D, which enabled a 92.5% rooting rate, 19.1 roots per shoot and produced an RFC index of 17.7 (Fig. 1C). Increasing the concentration of 2,4-D was unfavorable for adventitious root formation, and MS medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D was the only medium composition where rooting was never observed.

It should be noted that maximum rooting of *T. vulgaris* was previously reported to occur when shoots were cultured on hormone-free MS medium (Lê 1989). In the present study, 100% rooting was also obtained on hormone-free MS medium. However, in comparison to the treatment with 0.05 mg L⁻¹ 2,4-D, auxin-free medium produced a lower mean root number and RFC index, both considered to be important parameters for success of the following acclimatization step. Hence, subsequent rooting trials were performed using MS medium supplemented with 0.05 mg L⁻¹ 2,4-D. Indeed, plantlets rooted on this medium and transferred to 250 mL plastic pots after (Fig. 1D) had a 73.3% survival rate following 8 wk of acclimatization in soil.

***In vitro* propagation of *T. longicaulis*.** The protocol of *in vitro* propagation optimized for *T. vulgaris* was evaluated

Table 5. Effect of GA₃ on multiple shoot formation of *Thymus vulgaris*

GA ₃ concentration (mg L ⁻¹)	Regeneration rate (%) ^a	Mean shoot number (no. ± SE) ^b	Mean shoot length (cm ± SE) ^b	Shoot-forming capacity (SFC) index ^c
In combination with 1 mg L ⁻¹ KIN				
0.1	93.3 a	6.3±0.6 a	1.1±0.05 a	5.9
0.3	96.7 a	8.6±0.9 a	1.0±0.04 a	8.3
0.6	91.6 a	7.6±0.9 a	1.1±0.05 a	7.0
In combination with 1 mg L ⁻¹ KIN+0.1 mg L ⁻¹ NAA				
0.1	76.7 a	5.1±0.8 b	1.0±0.06 a	3.9
0.3	71.7 a	2.8±0.3 c	0.5±0.03 b	2.0
0.6	75.0 a	8.5±1.0 a	0.7±0.02 b	6.4

Different letters indicate the significant differences at $P \leq 0.05$ between different concentrations of GA₃, supplemented in combination with KIN alone or KIN and NAA

SE standard error

^a Percentage values statistically analyzed by a non-parametric test, the post hoc multiple comparisons test (Marascuilo and McSweeney 1977)

^b Statistical analysis performed by ANOVA, followed by LSD test at $P \leq 0.05$

^c SFC=(average no of shoots per regenerating explant)×(% of regenerating explant)/100

IN VITRO PROPAGATION OF THYMUS SPP.

Table 6. Effect of auxins on *in vitro* rooting of *Thymus vulgaris*

Auxin concentration (mg L ⁻¹)	Rooting rate (%) ^a	Mean root number (no. ± SE) ^b	Mean root length (cm ± SE) ^b	Root-forming capacity (RFC) index ^c
Auxin-free (MS,0)	100.0 A	10.4±1.3 A	1.6±0.08 A	10.4
IAA	78.1 B	9.2±0.6 B	1.0±0.03 B	7.2
0.01	62.5 b	6.2±1.3 c	0.9±0.08 b	3.9
0.05	75.0 a, b	9.2±1.7 a, b, c	1.0±0.06 b	6.9
0.1	82.5 a	9.8±0.8 a, b	1.0±0.05 b	8.1
1.0	92.5 a	10.6±0.8 a	1.2±0.05 a	9.8
IBA	81.4 A, B	6.9±0.5 C	1.0±0.03 B	5.6
0.01	75.0 b	6.4±0.9 b	1.2±0.08 a	4.8
0.05	72.5 b	4.5±0.5 b, c	0.9±0.07 b	3.3
0.1	85.7 a	4.0±0.5 c	0.8±0.05 b	3.4
1.0	92.5 a	12.3±1.1 a	1.2±0.06 a	11.4
NAA	79.1 B	11.7±0.8 A, B	1.0±0.04 B	9.2
0.01	61.5 b	6.3±0.8 c	1.1±0.11 a	3.9
0.05	80.0 a	8.4±0.9 c	1.2±0.07 a	6.7
0.1	90.0 a	12.5±1.2 b	1.0±0.06 a, b	11.2
1.0	85.0 a	17.7±2.3 a	0.9±0.05 b	15.0
2,4-D	61.9 C	11.3±0.6 A, B	0.9±0.02 B	7.0
0.01	75.0 b	5.8±0.6 c	0.9±0.04 a	4.3
0.05	92.5 a	19.1±1.0 a	1.0±0.03 a	17.7
0.1	80.0 a	10.2±0.7 b	0.8±0.03 b	8.2
1.0	0.0 c	–	–	–

Different *capital letters* indicate significant differences between auxins, while for each auxin, *lower case letters* indicate significant differences between the different concentrations at $P \leq 0.05$

SE standard error

^a Percentage values statistically analyzed by a non-parametric test, the post hoc multiple comparisons test (Marascuilo and McSweeney 1977)

^b Statistical analysis performed by ANOVA, followed by LSD test at $P \leq 0.05$

^c RFC=(average no of roots per shoots)×(% of rooted shoots)/100

for its adaptability with *T. longicaulis*. In the latter shoot tips explants were collected from mature plants. Optimum decontamination that allowed subsequent plantlet establishment was 2.5% commercial bleach treatment for 30 min, after which 77.3% of the shoot tips were free of contamination and 29.4% were able to survive and regenerate. Like young shoot tips of *T. vulgaris*, obtained from *in vitro*-germinated seedlings, shoot tips of *T. longicaulis* (Fig. 2A), responded well to *in vitro* applications when cultured on the optimized proliferation medium (MS medium, supplemented with 1 mg L⁻¹ KIN and 0.3 mg L⁻¹ GA₃), which provided 97.5% shoot regeneration (Table 7). The mean shoot number and thus the SFC index were lower than for *T. vulgaris* (shoot number; 5.1 vs. 8.6, SFC; 5.0 vs. 8.3). The difference should be attributed to the fact that the *T. longicaulis* initial explants had been excised from mature plants, thus were expected to be relatively less reactive than the more juvenile initial material of *T. vulgaris*. Vigor of the shoots, however, was as healthy as *T. vulgaris* shoots

(Fig. 2B). Rooting was obtained readily on MS medium supplemented with 0.05 mg L⁻¹ 2,4-D, resulting in healthy plantlets (Table 7, Fig. 2C) to be acclimatized. Acclimatization was very successful, enabling the survival of all plantlets transferred to 250-mL plastic pots and kept under the same conditions described for *T. vulgaris* (Fig. 2D).

Genetic stability determination by RAPD analysis. *In vitro*-propagated plantlets, originating from preformed meristems such as shoot tips and axillary buds, are known to maintain their genetic stability during cell division and differentiation under *in vitro* conditions (Shenoy and Vasil 1992; Ostry *et al.* 1994). However, it should not be ignored that there is still the risk of alterations (Rani *et al.* 1995) induced by *in vitro* processes (*e.g.*, stress, auxin–cytokinin ratio and nutritional conditions; Modgil *et al.* 2005). Numerous studies are available in the literature reporting incidence of genetic alterations among micropropagated plantlets (Rani *et al.* 1995; Gimenez *et al.* 2001), while there are

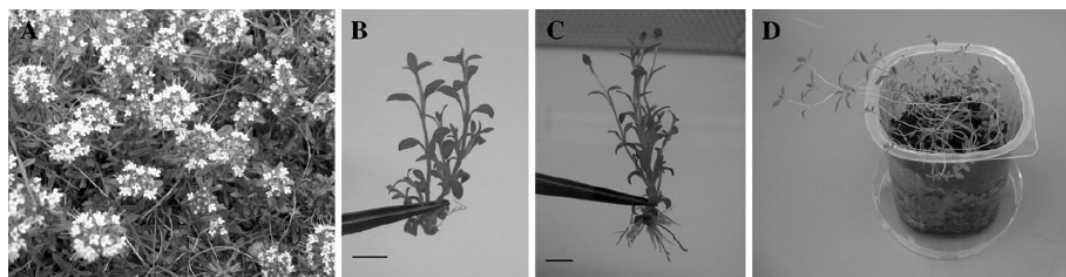


Figure 2. Application of optimized *in vitro* proliferation protocol to *Thymus longicaulis*. **A**, Mature plants that served as explant source. **B**, Multiple shoots of *T. longicaulis*, obtained on semi-solid MS medium containing 1.0 mg L⁻¹ KIN and 0.3 mg L⁻¹ GA₃ (bar, 1.50 cm). **C**, A

rooted shoot, obtained on semi-solid MS medium containing 0.05 mg L⁻¹ 2,4-D (bar, 1.50 cm). **D**, *T. longicaulis* plants after acclimatization.

also many others indicating the maintenance of genetic stability (Rout *et al.* 1998; Javounhey *et al.* 2000). These alterations are not desired, as they are often heritable and can be perpetuated to subsequent generations of micro-propagated plantlets (Breiman *et al.* 1987). While numerous molecular markers are available for the detection of such alterations at the DNA level, RAPD is most commonly used since it requires small amounts of template DNA, does not require knowledge of test plant DNA sequence, and generates data faster and easier than many other methods (Williams *et al.* 1990). In tissue culture, RAPD has repeatedly proven to be an effective tool to demonstrate somaclonal variations. Among the most recent studies, it is worthy to mention the works carried out to detect somaclonal variations among *in vitro*-propagated cedar (Piola *et al.* 1999), strawberry (Mohamed 2007), cucumber (Elmeer *et al.* 2009), and olive plants (Peyvandi *et al.* 2010). Reproducibility of RAPD technology can be obtained by optimizing the experimental conditions. Indeed, this was the case in the present study, enabling all

repetitions to produce similar band patterns for each primer. In preliminary trials, aiming to characterize various *Thymus* species/cultivars at the molecular level, a pool of 20 primers was selected for their ability to discriminate variability in *Thymus* spp. In the case of *T. vulgaris*, a total of 19 primers gave rise to 229 scorable bands, ranging from approximately 770 to 3,450 bp in size, all of which were monomorphic across all the plantlets analyzed (Table 1). The number of bands for each primer varied from 4 to 21, with an average of 12 bands per primer. Polymorphisms between the positive control, which contained the genomic DNA of *T. longicaulis*, and the *T. vulgaris* clones were also evident for all the primers tested, showing the fidelity of the technique to discriminate genetic differences in thyme. Some examples of monomorphic band profiles are presented in Fig. 3. These results show that the *in vitro* propagation protocol optimized in the present study is useful for thyme germplasm maintenance, as it does not seem to interfere with the genetic integrity of the regenerated plantlets.

Table 7. Multiple shoot formation and rooting of *Thymus longicaulis*

Regeneration rate (%) ^a	Mean shoot number (no. ± SE) ^b	Mean shoot length (cm ± SE) ^b	Shoot-forming capacity (SFC) index ^c
97.5	5.1 ± 0.2	1.0 ± 0.06	5.0
Rooting rate (%)	Mean root number (no ± SE)	Mean root length (cm ± SE)	Root-forming capacity (RFC) index ^d
100	11.9 ± 1.2	0.9 ± 0.07	11.9

Shoot proliferation was obtained by culturing on MS medium containing 1 mg L⁻¹ KIN and 0.3 mg L⁻¹ GA₃. Rooting of the shoots was obtained on MS medium containing 0.05 mg L⁻¹ 2,4-D

SE standard error

^a Percentage values statistically analyzed by a non-parametric test, the post hoc multiple comparisons test (Marascuilo and McSweeney 1977)

^b Statistical analysis performed by ANOVA, followed by LSD test at $P \leq 0.05$

^c SFC = (average no of shoots per regenerating explant) × (% of regenerating explant) / 100

^d RFC = (average no of roots per shoots) × (% of rooted shoots) / 100

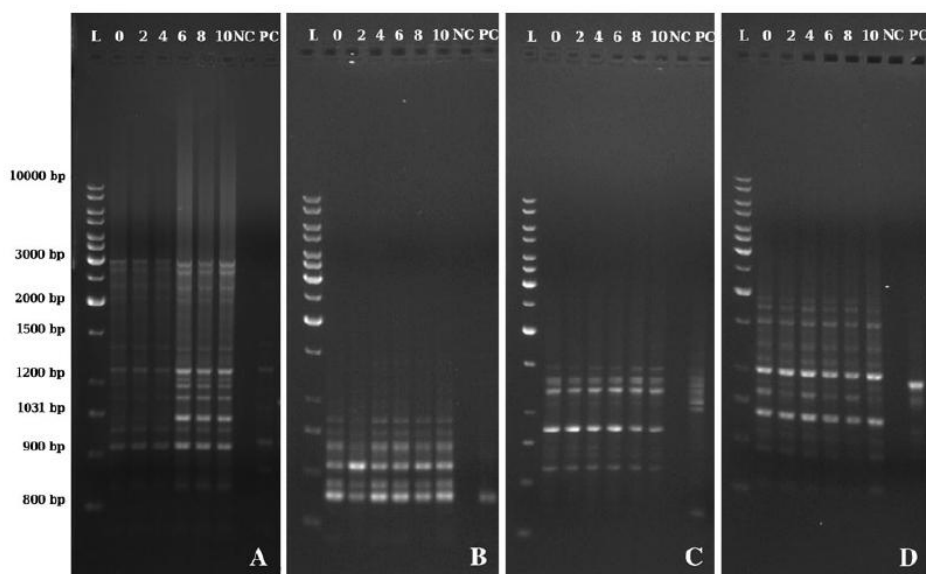
IN VITRO PROPAGATION OF *THYMUS* SPP.

Figure 3. RAPD band profiles generated by the primers F09 (A), F13 (B), F14 (C), and K02 (D). Lane L corresponds to 1 kb DNA ladder, 0 corresponds to mother plant, 2–10 correspond to shoots obtained

following two, four, six, eight, and ten cycles of *in vitro* propagation, NC negative control, PC positive control.

Conclusions

The present study was conducted to develop a complete *in vitro* propagation protocol for valuable *Thymus* germplasm with the flexibility of starting tissue culture with explants of different ontogenetic characteristics. During optimization, numerous cytokinins, auxins, AgNO₃, and GA₃ were tested, alone or in combination, to develop a high proliferation rate and to obtain healthy, multiple shoots. Rooting of shoots was also optimized by testing different auxin types and concentrations. In summary, the best shoot proliferation was obtained on semi-solid MS medium supplemented with 1 mg L⁻¹ KIN and 0.3 mg L⁻¹ GA₃, while the best root induction was obtained on MS medium containing 0.05 mg L⁻¹ 2,4-D. Using this protocol, it has been possible to obtain more than 380 *T. vulgaris* and 120 *T. longicaulis* plants from one single explant, after three subculture cycles of proliferation, rooting and acclimatization. In addition, seeds from these plants were obtained in the following season and were germinated for the production of new thyme plants. As revealed by RAPD analysis, the plants obtained this way maintained their genetic stability up to at least ten cycles of proliferation.

Acknowledgments Gebze Institute of Technology (Kocaeli, Turkey) is greatly acknowledged for the financial support of the study as a scientific research project (Project No. 2008-A-13). The authors are

grateful to Prof. Dr. Fusun Gumusel for her valuable suggestions on the manuscript.

References

- Baba Erdag B.; Yurekli A. K. *In vitro* propagation of *Thymus sipyleus* Boiss. (Lamiaceae). *Turk J Biol* 24: 81–86; 2000.
- Barauskiene R.; Venskutonis P. R.; Viskelis P.; Dambrauskiene E. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). *J Agric Food Chem* 51: 7751–7758; 2003.
- Beyer E. M.; Morgan J. P. M.; Yang S. F. Ethylene. In: Wilkins M. B. (ed) *Advanced plant physiology*. Pitman Press, Bath, pp 111–126; 1984.
- Breiman A.; Ritem A. D.; Barp A.; Shaskin H. Heritable somaclonal variation in wild barley (*Hordeum spontaneum*). *Theor Appl Genet* 74: 104–112; 1987.
- Comejo-Martin M. J.; Mingo-Castel A. M.; Primo-Millo E. Organ redifferentiation in rice callus: effects of C₂H₄, CO₂ and cytokinins. *Z Pflanzenphysiol* 94: 117–123; 1979.
- Doyle J. J.; Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Focus* 12: 13–15; 1987.
- Elmeer K. M. S.; Gallagher T. F.; Hennerty M. J. RAPD-based detection of genomic instability in cucumber plants derived from somatic embryogenesis. *Afr J Biotech* 8(14): 3219–3222; 2009.
- Evans D. A.; Sharp W. R.; Flick C. E. Growth and behaviour of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In: Thorpe T. A. (ed) *Plant cell culture: methods and application in agriculture*. Academic, New York, pp 45–113; 1981.
- Fratemale D.; Giamperi L.; Ricci D.; Rocchi M. B. L.; Guidi L.; Epifano F.; Marcotullio M. C. The effect of triacontanol on

- micropropagation and on secretory system of *Thymus mastichina*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 74: 87–97; 2003.
- Furmanowa M.; Olszowska O. Micropropagation of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). In: Bajaj Y. P. S. (ed) Biotechnology in agriculture and forestry. vol 19. Springer, Berlin, pp 230–243; 1992.
- Gaspar T.; Kevers C.; Bouillenne H.; Maziere Y.; Barbe J. P. Ethylene production in relation to rose micropropagation. In: Clysters H.; De Proft M.; Marcelle R.; Van Poucke M. (eds) Biochemical and physiological aspects of ethylene production in lower and higher plants. Kluwer, Dordrecht, pp 303–312; 1989.
- Gaspar T.; Kevers C.; Penel C.; Greppin H.; Reid D. M.; Thorpe T. A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 32: 272–289; 1996.
- Gimenez C.; Garcia E. D.; Enrech N. X. D.; Blanca I. Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of somaclonal variant CIEN BTA-03. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 217–222; 2001.
- Hedden P.; Phillips A. L. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* 5(12): 523–530; 2000.
- Huttly A. K.; Phillips A. L. Gibberellin-regulated plant genes. *Physiol Plant* 95: 310–317; 1995.
- Javounhey M.; Daugin F.; Letouze R. Somatic embryogenesis—an efficient tool for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) industrial micropropagation, characterization and genetic stability of original offshoots and regenerated plantlets by RAPD markers. *Acta Hort* 530: 237–241; 2000.
- Kumar P.; Lakshmanan P.; Thorpe T. A. Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 34: 91–103; 1998.
- Lambardi M.; Benelli C.; Fabbri A. *In vitro* axillary shoot proliferation of apple rootstocks under different ethylene conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 33: 70–74; 1997.
- Lambardi M.; Sharma K. K.; Thorpe T. A. Optimization of *in vitro* bud induction and plantlet formation from mature embryos of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.). *In Vitro Cell Dev Biol* 29: 189–199; 1993.
- Lawrence B. M.; Tucker A. O. The genus *Thymus* as a source of commercial products. In: Stahl-Biskup E.; Sáez F. (eds) Thyme, the genus *Thymus*. Taylor & Francis, London, pp 252–262; 2002.
- Lê C. L. Microbouturage *in vitro* du thym (*Thymus vulgaris* L.). *Rev Suisse Vitic Arboric Hort* 21: 355–358; 1989.
- Letchamo W.; Xu H. L.; Gosselin A. Variations in photosynthesis and essential oil in thyme. *J Plant Physiol* 147: 29–37; 1995.
- Marascuilo L. A.; McSweeney M. Post-hoc multiple comparisons in sample preparations for test of homogeneity. In: McSweeney M.; Marascuilo L. A. (eds) Non-parametric and distribution free methods the social sciences. Books/Cole Publication, Belmont, pp 141–147; 1977.
- Mendes M. L.; Romano A. *In vitro* cloning of *Thymus mastichina* L. field-grown plants. *ACTA Hort* 502: 303–306; 1999.
- Modgil M.; Mahajan K.; Chakrabarti S. K.; Sharma D. R.; Sobti R. C. Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. *Sci Hort* 104: 151–160; 2005.
- Mohamed A. E. S. Somaclonal variation in micro-propagated strawberry detected at the molecular level. *Int J Agric Biol* 9: 5; 2007.
- Morales R. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: Stahl-Biskup E.; Sáez F. (eds) Thyme, the genus *Thymus*. Taylor & Francis, London, pp 1–43; 2002.
- Murashige T.; Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497; 1962.
- Nitsch J. P.; Nitsch C. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85–87; 1969.
- Ostry M. E.; Hackett W.; Michler C.; Serres R.; McCown B. Influence of regeneration method and tissue source on the frequency of somatic variation in *Populus* to infection by *Septoria musiva*. *Plant Sci* 97: 5222–5226; 1994.
- Ozudogru E. A.; Ozden-Tokatli Y.; Akcin A. Effect of silver nitrate on multiple shoot formation of virginia-type peanut through shoot tip culture. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 41: 151–156; 2005.
- Pati P. K.; Rath S. P.; Sharma M.; Sood A.; Ahuja P. S. *In vitro* propagation of rose—a review. *Biotechnol Adv* 24: 94–114; 2006.
- Peyvandi M.; Farahzadi H. N.; Arbabian S.; Noormohammadi Z.; Hosseini-Mazinani M. Somaclonal variation among somatic-embryo derived plants of *Olea europaea* L “cv. Kroneiki”. *J Sci Islam Repub Iran* 21(1): 7–14; 2010.
- Piola F.; Rohr R.; Heizmann P. Rapid detection of genetic variation within and among *in vitro* propagated cedar (*Cedrus libani* Loudon) clones. *Plant Sci* 141: 159–163; 1999.
- Previati A.; Benelli C.; Da Re F.; Ozudogru A. Micropropagation and *in vitro* conservation of virus-free rose germplasm. *Prop Ornament Plants* 8(2): 93–98; 2008.
- Rani V.; Parida A.; Raina S. N. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant Cell Rep* 41: 459–462; 1995.
- Rey C.; Sáez F. Field culture, *in vitro* culture and selection of *Thymus*. In: Stahl-Biskup E.; Sáez F. (eds) Thyme, the genus *Thymus*. Taylor & Francis, London, pp 177–196; 2002.
- Rout G. R.; Das P.; Goel S.; Raina S. S. Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger showing random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Bot Bull Acad Sin* 39: 23–27; 1998.
- Sáez F. Volatile oil variability in *Thymus serpyllodes* ssp. *gadorenis* growing wild in Southeastern Spain. *Biochem Syst Ecol* 29: 189–198; 2001.
- Sáez F.; Sánchez P.; Piqueras A. Micropropagation of *Thymus piperella*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 39: 269–272; 1994.
- Sari A. O.; Oguz B. Importance of medicinal and aromatic plants in Turkey and in the World. Proc. TYUAP: 2000 year-meeting on horticultural crops of Egean and Marmara Regions, No: 98. Egean Agricultural Research Institute Publ, Izmir, p 82; 2000. Turkish.
- Senatore F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (southern Italy). *J Agric Food Chem* 44: 1327–1332; 1996.
- Shenoy V. B.; Vasil I. K. Biochemical and molecular analysis of plants derived from embryogenic cultures of napier grass (*Pennisetum purpureum* K. Schum.). *Theor Appl Genet* 83: 947–955; 1992.
- Simon J. E.; Morales M. R.; Phippen W. B.; Vieira R. F.; Hao Z. A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. In: Janick J. (ed) Perspectives of new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, pp 499–505; 1999.
- Stahl-Biskup E. Thyme as a herbal drug—pharmacopoeias and other product characteristics. In: Stahl-Biskup E.; Sáez F. (eds) Thyme, the genus *Thymus*. Taylor & Francis, London, pp 293–316; 2002.
- Tumen G.; Baser K. H. C.; Demirci B.; Ermin N. The essential oils of *Satureja coerulea* Janka and *Thymus aznavourii* Velen. *Flavour Fragr J* 13: 65–67; 1998.
- Williams J. G. K.; Kubelik A. R.; Livak K. J.; Rafalski J. A.; Tingey S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531–6535; 1990.

