

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VETIVERIA ZIZANIOIDES BİTKİSİNİN SAÇAK KÖKLERİNİN
DOKU KÜLTÜRÜNDE VE DİKEY TARIMDA ÜRETİMİ VE
EKSTRAKTLARIN METABOLİT ANALİZİ

ERVA BACACI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***VETIVERIA ZIZANIOIDES* BİTKİSİNİN
SAÇAK KÖKLERİNİN DOKU
KÜLTÜRÜNDE VE DİKEY TARIMDA
ÜRETİMİ VE EKSTRAKTLARIN
METABOLİT ANALİZİ**

**ERVA BACACI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI
PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ**

**GEBZE
2023**

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**PRODUCTION OF THE HAIRY ROOTS
OF THE *VETIVERIA ZIZANIODES* PLANT
IN TISSUE CULTURE AND VERTICAL
AGRICULTURE AND METABOLITE
ANALYSIS OF THE EXTRACTS**

ERVA BACACI
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE
2023



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 31/01/2023 tarih ve 2023/08 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 20/02/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Erva BACACI'nın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

ÜYE

: Doç. Dr. Özlem AKKAYA

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Veysel SÜZERER

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Vetiveria zizanioides tropikal iklimde yetişen *Poaceae* familyasına ait tıbbi aromatik bir bitkidir. Vetiver bitkisinin köklerinden üretilen değerli aromatik uçucu yağ farmasötik endüstrisinde oldukça önemlidir. Çalışmada kullanılan bitki örnekleri sera, bitki doku kültürü ve hidroponik tarım olmak üzere 3 farklı koşulda yetiştirildi. Yapılan çalışmalar sonucunda vetiver bitkisinin sterilizasyon prosedürü optimize edilerek Türkiye’de ilk defa bitki doku kültürüne alınmış ve saçak kök kültürü denemeleri yapılmıştır. Farklı koşullarda yetiştirilen örnekler hızlandırılmış solvent ekstraksiyon sistemleri (ASE) kullanılarak ekstrakte edildi ve 3 farklı çözücü kullanıldı (hekzan, etanol, ultra saf su). Ekstraksiyon örnekleri GC-MS, DPPH ve ABTS ile antioksidan kapasite tayini, toplam fenolik ve flavonoid miktar tayini gibi çeşitli analizlerle karşılaştırıldı. Total fenolik asit içeriği en yüksek olanlar sırasıyla sera, dikey tarım ve bitki doku kültürü örnekleridir. En çok flavonoid miktarı sırasıyla dikey tarım, sera ve doku kültürü örneklerinden elde edilmiştir. DPPH antioksidan kapasitesi en çok sırasıyla sera, dikey tarım ve doku örneklerinde görüldü. ABTS antioksidan kapasitesi ise en çok ultra saf su ile çözülmüş dikey tarım örneğinde görüldü. Yapılan tüm çalışmalar, vetiver bitkisi üzerine yapılacak ileriki doku kültürü ve hidroponik tarım çalışmaları için yol gösterebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Vetiveria zizanioides*, Bitki doku kültürü, Hidroponik tarım, GC-MS, Fenolik, Flavonoid, DPPH, ABTS.

SUMMARY

Vetiveria zizanioides is a medicinal aromatic plant belonging to the *Poaceae* family that grows in tropical climates. The valuable aromatic essential oil produced from the roots of the vetiver plant is very important in the pharmaceutical industry. The plant samples used in the study were grown in 3 different conditions: greenhouse, plant tissue culture and hydroponic agriculture. As a result of the studies, the sterilization procedure of the vetiver plant was optimized, and it was taken into the plant tissue culture for the first time in Turkey and the hairy root culture experiments were carried out. Samples grown in different conditions were extracted using accelerated solvent extraction systems (ASE) and 3 different solvents were used (hexane, ethanol, ultrapure water). Extraction samples were compared with various analyzes such as antioxidant capacity determination, total phenolic and flavonoid quantification by GC-MS, DPPH and ABTS. The samples with the highest total phenolic acid content are greenhouse, vertical farming, and plant tissue culture samples, respectively. The highest amount of flavonoids were obtained from vertical farming, greenhouse and tissue culture samples, respectively. DPPH antioxidant capacity was mostly seen in greenhouse, vertical farming, and tissue samples, respectively. ABTS antioxidant capacity was mostly seen in vertical farming sample dissolved with ultra pure water. It is thought that all the studies can guide the future tissue culture and hydroponic agriculture studies on the vetiver plant.

Keywords: *Vetiveria zizanioides*, Plant tissue culture, Hydroponic agriculture, GC-MS, Phenolic, Flavonoid, DPPH, ABTS.

TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans tez çalışmam sırasında başta desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyip kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ'ye saygı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasına vetiver örnek materyallerini sağlayan Turuncu Peyzaj'a ve Giresun Üniversitesi'nden Yrd. Doç. Dr. Derya YANMIŞ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen hocam Dr. Öğr. Üyesi Mine GÜL ŞEKER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bingöl Üniversitesi Arı ve Doğal Ürünler ARGE ve ÜRGE Merkezi'ne ve Bingöl Üniversitesi Atatürk Üniversitesi Gebze Teknik Üniversitesi Arıcılık ve Arı Ürünleri Ortak Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne ve değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Veysel SÜZERER'e bu tez çalışmasının ekstraksiyon analizlerini gerçekleştirdiği ve tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini eksik etmediği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan değerli aileme, sevgili eşime ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler ederim.

Son olarak TÜBİTAK'a 2210-A Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında bana sağladığı destekten dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. <i>Vetiveria zizanioides</i> 'in Bilimsel Sınıflandırılması ve Genel Özellikleri	4
2.2. <i>Vetiveria zizanioides</i> 'in Kimyasal Bileşimi	5
2.3. <i>Vetiveria zizanioides</i> Kullanım Alanları	6
2.4. Saçak Kök Kültürü	8
2.4.1. Saçak Kök Kültürü Moleküler Mekanizması	9
2.4.2. Saçak Kök Kültürü Avantajları ve Kullanım Alanları	12
2.5. Dikey Tarım Sistemleri	12
2.5.1. Hidroponik Sistemler	14
2.5.1.1. Solüsyon (Agregat Olmayan) Kültürü	15
2.5.1.2. Katı (Agregat) Ortam Kültürü	16
2.5.2. Aeroponik Sistemler	17
2.5.3. Akuaponik Sistemler	18
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Bitki Materyali	19
3.2. Kimyasallar, Cihazlar ve Kitler	19
3.3. Stok Solüsyonlarının ve Antibiyotiklerin Hazırlanması	21
3.4. <i>Vetiveria zizanioides</i> Bitki Doku Kültürü Uygulaması	21
3.4.1. Sterilizasyon Optimizasyon Çalışmaları	21
3.4.2. CTAB ile DNA izolasyonu	24

3.4.3. DNA Miktarının Ölçülmesi	24
3.4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	25
3.4.5. Agaroz Jel Elektrophorezi	27
3.5. <i>Vetiveria zizanioides</i> 'in Saçak Kök Kültürü	27
3.5.1. Bakteri Kültürü ve Koşulları	27
3.5.2. Transformasyon Prosedürü	28
3.5.2.1. Standart Transformasyon Prosedürü	29
3.5.2.2. Isı Şoku ile Transformasyon Prosedürü	29
3.6. <i>Vetiveria zizanioides</i> Dikey Tarım Uygulaması	31
3.7. Ekstraksiyon Çalışmaları	32
3.8. Toplam Fenolik Madde Tayini	33
3.9. Toplam Flavonoid Madde Tayini	35
3.10. Antioksidan Tayini	36
3.10.1. DPPH Yöntemiyle Antioksidan Kapasite Tayini	36
3.10.1. ABTS/TEAK (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) Yöntemiyle Antioksidan Kapasite Tayini	37
3.11. GC-MS Analizi	38
4. SONUÇLAR	39
4.1. Doku Kültürü Uygulama Sonuçları	39
4.2. DNA İzolasyon Sonuçları	41
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Dizileme Sonuçları	41
4.4. Gram Boyama Sonuçları	43
4.5. Dikey Tarımda ve Serada Yetiştirilen Örnek Sonuçları	43
4.6. Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyon (ASE) Sonuçları	44
4.7. Toplam Fenolik Madde Tayini Sonuçları	46
4.8. Toplam Flavonoid Madde Tayini Sonuçları	47
4.9. Antioksidan Aktivesi Tayini Sonuçları	48
4.9.1. DPPH ile Antioksidan Kapasite Tayini Sonuçları	48
4.9.2. ABTS/TEAK ile Antioksidan Kapasite Tayini Sonuçları	50
4.10. GC-MS Sonuçları	51
5. TARTIŞMA	54

KAYNAKLAR

57

ÖZGEÇMİŞ

61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u> Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
AlCl ₃	: Alüminyum klorür
ASE	: Hızlandırılmış Solvent Ektraksiyon Sistemleri (Accelerated Solvent Extraction System)
Bp	: Baz çifti
CTAB	: Cetyl Trimethylammonium Bromide
dk	: Dakika
dH ₂ O	: Distile su
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
GA	: Gallik Asit
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
Mm	: Milimetre
Na ₂ CO ₃	: Sodyum Karbonat
nm	: Nanometre
NFT	: Besleyici Film Tekniği (Nutrient Film Technique)
pH	: Potansiyel Hidrojen
PPM	: Bitki Koruma Karışımı (Plant Preservation Mixture)
psi	: Basınç birimi (Pounds Per Square Inch)
PZR	: Polimer Zincir Reaksiyonu
Ri-plazmid	: Kök indükleyici plazmid (Root inducing plasmid)
rpm	: Revolutions per minute
sn	: Saniye
QE	: Quercetin Eşdeğeri

TAE	: Tris-acetate-EDTA
T-DNA	: Transfer DNA
TE	: Troloks Eşdeğeri
TEAK	: Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
VGS	: Vetiver Otu Teknolojisi
vir	: Virölans
VS	: Vetiver Sistemi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: <i>Vetiveria zizanioides</i> .	5
2.2: Saçak kök kültürü.	9
2.3: <i>Agrobacterium</i> aracılı transformasyon süreci modellemesi.	10
2.4: T-DNA'nın bitki hücresine taşınma modellemesi.	11
2.5: Ri-plazmidin fiziksel haritalandırması.	11
2.6: Durgun su kültürü sistemi.	15
2.7: Besleyici film tekniği (NFT) sistemi.	16
2.8: Katı ortam kültüründe kullanılan yöntemler.	17
2.9: Aeroponik sistem.	17
2.10: Akuaponik sistem.	18
3.1: Gradient PZR reaksiyonu ile optimum bağlanma sıcaklığının belirlenmesi a) örneklerin dizilimi, b) sıcaklığın kademeli olarak ayarlanması.	25
3.2: Ökaryotik küçük ribozomal alt birimi (18s rDNA) kodlayan genin şeması. Yüksek oranda korunmuş bölgeler açık maviyle, değişken bölgeler turuncuyla (V1-V9) gösterilmiştir.	26
3.3: <i>Vetiveria zizanioides</i> saçak kök transformasyon prosedür şeması.	30
3.4: Dikey tarım laboratuvarında yetiştirilen <i>Vetiveria zizanioides</i> bitkileri a) Yetiştirme tepsisindeki Vetiver bitkileri, b) Vetiver bitki kökleri.	31
4.1: Bitki doku kültüründe kontamine olmuş vetiver kökleri.	40
4.2: Bitki doku kültürüne alınan 3 haftalık vetiver kökleri.	40
4.3: 46-55 °C' deki gradient PZR agaroz jel elektroforez görüntüsü, N: negatif kontrol, M: marker.	42
4.4: Kontaminasyon kaynağından izole edilen DNA örneğinin BLAST analizi.	42
4.5: <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 15834 suşu ışık mikroskobu altındaki 100X görüntüsü.	43
4.6: a) Dikey tarımda yetiştirilen vetiver kök yapısı, b)vetiver bitkisi.	43

4.7:	Serada yetiştirilmiş (sol) ve dikey tarımda yetiştirilmiş (sağ) vetiver kök örnekleri.	44
4.8:	a) Serada yetiştirilmiş vetiver kökleri, b) vetiver bitkisi.	44
4.9:	Toplam fenolik asit madde tayini için Gallik Asit kalibrasyon grafiği.	46
4.10:	Toplam flavonoid madde tayini için Quercetin (QE) kalibrasyon grafiği.	47
4.11:	DPPH ile antioksidan kapasitesi tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği ve denklemi.	49
4.12:	ABTS/TEAK ile antioksidan kapasite değerlerinin kalibrasyon grafiği ve denklemi.	50
4.13:	Sırasıyla sera, dikey tarım ve bitki doku kültürü örnekleri için GC-MS kromatogram sonuçları.	51

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: <i>Vetiveria zizanioides</i> bitkisinin bilimsel sınıflandırılması.	4
2.2: <i>Vetiveria zizanioides</i> 'in başlıca bileşenleri.	6
3.1: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.	19
3.2: Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar.	20
3.3: Bitki doku kültüründe kullanılan stok solüsyonlarının hazırlanışı.	21
3.4: Sterilizasyon prosedürünü optimize etmek için denenen bileşenler.	22
3.5: Sterilizasyon prosedürünü optimize etmek için kullanılan besin ortamları ve içerikleri.	22
3.6: <i>Vetiveria zizanioides</i> yüzey sterilizasyonu için kullanılan prosedürler.	23
3.7: Kullanılan primer dizileri.	26
3.8: PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler.	26
3.9: PZR reaksiyonunda kullanılan basamaklar ve süreleri.	26
3.10: Hızlandırılmış solvent ekstraksiyon koşulları.	32
3.11: Toplam fenolik asit miktarı tayini için reaksiyon tüplerinin hazırlanması.	34
3.12: Toplam flavonoid madde miktarı tayini için reaksiyon tüplerinin hazırlanması.	35
3.13: DPPH tayini reaksiyon tüplerinin içeriği.	37
3.14: ABTS tayini için reaksiyon tüplerinin hazırlanması.	38
4.1: Optimize edilmiş besin ortamı içeriği.	39
4.2: <i>Vetiveria zizanioides</i> yüzey sterilizasyon prosedürlerinin kontaminasyon yüzdeleri.	40
4.3: DNA'ların spektrofotometrik ölçüm sonuçları ve saflık miktarları.	41
4.4: Hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu sonuçları.	45
4.5: Ekstraksiyon örneklerinin stok konsantrasyonları.	45
4.6: Kök ekstraktlarının GAE cinsinden fenolik madde miktarı.	47
4.7: Kök ekstraktlarının toplam flavonoid miktarının QE cinsinden değerleri.	48
4.8: DPPH antioksidan kapasite tayini sonuçları.	50
4.9: ABTS/TEAK ile antioksidan kapasite tayin sonuçları.	50

1. GİRİŞ

Tıbbi aromatik bitkiler tüm dünyada çeşitli ilaçlarda ve sağlık ürünlerinde kullanılmaktadır. Esas olarak zengin doğal metabolit kaynağı oldukları için yetiştirilirler [Saha and Basak, 2020]. Bu değerli bitkiler ve onlardan elde edilen esansiyel yağlar binlerce yıldır geleneksel tıpta, gıdaların hazırlanmasında, kozmetikte ve parfümeride kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre gelişmekte olan ülkelerin nüfusunun %80'i ve dünya nüfusunun %60'ı tıbbi aromatik bitkilere dayalı geleneksel ilaçlara bağımlıdır [Saha and Basak, 2020], [Mahajan et al., 2020]. Yapılan pazar araştırmalarında son yıllarda bitki türevli doğal ürünlere yönelik talep artışı olduğu görülmektedir [Pilz and Bart, 2011], [Niazian et al., 2019]. Bu ürünler yan etkilerinin az olması nedeniyle tercih edilmektedir. Öte yandan küresel talep artışı nedeniyle doğal bitki stokları azalmaktadır. Son yıllarda iklim koşullarındaki değişikliklerden tıbbi aromatik bitkilerin verimi de etkilenmiştir [Giannenas et al., 2020]. Bu yüzden bu değerli bitkilerin üretiminde alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Vetiveria zizanioides bitkisi buğdaygiller familyasına ait tıbbi aromatik bir bitkidir. Tropikal iklimi seven bu bitki Asya, Afrika, Okyanusya ve Orta Amerika'nın tropikal bölgelerinde yetişmektedir [Courtial et al., 2008]. Ağırlıklı olarak ise Hindistan'da yetiştirilmektedir. Bitki güçlü kök yapısıyla toprağa derinlemesine nüfuz edebilmektedir. Vetiver bitkisi geleneksel olarak tarımsal uygulamalarda kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra erozyon kontrolü, set stabilizasyonu ve fitoremediasyon gibi tarım dışı uygulamalarda da kullanılmaktadır [Verma, 2020]. Vetiver bitkisinin köklerinden üretilen değerli aromatik uçucu yağ seskiterpen alkoller ve hidrokarbonların en zengin karışımlarından biridir ve düşük uçuculuk oranına sahip olduğundan en viskoz yağlardan biridir [Rotkittikhun et al., 2010]. Karakteristik, odunsu ve spesifik bir kokuya sahiptir [Ouyang et al., 2021]. Vetiver yağının ana üreticileri Haiti, Endonezya, Çin, Hindistan, Brezilya, Japonya ve ana tüketicileri ABD, Hindistan, Japonya ve Avrupa'dır. Yıllık vetiver yağı ticaretinin yaklaşık 250 ton olduğu tahmin edilmektedir [Lavania, 2003]. Vetiver yağı parfümeri, kozmetik ve aromaterapi endüstrilerinde yaygın olarak kullanımının yanı sıra içeriğinde bulunan bileşiklerden dolayı farmasötik ve biyomedikal endüstrisinde de oldukça değerlidir. Vetiver yağının ana etkisi sinir sistemi üzerinedir. Sakinleştirici etkisi vardır. Bu

yüzden depresyon, sinirsel gerginlik, romatizma gibi hastalıkların tedavisinde kullanılır [Chomchalow, 2001]. Aynı zamanda antioksidan, antikarsinojenik ve termitisid aktivitelere sahiptir [Courtial et al., 2008].

Vetiver bitkisinden elde edilen yağın verimi ve kalitesi yetiştirilme uygulaması, iklim koşulları ve genetiğe bağlı olarak önemli ölçüde değişmektedir [Courtial et al., 2008]. Geleneksel tarıma alternatif olarak daha kontrollü ortamlarda gerçekleştirilen bitki doku kültürü uygulamaları ve dikey tarım sistemleri ile verimi ciddi ölçüde artırabilmek mümkündür.

Bitki doku kültürü kontrollü bir ortam altında bitkilerin çoğaltılması, metabolik süreçlerin incelenmesi, değerli metabolitlerin eldesi, rekombinant protein üretimi gibi pek çok çalışmaya olanak sağlar. Saçak kök kültürü bitki doku kültürü uygulamalarından biridir. Ticari uygulamaları da bulunmaktadır. Saçak kök kültüründe bitki dokusu yaralanarak *A.rhizogenes* adı verilen gram negatif bir toprak bakterisiyle enfekte edilir. Bu bakterinin bir DNA parçasını bitki genomuna aktarma konusundaki doğal yetenekleri laboratuvar koşullarında kullanılır [Gerszberg and Wiktorek-Smagur, 2022]. *A.rhizogenes* ile enfekte edilen kökler yüksek büyüme hızı, genetik stabilite ve hormonsuz ortamda büyüyebilme ile karakterize edilmektedir. Bu sayede değerli ikincil metabolitlerin artırılmış üretimi sağlanabilmektedir [Srivastava, 2007].

Dikey tarım bir diğer alternatif bitki yetiştirme yöntemlerindendir. Dünya genelinde nüfus artışına paralel olarak gıda talebi de artmaktadır. Geleneksel tarımda üretim iklim koşullarına, toprağın verimine, topraktaki mikroorganizmalara ve daha birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Dikey tarım ile kontrollü ortamlarda iklimden bağımsız, topraksız bitki yetiştirebilmek mümkündür. Bu sistemde bitkiler kontrollü sıcaklık, nem, pH, aydınlatma ve sulama koşullarında geleneksel tarıma göre daha verimli büyüebilmektedirler [Velazquez-Gonzalez et al., 2022]. Bu sistemle bitkilere ihtiyacına göre optimum besin kombinasyonu sağlanabilmektedir. Dikey tarım sistemleri hidroponik, akuaponik ve aeroponik olarak 3 ana gruba ayrılabilir. Courtial (2008) çalışmasında hidroponik ortamda yetiştirilen Vetiver bitkisinin köklerinden süperkritik sıvı ekstraksiyon sistemiyle ekstreleri elde etmiş ve daha sonra içeriğindeki bileşenler gaz kromatografi-alev iyonlaştırma detektörü (GC-FID) ile saptanmıştır. Sonuçlar, zengin içeriğe sahip vetiver üretiminde hidroponik sistemin etkinliğini göstermiştir.

Bu tez çalışmasında iki farklı bölgeden temin edilen Vetiver bitkisi kullanıldı. Vetiver fideleri Turuncu Peyzaj (Antalya,Türkiye) ve Giresun Üniversitesi Dr. Derya YANMIŞ'tan temin edildi. Temin edilen bitkiler Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, sera, bitki büyütme odası ve hidroponik tarım olmak üzere 3 farklı koşulda yetiştirildi. Farklı koşullarda yetiştirilen örnekler yeni nesil bir cihaz olan hızlandırılmış solvent ekstraksiyon sistemleri (ASE) kullanılarak ekstrakt elde edildi. Ekstraksiyon içerikleri 3 farklı yetiştirilme koşulu için toplam fenolik, toplam flavonoid ve antioksidan kapasiteleri bakımından karşılaştırıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda vetiver bitkisinin sterilizasyon prosedürü de optimize edilerek Türkiye'de ilk defa bitki doku kültürüne başarılı bir şekilde alınmıştır. Bitki doku kültürüne alınan vetiver örneklerinin artırılmış üretimini sağlamak için saçak kök kültürü denemeleri de ilk defa yapılmıştır. Bu tez çalışmasının sonuçları, vetiver bitkisi üzerine yapılacak ileriki doku kültürü, hidroponik tarım çalışmaları ve ekstraksiyon çalışmaları için yol gösterebilecektir ve günümüz teknolojileriyle farklı koşullarda yetiştirilebilen vetiver bitkisi için optimum koşulları belirlemeye yardımcı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca Türkiye'de nadir bulunan ve değeri yeterince ortaya konmamış tıbbi aromatik bir bitki olan vetiverin yetiştirilmesine ve korunmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. *Vetiveria zizanioides*'in Bilimsel Sınıflandırılması ve Genel Özellikleri

Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) Buğdaygiller (*Poaceae*) familyasına ait hızlı büyüyen, çok yıllık, tropik bir bitkidir [Srivastava et al., 2008]. Tropikal ve astropikal bölgelerde ve özellikle de Hindistan'da yaygın olarak görülmekte olan vetiver, nehir kıyılarında, bataklık ve alçak tepelerde yetişmektedir (Şekil 2.1) [Web 1, 2023].

Tablo 2.1: *Vetiveria zizanioides* bitkisinin bilimsel sınıflandırılması.

Alem	Plantae (Bitkiler)
Alt alem	Tracheobionta (Damarlı Bitkiler)
Bölüm	Magnoliophyta (Çiçekli Bitkiler)
Sınıf	Liliopsida (Tek Çenekliler)
Alt sınıf	Commelinidae
Takım	Andropogoneae
Familya	Graminae (Poaceae) (Buğdaygiller)
Alt familya	Panicoideae (Andropogonidae)
Cins	Chrysopogon
Tür	<i>Vetiveria zizanioides</i>
Binominal adı	<i>Vetiveria zizanioides</i> (Linn.) Nash
Diğer adlar	Malaysia: Nara wastu, Kusu-Kusu, Nara setu English: Vetiver (grass), Khus-Khus, Khus Indonesia: Aga wangi, Larasetu, Usar, Janur China: Xiang-Geng-chao Thailand: Faek, Ya-faeklum, Ya-faekhom
Sinonimler	<i>Andropogon zizanioides</i> Linn.; <i>Andropogon squarrosus</i> Hack; <i>Andropogon muricatus</i> Retz.; <i>Andropogon nardus</i> Blanco; <i>Andropogon nigritanus</i> Stapf.

Bitkinin yıllık büyüme hızı en iyi yağışlı bölgelerde ve sıcaklık 22-43°C arasındayken olduğu görülmektedir. Özellikle kökleri ve çeşitli kısımları tıpta, aromaterapide, kozmetik ve parfümeri endüstrisinde kullanılmaktadır. Köklerinden elde edilen Vetiver yağı ise her türlü iltihap ve enfeksiyon için kullanılmaktadır [Zahoor et al., 2018]. Vetiver, 3-4 m ye kadar kolayca nüfuz edebilen uzun, masif ve karmaşık kök sistemine sahip, yüksek C4 fotosentetik etkinlik gösterebilen, biyokütlesi fazla olan bir bitkidir ve bu sayede toprağı stabilize eder. Vetiver, -20-

60°C arasında değişen sıcaklıklara ve son derece sert evre koşullarına dayanabilir. Ayrıca asidik, alkali ve tuzlu yetiştirme ortamına karşı oldukça toleranslı bir bitkidir [Srivastava et al., 2008]. Vetiver, 1950'lerin başında Fiji'de toprak koruma amacıyla kullanılan ilk tanınan otlar arasındaydı. Daha sonra, 1980'lerden itibaren Hindistan'da toprak ve su koruma için Dünya Bankası tarafından teşvik edildi. Vetiver köklerinden aromatik uçucu yağ retimi Hindistan için bir gelenek olmuştur (Peyron 1989; Lavania 2004). Ek olarak, spesifik bir kök sistemine sahip olmasından dolayı vetiver, ağır metal kirliliği de dahil olmak üzere çok çeşitli olumsuz iklim koşullarına da tolerans sağlar. Çeşitli toprak türlerinde ve nehir kıyıları gibi sulu koşullarda hayatta kalma konusunda olağanüstü bir yeteneğe sahiptir. Dünya Bankası, günümüzde popüler olarak vetiver sistemi (VS) olarak bilinen vetiver otu teknolojisinin (VGT) sistematik gelişimi için bira proje başlatmıştır. Vetiver sistemi, toprak ve su koruma, atık su arıtma, set stabilizasyonu, kirliliğin azaltılması gibi birçok çevresel sorun için kanıtlanmış ve sürdürülebilir bir çözümdür. Bu yüzden, çevrenin kalitesini eski haline getirmek ve evre kirliliğini azaltmak için doğanın dünyaya sağladığı en iyi malzemelerden biridir.



şekil 2.1: *Vetiveria zizanioides*.

2.2. *Vetiveria zizanioides*'in Kimyasal Bileşimi

Vetiveria zizanioides köklerinden elde edilen uçucu yağ dünya çapında ilgi görmüştür. Vetiver otu yağında 150 seskiterpen bulunur. Yağın %35'ini alfa-vetivone, beta-vetivone ve khusimol bileşenleri oluşturur ve karakteristik kokuyu da sağlayan

bu kimyasal bileşimdir (Tablo 2.2) [Zahoor et al., 2018]. Bunun yanında vetiver yağı siklik, bisiklik ve seskiterpenoid gibi 300'den fazla bileşenden oluşan karmaşık bir bileşime sahiptir. Bunlara örnek olarak α -vetivone, β -vetivone, khusimol, cadanene, cedrene ve β -humulen bileşenleri verilebilir [Esyanti et al., 2013].

Tablo 2.2: *Vetiveria zizanioides*'in başlıca bileşenleri.

Ana Bileşen	Kimyasal Yapı	Ana Bileşen	Kimyasal Yapı
Alpha-Vetivone		Prezizaene	
Beta-Vetivone		Khusimone	
Khusimol		Tripene-4-Ol	
Vetiverol		Beta-Humulene	
Vetivazulene		B-Vetispirene	
Khusimol		Zizaene	

2.3. *Vetiveria zizanioides* Kullanım Alanları

Vetiver bitkisi ekonomik değeri yüksek, üretimi kolay ve görsel kalitesi olan bir bitki olduğundan tarımsal ve tarım dışı birçok alanda kullanılmaktadır. Vetiver güçlü kök yapısı ve biyokütlesinden dolayı dünya genelinde çevre sınırlarının

belirlenmesşev stabilizasyonunun oluşturulması, erozyon, heyelan, sel ve taşkın gibi doğal afetlerin önlenmesi amacıyla kullanılmaktadır [Cındık vd., 2012].

Vetiver, Al, Mn gibi metallere ve Cd, Cr, Ni, Pb, Hg, Se ve Zn gibi ağır metallere ve toprakta bulunan arsenik gibi metaloidlere karşı yüksek toleransı ile bilinir. Vetiver bitkisinin ağır metallere toleransı, toprak üstü dokularda metal biriktirme kabiliyeti ve köklerdeki mikorizal birliktelikle ilişkilidir. Yapılan araştırmalara bakıldığında vetiverin toksik metalleri etkili bir şekilde uzaklaştırabileceği öne sürülmektedir. Vetiver, Pb, Cu ve Zn gibi toksik ağır metallere karşı özel bir afiniteye sahiptir [Srivastava et al., 2008]. Bu gibi fizyolojik özelliklerinden dolayı, vetiver bitkisi ağır metallerin topraktan etkili bir şekilde uzaklaştırılması için fitoremediasyon uygulamalarında kullanılmaktadır. Fitoremediasyon özelliğine sahip olmasının yanında erozyonun önlenmesi noktasında da dünya genelinde kullanılan ekonomik değeri olan bir bitkidir [Iriawati et al., 2013].

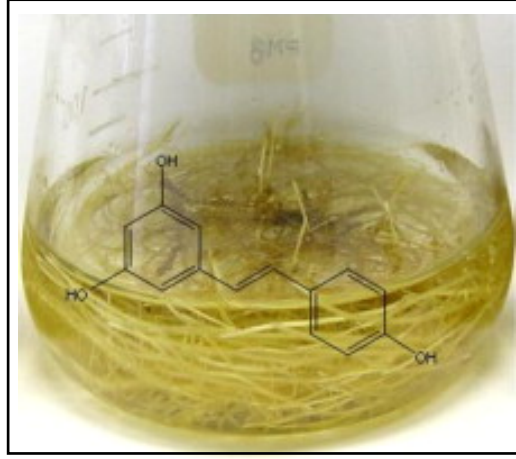
Özellikle dünyada sürdürülebilir çevre koruma projeleri ve tarım ve tarım dışı birçok uygulamada başarılı sonuçlar alındığı görülmektedir [Cındık, 2012]. Bununla birlikte bu değerli bitki Türkiye’de yeterince bilinmemektedir. Türkiye’de henüz sadece erozyonu önlemek veya vetiver yağının antibakteriyel özelliğini ortaya koymak gibi sınırlı çalışmalar gerçekleştirilmiştir [Demirel vd., 2002; Efe, 2019]. Bu yüzden Vetiver bitkisinin Türkiye’de tanıtılması, çeşitli araştırmalar ve projelerde amacına uygun kullanımının yaygınlaştırılması bakımından önemlidir.

Vetiver eski çağlardan beri Hindistan'da parfümeri alanındaki değeri ile bilinmektedir. *Vetiveria zizanioides*'in köklerinin rafine edilmesiyle vetiver uçucu yağı elde edilir. Haiti, Endonezya, Çin, Japonya, Hindistan ve Brezilya ana üreticiler ve ABD, Avrupa, Hindistan ve Japonya ana tüketicilerdir. Bu ülkelerdeki vetiver yağının yıllık dünya ticaret hacmi 250 ton civarında olduğu tahmin edilmektedir. Ticarete “Ruh-Khus” olarak bilinen saf vetiver (khus) kök yağı, Hindistan'daki parfümeri dükkanlarında kolayca bulunabilir. Vetiver yağı odunsu, yeşil ve fındık benzeri kokuya sahiptir. Ayrıca viskozitesi yüksek olduğundan yapışkan yapılı, açık kahverengi bir yağdır [Verma, 2020]. Hoş aroması ve düşük buharlaşma hızı nedeniyle parfümlerin temel nota kategorisinde kullanılan yağın yerine geçebilecek sentetik bir muadili henüz bulunamamıştır [Lavania, 2003]. Vetiver uçucu yağı parfüm, kozmetik, deodorant, sabun, ilaç üretimi gibi endüstriler için hammadde kaynağıdır. Ayrıca böcek kovucu olarak da yaygın olarak kullanılmaktadır. Vetiver yağı çok kalıcıdır ve bilinen en iyi fiksatiflerden biridir. Yağın kimyasal bileşimi, kokusu ve alkolde yüksek

           onu benzersiz bir parfümeri kaynağı yapar. Direkt parfümeri uygulamalarına ek olarak seyreltilmiş haliyle vetiver ya ı, tıra  sonrası losyonlar, oda spreyleri ve aroma verici  uruplar, dondurma, kozmetik ve gıda muhafazasında da yaygın olarak kullanılmaktadır [Lavania, 2003]. Seyreltilmiş formda kullanılırsa vetiver ya ı, yatıştırıcı ve serinletici etki sa lar. Tedavi amaçlı kullanılan değerli bir ya  olmakla birlikte kuru ve susuz kalmış ciltlerde nemi yeniler ve cilt üzerinde gen le tirici etkisi vardır [Verma, 2020]. *V. zizanioides* esansiyel ya ının anti inflamatuvar etki gösterdiği görülmüştür. Daha çok dolaşım sistemi ve sinir sisteminde iltihap önleyici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, güneş çarpması, dehidrasyon ve kuru rüzgarların neden olduğu iltihaplar için tedavi amaçlı kullanılır [Zahoor et al., 2018]. Bu nedenle vetiver ya ının ekonomik değeri çok yüksektir. Vetiver bitkileri aynı zamanda toprak erozyonunu önlemek için de kullanıldığından, vetiver ya ı üretimine ayrılmış vetiver ekimi için giderek daha sınırlı alan kalmaktadır [Esyanti et al., 2013]. Bu nedenle, bu sorunu çözmek için bitki doku kültürü teknikleri gibi alternatif teknolojilere ihtiyaç vardır. Saçak kök kültürü değerli bitki sekonder metabolitlerini kontrollü ortamlarda elde edebilmek için kullanabilece imiz doku kültürü tekniklerinden biridir.

2.4. Saçak Kök Kültürü

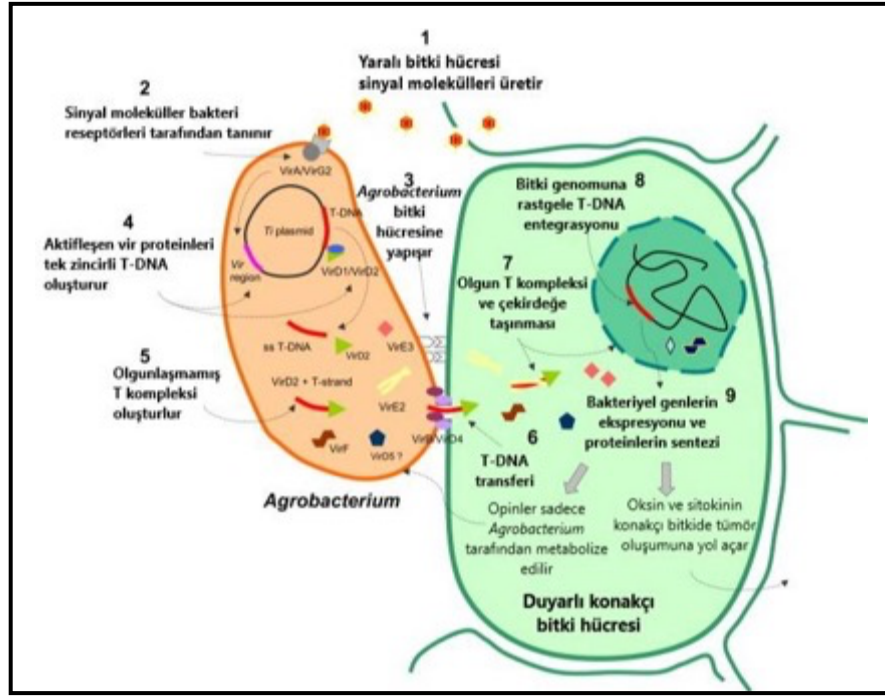
Saçak kök kültürü, genellikle bitki metabolik süreçlerini incelemek veya biyofarmasötik olarak kullanılan değerli ikincil metabolitler ve rekombinant proteinler üretmek için kullanılan bitki doku kültürü uygulamalarından biridir ( ekil 2.2.) [Medina-Bolivar et al., 2007]. Saçak kök kültürü literatüre ilk kez Steward ve arkadaşları (1900) tarafından girmiştir. *A. rhizogenes* ile enfekte olmuş köklerde yanıt olarak çok sayıda ince, küçük kökler olu tu undan dolayı ‘saçak kök’ terimi kullanılmıştır. Saçak kök oluşumuna neden olan mikroorganizma ise ilk olarak Riker ve arkadaşları (1930) tarafından *Phytomonas rhizogenes* olarak adlandırıldı. Daha sonra *Agrobacterium rhizogenes* olarak tekrar adlandırıldı [Srivastava et al., 2007]. Yüksek bitkilerin *A. rhizogenes* ile ilk transformasyonu 1973'te Ackermann tarafından yapılmıştır [Ackermann, 1977]. Porter (1991) birçok farklı cins ve familyada olan 450'den fazla bitki türünün *A. rhizogenes* enfeksiyonuna duyarlı olduğunu bildirmesinden sonra listeye birçok ekleme yapılmıştır.



Şekil 2.2: Saçak kök kültürü.

2.4.1. Saçak Kök Kültürü Moleküler Mekanizması

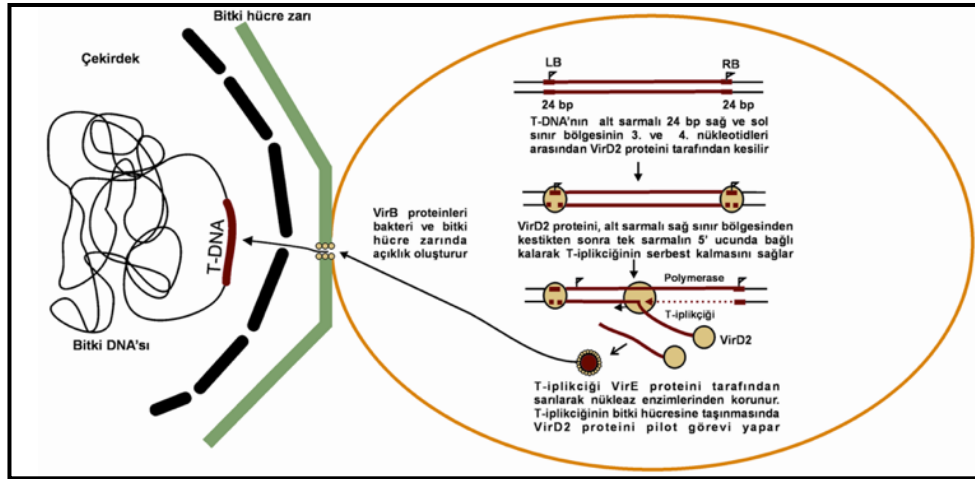
Saçak kök elde edebilmek için bir bitkinin gram negatif bir toprak bakterisi olan *Agrobacterium rhizogenes* ile başarılı bir şekilde transforme edilmesi gerekir. [Guillon et al., 2008] *A. rhizogenes*, dikotiledon bitki türlerini opin adı verilen ve bakteriye besin sağlayan kimyasal bir üreticiye dönüştürür. Bu işlem bitkinin enfeksiyon bölgesinde saçak köklerin oluşmasına neden olur. Doğada kendiliğinden gerçekleşebilen bu süreç bitki dokusunun yaralanmasıyla başlar. Genellikle böcek veya mekanik etkenlerle hasar almış bitki dokusunun yaralı bölgesi *A. rhizogenes* bakterisi tarafından istila edilir. Çünkü yaralı bitki dokusu tarafından salınan asetosiringon gibi fenolik bileşikler *A. rhizogenes* bakterisini çeker. Salgılanan bu fenolik madde, Ri-plazmid (kök indükleyici plazmid) üzerindeki virülans (*vir*) genlerinin aktivasyonunu sağlar (Şekil 2.3) [Web 2, 2021].



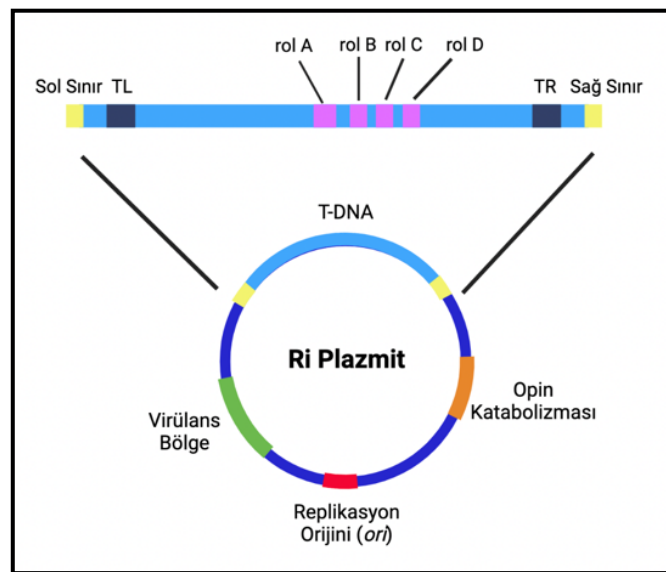
Şekil 2.3: *Agrobacterium* aracılı transformasyon süreci modellemesi.

Şekil 2.5'te BioRender programı kullanılarak Ri plazmiti çizilmiştir. Plazmitte bulunan sınır dizileri bitki hücresine iletilen plazmit bölgesinin sınırlanmasını sağlar. Virülans genleri, bitki hücresine transfer edilebilmesi için T-DNA'nın (transfer DNA) kesilmesini ve entegrasyonunu sağlar (Şekil 2.4). *VirA* proteini fenolik bileşiklerin ve asitliğin bakteri tarafından algılanmasını sağlar. *VirG* proteini vir regulonunun fenolik ve monosakkarit indükleyicilerle indüklenmesini sağlar. T-DNA'nın her iki tarafında boşluklar oluşturan endonükleazlar ise *virD* operonu tarafından kodlanır. *VirD2* ve *VirD1* proteinleri tarafından RB bölgesi kesilerek 5'-3' serbest ssDNA (tek sarmallı DNA) oluşturulur. *VirD2* proteini oluşturulan tek sarmalın 5' ucunda bağlı kalarak T-DNA'nın serbest kalmasını sağlar. *virE* proteini T-DNA'yı sararak nükleaz enzimlerine karşı korumaya yardımcı olur ve entegrasyondan önce 3' ucunun bütünlüğünü korur. *VirD2* proteini T-DNA'nın bitki hücresinin çekirdeğine doğrudan taşınmasına yardımcı olan nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLS) içerdiğinden pilot görevi yapar ve T-DNA'nın verimli bir şekilde transfer edilebilmesi için gereklidir (Şekil 2.4) [Web 3, 2023]. *VirB* proteinleri beta-1,4 glikozidik bağları parçalayan bir transglikozilazı ve T-pilus'un alt birimi olan pilin sentezini kodlar. Bu proteinler sayesinde bitki ve bakterilerin hücre zarında açıklık oluşturulur [Singh et al., 2022]. Tüm bunlar sayesinde tek sarmallı T-DNA, oksin sentezini kodlayan Ri-plazmidinden bitki genomuna dahil edilir [Pistelli et al., 2010]. White ve arkadaşları (1985)

çalışmalarında moleküler ve genetik mutasyon analizi ile saçak kök sendromunda yer alan T-DNA genlerini tanımladılar ve onları *rol A*, *B*, *C* ve *D* genleri olarak adlandırdılar. Bu genler neoplastik hastalığı tetikler ve saçak kök oluşumuna neden olur. Bu genler hayvan tümör hücresinde olduğu gibi transforme edilen bitki hücresinin gelişim sürecini değiştirebilme kapasitesinden dolayı bilim insanları tarafından rol onkogenleri olarak adlandırıldı [Mauro et al., 2017]. Transformasyon süreci enfekte olmuş bölgede saçak köklerin oluşumuna neden olur. Genetik olarak transforme olmuş bu saçak kökler, büyüme hormonları olmadan kültür ortamında sınırsız büyüebilir. Transforme olmuş bitki hücreleri, *Agrobacterium* ortamdan elimine edildikten sonra da saçak kökler üretebilir.



Şekil 2.4: T-DNA'nın bitki hüresine taşınma modellemesi.



Şekil 2.5: Ri-plazmidin fiziksel haritalandırması.

2.4.2. Saçak Kök Kültürü Avantajları ve Kullanım Alanları

A.rhizogenes ile enfekte olmuş bir bitkide oluşan saçak kökler genellikle normal köklere göre daha hızlı büyür. Transforme kökler daha fazla yanal dallanmaya sahiptir. Bu nedenle bitki eksplantında daha fazla meristem oluşur [Srivastava et al., 2007]. *A.rhizogenes*'in Ri plazmidi üzerindeki T-DNA, transformasyon aşamasında konak hücrenin genomuna entegre olur. Böylece T-DNA genotipik ve biyokimyasal stabilite sağlar. Transgenik bir saçak kök sistemi, Ri plazmidi ile ek genlerin *A. rhizogenes* vektör sistemleri ile bitki hücrelerine dahil edilmesi için bir potansiyel sunar. Bu nedenle saçak kök kültürleri, metabolik yolların biyokimyasal özelliklerini ve gen ekspresyon profillerini incelemek için değerli araçlardır. Saçak kökler genetik olarak stabil olduğu için bitki büyüme düzenleyicisi olmadan ortamda sınırsız büyüme yeteneğine sahiptir. Böylece transforme köklerin büyüme ortamının optimizasyonunda hormonlara gerek duyulmamaktadır.

Saçak kök kültürünün;

- Hızlı büyüme,
- Sık dallanma,
- Genotipik ve biyokimyasal stabilite,
- Hızlı üretim,
- Hormonsuz ortamda büyüebilme gibi çeşitli avantajları vardır.

Geleneksel tarıma alternatif olarak kullanabileceğimiz yöntemlerden saçak kök kültürü gibi doku kültürü uygulamalarının yanı sıra son zamanlarda dikey tarım sistemleri de sıkça görülmektedir. Bu sistemlerle kontrollü ortamlarda artırılmış verimle ürün elde etmek mümkündür.

2.5. Dikey Tarım Sistemleri

Küresel nüfus artışına paralel olarak artan gıda talebi tarımsal üretim üzerindeki baskının artmasına neden olmaktadır. 2050 yılına kadar küresel nüfusun 9,7 milyara ulaşması ve bu nüfusun da %70'inin kentsel bölgelerde yaşaması tahmin ediliyor [Beacham et al., 2019]. Kentsel arazilerin genişlemesine bağlı olarak geleneksel tarım

arazilerinin sınırlandırılması ve verimin düşmesine neden olmaktadır. Kalabalıklaşan kentsel nüfusun ihtiyaçlarını karşılamak için tarım ürünlerinin devamlı olarak şehirler arası taşınması gibi sorunlar gün yüzüne çıkmaktadır. Bu yüzden alternatif gıda üretim yöntemlerinin araştırılması ve yeni tekniklerin geliştirilmesi gerekmektedir. Günümüzde, geleneksel tarıma göre çeşitli avantajlar sağladığı için dikey tarım sistemlerinin endüstriyel tarımda kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır [Khan et al., 2018]. Dikey tarım, farklı materyaller ve sistemler kullanılarak kentsel bölgede de tarım üretimi yapılabilmesine olanak sağlayan topraksız bitki yetiştirme yöntemidir. Topraksız tarımla bitki yetiştirme konusunda yazılan ilk kitap 1627'de Francis Bacon tarafından yayımlanan *Sylva Sylvarum*'dur. Bu çalışmadan sonra topraksız tarım popüler bir araştırma konusu oldu. 1699'da John Woodward nane ile yapmış olduğu topraksız tarım deneylerini yayımladı. Bu deneylerle bitkilerin iyonize suda distile suya kıyasla daha iyi büyüdükları gözlemlendi. İleriki yıllarda Alman botanikçiler Julius von Sachs ve Wilhelm Knop (1859-65) topraksız tarımla bitki yetiştirme tekniklerinde gelişmeler kaydettiler. Hidroponik kelimesi ilk olarak 1937 yılında "Topraksız Bahçecilik için Eksiksiz Kılavuz" adlı kitabı yazarı William Frederick Gericke tarafından kullanıldı ve tanıtıldı [Pandey et al., 2019]. 1960-70 yılları arasında dünyanın birçok ülkesinde ticari hidroponik çiftlikler geliştirildi. Daha sonra 1980'lerde dünya çapında birçok otomatik ve yüksek teknoloji hidroponik çiftlik geliştirildi [Khan et al., 2018].

Genellikle ürünlerin yetişmesi için en uygun ortam topraktır, fakat toprak bitkinin büyümesi için ciddi sınırlamaları da beraberinde getirmektedir. Örneğin bakteri, nematod, mantar ve böcek gibi canlıların varlığı ve erozyona bağlı olarak toprağın bozulması gibi sorunlarla karşılaşmaktadır. Ayrıca topraktaki sıcaklık, oksijen seviyesi, nem ve mikroorganizmalar gibi birçok faktör topraktaki besinin bitkiler için erişilebilirliğini etkilemektedir. Dikey tarımın geleneksel tarımda karşılaşılan bu gibi sorunlara kıyasla birçok avantajı vardır. Bunlar şu şekilde özetlenebilir;

- Yıl boyunca mevsimden bağımsız ürün yetiştirilebilmesi,
- Ekinlerin zorlu hava koşullarından korunması,
- Pestisitlerin hiç kullanılmaması veya çok az kullanılması,
- Yaklaşık %90 su kullanım verimliliğinin olması,

- Optimize edilmiş üretim ile daha verimli mahsul elde edebilme,
- Tarımsal üretimde çevresel kirliliği azaltma.

Dikey tarım üretim sistemleri kullanılan yetiştirme ortamlarına göre üç grupta sınıflandırılabilir [Bingöl, 2015]:

- Hidroponik
- Aeroponik
- Akuaponik

2.5.1. Hidroponik Sistemler

Hidroponik latince olan su anlamına gelen ‘hydro’ ve çalışma anlamına gelen ‘ponic’ kelimelerinin birleşmesinden oluşmuştur [Sardare et al., 2013]. Hidroponik tarım, kökleri besin çözeltilerine daldırılmış bitkileri topraksız koşullarda büyüterek yapılan bir bitki yetiştirme tekniğidir. Hidroponik olarak bitki yetiştirmek sıcaklık, ışık yoğunluğu ve süresi, nem, ortamın pH'ı ve mineral besinler gibi çevresel koşulların kontrolünü gerektirdiğinden, "kontrollü çevre tarımı" olarak da adlandırılır [Pandey et al., 2019]. Bu teknikle tüm bitkilere ihtiyacına göre optimum besin kombinasyonu sağlanabileceğinden, hidroponik yöntem daha homojen bir üretim sağlayabilmektedir ve bu sayede de üretimden daha iyi verim alınabilmektedir. Hidroponik sistemlerin 2 ana tipi vardır;

Solüsyon (Agregat Olmayan) Kültürü;

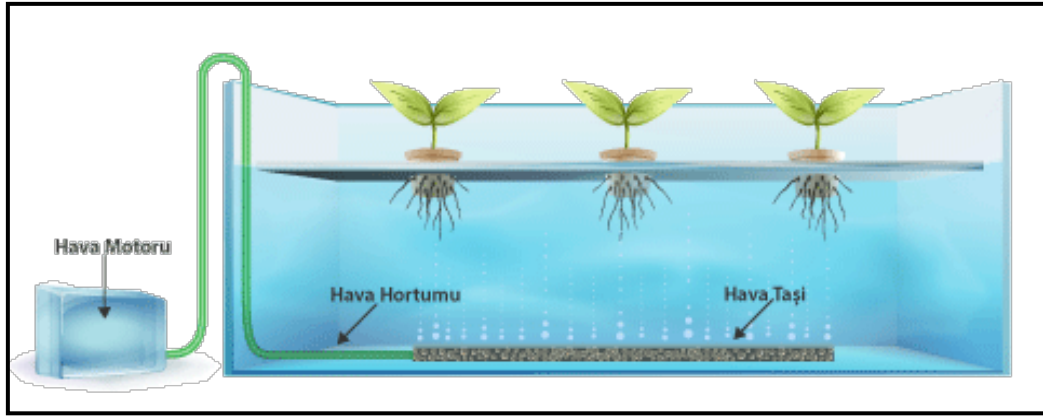
- Besleyici Film Tekniği (NFT),
- Durgun Su Kültürü.

Katı (Agregat) Ortam Kültürü;

- Yatak Kültürü,
- Hazır Blok Kültürü,
- Saksı, Torba veya Paket Kültürü.

2.5.1.1. Solüsyon (Agregat Olmayan) Kültürü

Solüsyon kültüründe köklerin destekleneceği katı bir besiyeri yoktur. Solüsyon kültürü türlerinden biri olan durgun su kültürü tekniği en basit hidroponik sistemlerden biridir. Bu sistemde bitkiler 30 cm derinlikte olan ve içerisinde besin çözeltisi bulunan tank benzeri yapılara sadece kökleri temas edecek şekilde yerleştirilir (Şekil 2.6) [Web 4, 2023]. Çözelti havalandırılabilir veya havalandırılmayabilir ama genellikle havalandırmak gerekmektedir. Havalandırma bir akvaryum pompası ile sağlanabilmektedir. Besin solüsyonu bitkinin ihtiyacına göre değişen elektriksel iletkenlik değerine (EC) göre ayarlanmaktadır. Çözeltinin EC değeri belirli bir seviyenin altına düştüğünde üzerine taze besiyeri eklenir [Pandey et al., 2019].

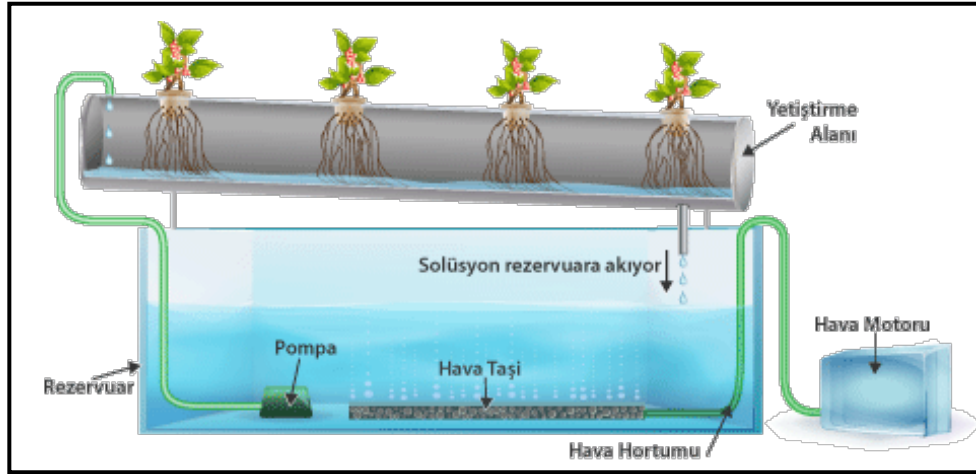


Şekil 2.6: Durgun su kültürü sistemi.

Solüsyon kültürü türlerinden bir diğeri en üretken sistemlerden olan besleyici film tekniğidir (NFT). Bu sistem genellikle ticari yetiştiricilikte tercih edilir. Bu sistemin adının böyle olmasının sebebi bitki köklerinin besleyici solüsyona tamamen batırılmamasıdır. Bunun yerine kökler, bir boru sisteminin içerisinde bulunan bitki için gerekli tüm besinlerin olduğu sığ bir sıvı akışına batırılır ve böylece köklere yeterli oksijen verilmesi de sağlanmış olur. Akan çözelti yerçekimi ile depolama tankına geri döner ve bu şekilde çözeltinin akışı sürekli veya periyodik yapılabilir (Şekil 2.7) [Web 5, 2023]

Bu yöntemin temel avantajı besin solüsyonu konsantrasyonunun durgun su kültürüne kıyasla çok daha kolay bir şekilde büyük bir depolama tankında ayarlanabilmesidir. NFT sistemlerindeki nispeten küçük besin solüsyonu hacmi sayesinde olası bir hastalık oluşursa daha basit boşaltma, yıkama ve temizleme

kolaylığı sağlayabilir. Bununla birlikte, devridaim yapan hidroponik sistemlerde patojenik türlerden hastalık gelişimini en aza indirebilmek için sistemin mikrobiyomunun düzenli olarak yakın takibinin yapılması gerekmektedir. Hidroponik çözeltinin temizliği için UV ışılama, ozon, ultrafiltrasyon veya ısıl işlem gibi su arıtma sistemleri kullanılabilir ve hastalık oluşumunun azaltılmasına yardımcı olabilir [Roberts et al., 2020].



Şekil 2.7: Besleyici film tekniği (NFT) sistemi.

2.5.1.2. Katı (Agregat) Ortam Kültürü

Agregat kültür yönteminde ise bitkinin tutunması için köklerde katı ortam desteği kullanılır ve kullanılan inert ortamın türüne göre isimlendirilirler (kum kültürü, çakıl taşı kültürü, kaya yünü kültürü). Seçilecek ortamın esnek, su ve hava tutma kapasitesinin iyi olması gerekmektedir. Bitkiler bu sistemde viol, saksı veya torba gibi kaplara konulur ve organik/inorganik substratlarla desteklenerek ekilirler. Besin çözeltisi periyodik aralıklarla yağmurlama sulama veya damlama sulama ile ortama verilmektedir. Bitkilerde ihtiyacı olan besini bu katı ortamdan alırlar [Sardare et al., 2013]. Katı ortam kültürlerinden biri olan hazır blok kültürlerinde genellikle kaya yünü kullanılır. Bu sistemde bitkilerin yetiştirilmesi tabana yerleştirilen kaya yünü bloklarının içerisinde yapılır. Saksı, torba veya paket kültüründe ise benzer şekilde katı ortamla doldurmuş kaplarda genellikle damla sulama yöntemiyle sulanarak yetiştirilmektedir (Şekil 2.8) [Mariyappillai et al., 2020]. Damla sulama yönteminde sulama suyu bitkiyi strese sokmayacak şekilde az miktarda, belirli aralıklarla bitkiye verilir. Yatak kültürü de bir diğer agregat kültürü çeşitlerindendir. Bu sistemde yatak

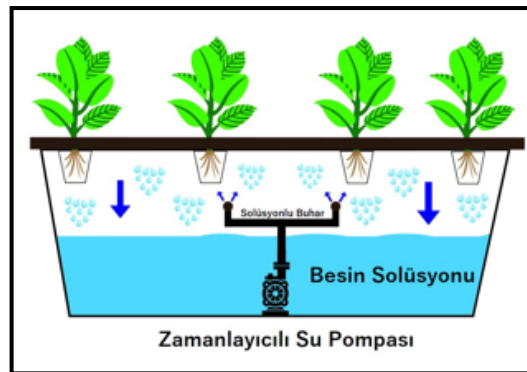
kültürü yetiştirilmek istenen bitki türüne göre hazırlanmaktadır. Bitkiler genellikle tek sıra olacak şekilde dikilir.



Şekil 2.8: Katı ortam kültüründe kullanılan yöntemler.

2.5.2. Aeroponik Sistemler

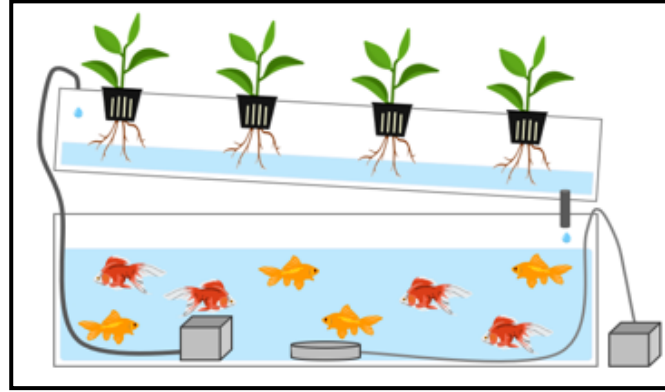
Aeroponik sistemler bir başka topraksız kültür sistemidir. Hidroponik sisteme genel olarak benzer. İki sistem arasındaki tek fark aeroponik sistemlerde besin solüsyonu bitki köklerine sis veya buhar şeklinde püskürtülerek verilmesidir. Besin solüsyonu zamanlayıcıya bağlı bir pompa aracılığıyla bitkiye sürekli veya belirli aralıklarla verilebilmektedir [Sardare et al., 2013; Bingöl, 2019]. Bu sistemde kökler bir kabın içerisinde havada asılı kalır ve substrata ihtiyaç duymazlar (Şekil 2.9) [Web 6, 2023]. Bu yüzden aeroponik sistemin temel avantajı köklerin çok iyi havalandırılmasıdır [Pandey et al., 2019].



Şekil 2.9: Aeroponik sistem.

2.5.3. Akuaponik Sistemler

Topraksız bitki yetiştirme sistemlerinden biri olan akuaponik sistemde balık yetiştirme tankından çıkan su, bitkiler için su ve besin kaynağı olarak kullanılır (şekil 2.10) [Web 7, 2023]. Atık suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri (sıcaklık, besin konsantrasyonları, vb.) yetiştirilen balığın türüne ve miktarına bağlıdır ve tüm ürünler için uygun olmayabilir. Akuaponik balık kültürü tarafından üretilen atık suyun kalitesi (sıcaklık, besin konsantrasyonları, çözünmüş oksijen konsantrasyonları), üretim oranlarının yanı sıra hangi bitkilerin yetiştirilebileceği üzerinde büyük etkilere sahip olabilir. Ek olarak, çoğu akuaponik sistem, balıkları bir devridaim sisteminde yetiştirir. Bu sistemlerin iddia ettiği bir fayda, besin konsantrasyonlarının hidroponik sistemlere yakın olmasıdır. Fesleğen (Adler ve arkadaşları, 2003), marul ve domates (Rakocy ve arkadaşları, 1993), salatalık ve otlar (Savidov ve arkadaşları, 2007) dahil olmak üzere bu akuaponik sistemlerde çok çeşitli mahsuller yetiştirilmiştir [Buzby et al., 2016].



şekil 2.10: Akuaponik sistem.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında iki farklı bölgeden temin edilen Vetiver (*Vetiveria zizanoides*) bitkisi kullanıldı. Vetiver fideleri Turuncu Peyzaj (Antalya, Türkiye) ve Giresun Üniversitesi Dr. Derya YANMIŞ 'tan temin edildi. Temin edilen bitkiler Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Sera, Bitki Büyütme Odası ve Dikey Tarım olmak üzere 3 farklı koşulda yetiştirildi. Büyüme koşulları sırasıyla şu şekildedir: sera için; 25 °C, 16/8 saatlik fotoperiyot, bitki büyütme odası için; 22-23 °C'de, karanlık ortamda ve hidropnik tarım için ise; 24-26 °C 16/8 saatlik fotoperiyot, kırmızı-mavi led ışık.

3.2. Kimyasallar, Cihazlar ve Kitler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar Tablo 3.2'de, kullanılan cihazlar Tablo 3.1'de ve gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Cihazın Markası	Cihaz Modeli
Laminar Kabin	Heraeus	
Spektrofotometre	Shimadzu	UV-1800
Nanodrop	Thermo Scientific	EC 1000 XL
Azure Imager	Thermo Scientific	C150
PZR	Biorad	T100
Elektroforez	Thermo Scientific	EC 1000 XL
İnkübatör	Nüve	EC160
pH metre	pH-209	Hanna Instrument
Vorteks	VWR	444-1372 (EU)
Mikrodalga fırın	Samsung	MW71E
Santrifüj	MWP	MWP-150R
Mini Santrifüj	MRC	ECEN-6
Jel Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı	Claver Scientific	MP300
Sıcak su banyosu	Witeg	WB-11

Tablo 3.2: Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog No
Gliserol	Merck	1040932500
LB Broth Miller	BD Difco	244620
L-Ascorbic Acid	Sigma	A2174
Agar	Duchefa Biochemie	012290.02
MS	Duchefa Biochemie	P17840.01
Sükroz	Multicell	800-081-LG
BAP	Sigma Aldrich	59H3868
NAA	Sigma Aldrich	20K3255
Asetosiringon	Sigma Aldrich	2478-38-8
Timentin	Duchefa Biochemie	010953.04
CTAB	Applichem	0U010499
β -merkaptetanol	Applichem	9X003976
RNase A	Hibrogen	647-1
Agaroz	Bio Basic Canada	L6132170KC
RedSafe	Intron Biotech	21141
100 bp DNA Ladder Plus	Hibrogen	MG-LDR-100P
SYBR Safe Jel Boyası	Hibrogen	MG-SSGD-01-1000
Proteinase K	Hibrogen	MG-PASEK-02
RNase A	Hibrogen	MG-RNAZA-02
Klorofom	Merck	1.07024.2500
1-Oktanöl	AppliChem	A3461,1000
İzopropanöl	Merck	1.09634.2511
EDTA Disodium	Multicell	625-060-CG
Tris HCl	Applichem	R10532
Maxim	Syngenta	PPE4041536
Captan	Koruma	133-06-2
Nazatem	Koruma	131860-33-8
Fosetyl Aliette	Bayer	39148-24-8
PPM	Plant Cell Technology	71806-DC-001

3.3. Stok Solüsyonlarının ve Antibiyotiklerin Hazırlanması

Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılan stok solüsyonların ve antibiyotiklerin hazırlanışı Tablo 3.3’ te gösterilmiştir.

Tablo 3.3: Bitki doku kültüründe kullanılan stok solüsyonlarının hazırlanışı.

Stok Solüsyonu	Konsantrasyon	Hazırlanışı
Asetosiringon	0.05 M	0.09 g Asetosiringon tartıldı, üzerine çeker ocakta 6 ml DMSO eklendi, filtreden geçirildikten sonra -20 °C’de karanlıkta saklandı.
Timentin	300 mg/mL	5 ml stok solüsyonu için 1.5 g Timentin tartıldı, steril distile su ile çözüldü, filtreden geçirildikten sonra -20 °C’de karanlıkta saklandı.
Canesten	5 mg/mL	500 mg Canesten tablet 100 ml aseton ile çözüldü, +4°C’de karanlıkta saklandı.

3.4. *Vetiveria zizanioides* Bitki Doku Kültürü Uygulaması

Bitki doku kültürü çalışmaları eksplant sterilizasyonu ile başlatıldı ve ardından elde edilen kökler saçak kök kültüründe kullanıldı. Bitki Biyoteknoloji Laboratuvarı’mızda ilk defa Vetiver üzerine çalışma gerçekleştirildiği için sterilizasyon çalışması optimizasyon gerektirdi. Optimizasyon sürecinde konsantrasyon değişiklikleriyle birlikte farklı bileşenler kullanıldı.

3.4.1. Sterilizasyon Optimizasyon Çalışmaları

Türkiye’de ilk defa *Vetiveria zizanioides* bitkisi üzerine bitki doku kültürü çalışması gerçekleştirildiği için sterilizasyon optimizasyon çalışmaları yapıldı. Sterilizasyon optimizasyon çalışmalarında Tablo 3.4’ te gösterilen birçok farklı kombinasyonda bileşenler kullanıldı. Yapılan sterilizasyon denemeleri sonucunda örneklerin neredeyse tamamında küflenme görüldü. Kontaminasyonu gidermek için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Probleminin devam etmesinden dolayı

kontaminasyon kaynağını öğrenmek amacıyla Tablo 3.7’de gösterilen primerlerle PZR tasarlandı ve örnek dizilemeye gönderildi. Daha sonra sterilizasyon denemeleri yapıldı ve kontaminasyon kaynağından kurtulmak için örneklerle Captan, Canesten, Fosetyl Aliette WG 800, Maxim ve PPM gibi farklı kimyasallarla muamele edildi. Kullanılan kimyasalların denenen konsantrasyonları Tablo 3.4’ te gösterilmiştir. Ayrıca kullanılan besiyerleri ve hazırlanışları Tablo 3.5’te belirtildiği şekildedir.

Tablo 3.4: Sterilizasyon prosedürünü optimize etmek için denenen bileşenler.

Kimyasal	Final Konsantrasyon	Miktar /Hacim	Total hacim	Solüsyonun hazırlanması
Captan	4 g/L	0.16 g	40 ml	0.16 g Captan tartıldı ve kabinde 40 ml steril dH ₂ O ile çalkalanarak çözüldü.
Canesten	4 g/L	32 ml	40 ml	500 mg Canesten 100 ml aceton ile çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Ardından, stok solüsyondan 32 ml alınarak kabinde 8 ml dH ₂ O ile çözüldü.
Fosetyl Aliette WG 800	5 g/L	0.2 g	40 ml	0.2 g Fosetyl Aliette tartıldı ve kabinde 40 ml steril dH ₂ O ile çalkalanarak çözüldü.
Maxim	%10	4 ml	40 ml	4 ml Maxim alındı ve kabinde 40 ml steril dH ₂ O ile çalkalanarak çözüldü.
PPM	%3	1.2 ml	40 ml	Hazırlanan 40 ml sterilizasyon solüsyonuna 1,2 ml PPM eklendi.

Tablo 3.5: Sterilizasyon prosedürünü optimize etmek için kullanılan besin ortamları ve içerikleri.

Besin Ortamı İçeriği	Besin Ortamının Hazırlanışı
MS	4 g/L MS ve 30 g/L süktroz hassas terazide tartıldı, steril dH ₂ O ile çözüldükten sonra pH 5.75 ± 0.05’e ayarlandı. 7 g/L agar eklendikten sonra 121 °C’de 15 dakika otoklavlandı, petrilere döküldü.
MS + 1 g/L Captan	1 g/L Captan tartıldı ve steril dH ₂ O ile çalkalanarak çözüldükten sonra 0.45 µm gözenek boyutlu filtreden geçirilerek otoklavlanmış MS besiyerine aktarıldı. Besiyeri çalkalandıktan sonra petrilere döküldü.
MS + 5 g/L Canesten	Hazırlanan 4 g/L stok solüsyonundan 1 ml alındı ve 0.45 µm gözenek boyutlu filtreden geçirilerek otoklavlanmış MS besiyerine aktarıldı.

Tablo 3.5: Devam.

0,75ml/L Nazatem	75 µl Nazatem 0.45 µm gözenek boyutlu filtreden geçirilerek otoklavlanmış MS besiyerine aktarıldı.
MS + %1 Maxim	1 ml Maxim alındı ve 20 ml MS besiyerinde çözüldükten sonra 0.45 µm gözenek boyutlu filtreden geçirilerek otoklavlanmış MS besiyerine aktarıldı.
MS + 5 ml/L PPM	Hazırlanan 500 ml MS besiyerine otoklavdan önce önce 2,5 ml PPM eklendi.

Tablo 3.6: *Vetiveria zizanioides* yüzey sterilizasyonu için kullanılan prosedürler.

	Sterilizasyon Prosedürü	Kullanılan Besin Ortamı
1. Sterilizasyon	0,6 g/L Askorbik asit + %2'lik çamaşır suyu (<%5 Sodyum hipoklorit) ile 20 dk, steril dH ₂ O ile 5'er dk 2 kez durulama, 4 g/L Captan solüsyonunda 30 dk çalkalama, steril dH ₂ O ile 5'er dk 2 kez durulama yapıldı.	Steril filtre kağıdı üzerinde 10 dk boyunca kurutulan kökler MS+5ml/L PPM ve 0,75ml/L Nazatem içeren besin ortamına alındı.
2. Sterilizasyon	0,6 g/L Askorbik asit + %2'lik çamaşır suyu (<%5 Sodyum hipoklorit) ile 30 dk, steril dH ₂ O ile 5'er dk 2 kez durulama, 4 g/L Canesten solüsyonunda 30 dk çalkalama, steril dH ₂ O ile 5'er dk 2 kez durulama yapıldı.	Steril filtre kağıdı üzerinde 10 dk boyunca kurutulan kökler MS ve MS + 5 g/L Canesten besin ortamına alındı.
3. Sterilizasyon	0,6 g/L Askorbik asit + %2'lik çamaşır suyu (<%5 Sodyum hipoklorit) ile 30 dk, steril dH ₂ O ile 5'er dk 2 kez durulama, 5 g/L Fosetyl Aliette solüsyonunda 30 dk çalkalama, steril dH ₂ O ile 5'er dk 2 kez durulama yapıldı.	Steril filtre kağıdı üzerinde 10 dk boyunca kurutulan kökler MS besin ortamına alındı.
4. Sterilizasyon	0,6 g/L Askorbik asit + %2'lik çamaşır suyu (<%5 Sodyum hipoklorit) ile 30 dk, steril dH ₂ O ile 5'er dk 2 kez durulama, %10 Maxim ve %3 PPM solüsyonunda 30 dk çalkalama, steril dH ₂ O ile 5'er dk 2 kez durulama yapıldı.	Steril filtre kağıdı üzerinde 10 dk boyunca kurutulan kökler MS ve MS + %1 Maxim besin ortamına alındı.

3.4.2. CTAB ile DNA izolasyonu

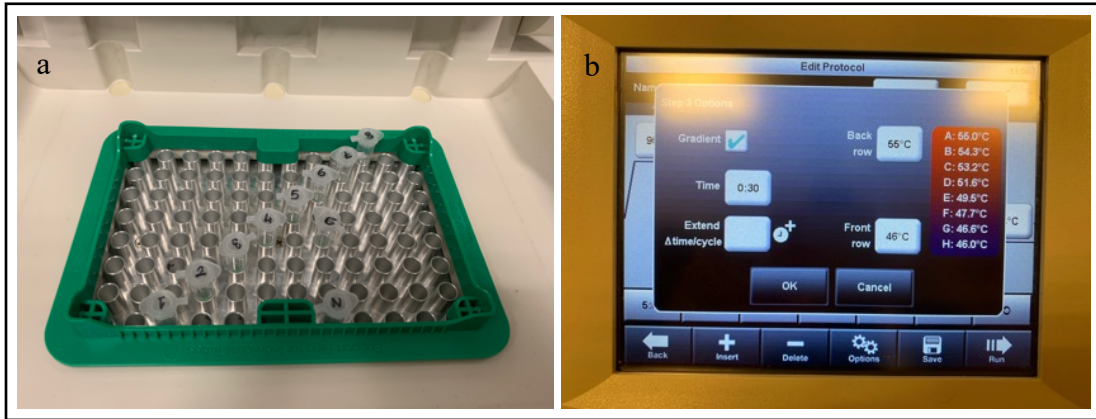
Doyle ve diğerleri [Doyle et al., 1987] tarafından tasarlanan protokol optimize edilerek kullanıldı. Kontaminasyona neden olan organizmadan alınan örnek silika kum aracılığıyla toz haline getirildi. 2 ml CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) çözeltisi 65 °C' e ayarlanan su banyosunda ısıtıldı, ependorfa aktarıldı. Ardından 4 µl β-merkaptotanol çeker ocakta CTAB' in üzerine ilave edildi. Daha sonra çözelti 2 ayrı ependorfa ayrıldı ve fungus örnekleri eklendi. Çözeltinin üzerine 20 µl Proteinase K ve 5 µl RNase A eklendi. Örnekler 30 frekansta 2 dakika homojenizatörde parçalandı ve daha sonra vortex yapıldı. Örnekler su banyosunda 65 °C' de 45 dakika inkübe edildi ve ardından 25 °C' de 15.000 rpm hızında 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra her iki ependorfun da süpernatant kısmından 700 µl alındı ve üzerine 800 µl 24:1 oranında kloroform-oktanol eklendi. Tekrar 25 °C' de 15.000 rpm hızında 3 dakika santrifüj yapıldı. Örneklerin üst fazından dikkatli bir şekilde sırasıyla 600 µl ve 500 µl alındı ve yeni ependorflara aktarıldı. Üzerlerine sırasıyla 600 µl ve 500 µl isopropanol eklendi ve -20 °C' de 3 saat inkübe edildi. Ardından 25 °C' de 15.000 rpm hızında 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra üst sıvı döküldü ve pelletin kuruyana kadar çeker ocakta bırakıldı. Pelet kuruduktan sonra 20 µl ddH₂O içerisinde çözüldü. Elde edilen DNA miktarını ölçmek için NadoDrop™ Lite Spektrometre kullanıldı.

3.4.3. DNA Miktarının Ölçülmesi

İzole edilmiş DNA miktarının belirlenmesi için NanoDrop Lite Spektrofotometre cihazı kullanıldı. Öncelikle 2 µl dH₂O blank olarak kullanıldı ve ardından örneklerden de 2' şer µl alınarak DNA konsantrasyonu ve A₂₆₀ / A₂₈₀ saflık oranı ölçüldü ve not edildi. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile amplifikasyon yapılabilmesi için DNA konsantrasyonları 100 ng/µl olarak ayarlandı ve daha sonra -20 °C' de saklanmıştır.

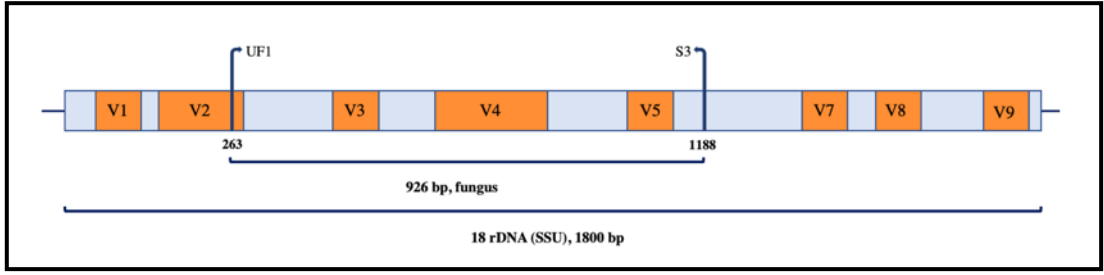
3.4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Kontaminasyona neden olan fungusu tanımlayabilmek için tüm funguslarda ortak olarak bulunan 18S rDNA geninin korunmuş dizisine özgü UF1 (universal fungal primer 1) ve S3 primerleri kullanıldı (Şekil 3.7). Primerler Sentebiolab Biyoteknoloji firmasından temin edildi. PZR reaksiyonunda kullanılacak primerlerin öncelikle konsantrasyonu 100 μ M olacak şekilde stok solüsyonları hazırlandı. Ardından stok solüsyonların seyreltilmesiyle 10 μ M konsantrasyonda çalışma primerleri hazırlandı. PZR bileşenleri ve konsantrasyonları Tablo 3.8’de gösterilmiştir. Optimum bağlanma sıcaklığını bulabilmek için gradient PZR yapıldı.



Şekil 3.1. Gradient PZR reaksiyonu ile optimum bağlanma sıcaklığının belirlenmesi a) örneklerin dizilimi, b) sıcaklığın kademeli olarak ayarlanması.

Öncelikle, nükleaz içermeyen su, 5X HOT FIREPol® Blend Master Mix ve primerlerin olduğu ana çözelti hazırlandı. Hazırlanan çözelti vortekslendikten sonra kontrol tüpüne konuldu. Ardından ana çözeltiye DNA (100 ng) eklenerek PZR reaksiyon karışımı hazırlandı. Tablo 3.9’da verilen koşullara göre PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. PZR reaksiyonu gerçekleştikten sonra optimum bağlanma sıcaklığı belirlendi ve dizileme için optimum bağlanma sıcaklığında aynı koşullarda PZR reaksiyonu tekrar gerçekleştirildi.



Şekil 3.2: Ökaryotik küçük ribozomal alt birimi (18s rDNA) kodlayan genin şeması. Yüksek oranda korunmuş bölgeler açık maviyle, değişken bölgeler turuncuyla (V1-V9) gösterilmiştir.

Tablo 3.7: Kullanılan primer dizileri.

Primer	Primer Dizisi (5'-3')	Primer Uzunluğu
UF1 (İleri Primer)	CGAATCGCATGGCCTTG	17 bp
S3 (Geri primer)	AGTCAAATTAAGCCGCAG	18 bp

Tablo 3.8: PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler.

PZR Bileşenleri	1 PZR Tüpü İçerisindeki Miktar
5X HOT FIREPol® Blend Master Mix	2 µl
İleri Primer (10 µM)	0,2 µl
Geri Primer (10 µM)	0,2 µl
DNA (100 ng)	0,5 µl
Su	7,1 µl
Toplam	10 µl

Tablo 3.9: PZR reaksiyonunda kullanılan basamaklar ve süreleri.

Reaksiyon basamağı	Reaksiyon sıcaklığı (°C)	Reaksiyon süresi	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	35
Bağlanma	*46-55	30 sn	
Uzama	72	30 sn	
Son uzama	72	5 dk	1
Muhafaza	4	∞	
*Gradient PZR ile optimum bağlanma sıcaklığı belirlenmiştir.			

3.4.5. Agaroz Jel Elektroforezi

PZR reaksiyonu gerçekleştirildikten sonra sonucun kontrol edilebilmesi için agaroz jel elektroforezi yapıldı. Öncelikle, %1 yoğunlukta agaroz jel hazırlandı. Bunun için 0,3 g agaroz tartılarak erlene konuldu ve üzerine 30 ml 1X TAE tamponu eklendi. Hazırlanan karışım mikrodalgada 1.5-2 dakika tamamen çözülünceye kadar ısıtıldı. Homojen hale gelen çözeltinin üzerine 1,5 µl Red Safe eklendi. Daha sonra, hazırlanan jel solüsyonu üzerinde kabarcık kalmamasına dikkat edilerek kasete döküldü. Dökülen jelin tamamen donması için oda sıcaklığında bekletildi ve donduktan sonra tarak kısmı çıkartıldı. Ardından hazırlanan jel tanka yerleştirildi ve tank içerisine jelin üzerini kaplayacak şekilde 1X TAE tamponu eklendi. DNA örneklerinin boyutlarını görebilmek için ilk kuyucuğa 2 µl DNA markerı yüklendi. Ardından PZR örnekleri pipetaj yapıldıktan sonra diğer kuyucuklara yüklendi. Çalışmaya hazır hale getirilen elektroforezde örnekler 90 Volt gücünde 20 dakika boyunca yürütüldü. Daha sonra, jel görüntüsünü alabilmek için Azure Imager c150 cihazı kullanıldı.

3.5. *Vetiveria zizanioides*'in Saçak Kök Kültürü

Bitki doku kültürüne alınmış olan Vetiver köklerinden saçak kök kültürü elde edebilmek için denemeler yapıldı.

3.5.1. Bakteri Kültürü ve Koşulları

Agrobacterium transformasyonu için *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 ve ATCC 43047 suşları Gebze Teknik Üniversitesi – Mikrobiyota Laboratuvarı'ndan temin edildi. Öncelikle, -80 °C'den alınan bakteri stoklarından çizgi ekim yöntemi ile yarı katı LB besiyeri üzerine bakteri ekimi yapıldı, ardından 30 °C'de 3 gün inkübe edildi. Büyüyen kolonilerden kültürün saf olup olmadığını görebilmek için gram boyama yapıldı. Gram boyama için öncelikle taze kültürden alınan örnek lam üzerine yayıldı. Daha sonra lam üzerine konulan örnek ateşten geçirilerek fiksasyon yapıldı ve kurutuldu. Daha sonra aşağıdaki prosedür sırasıyla gerçekleştirildi [Leboffe,2011].

- Örneğin tamamını kaplayacak şekilde kristal viyole ile boyandı ve 1 dakika bekletildi. Daha sonra distile su ile yıkandı.
- Örneğin üzerine aynı şekilde lugol çözeltisi uygulandı ve 1 dakika bekletildi ardından distile su ile durulandı.
- Daha sonra renksizleştirmek için örnek alkol ile yıkandı.
- Son aşamada ise fuksin uygulaması yapıldı ve 30 saniye bekletildi.

Gram boyamada ilk iki aşamasında kullanılan kristal viyole ve lugol kompleks oluşturur ve bakteri hücreleri oluşan bu kompleksi içine alır. Daha sonra alkol ile muamele edildiğinde gram negatif bakterilerin hücre duvarında yüksek yağ oranı olmasından dolayı porlar oluşurken gram pozitif bakterilerin hücre duvarı su kaybından dolayı büzülür. Bundan dolayı gram negatif bakteri hücreleri alkolle muamele edildikten sonra kristal viyole – lugol kompleksinin porlardan dışarı bırakılmasından dolayı renksizleşir ve son aşamadaki fuksin ile boyandığında pembe renk alırlar [Leboffe,2011]. Bu yüzden boyama sonucunda gram negatif bakteriler pembe renkli görünürken, gram pozitif bakteriler ise mor renkli olarak görülmektedir. Boyama işlemleri yapıldıktan sonra örnekler kurutuldu ve daha sonra ışık mikroskopunda incelendi.

Agrobacterium rhizogenes gram negatif, basil bir toprak bakterisi olduğundan pembe renkte bakteri hücreleri görülmesi beklenmektedir. Daha sonra saf bakteri kültürü ile deneye devam edildi. Bakteri kültüründen alınan tek koloni öncelikle 5 ml LB broth sıvı besiyerine inoküle edildi ve 30 °C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, bakteri kültüründen 1 ml alınarak 50 ml LB sıvı besiyerine inoküle edildi ve tekrar 30 °C’de OD600 değeri 0,6 olana kadar inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde bakteri kültür koşulları saçak kök kültürü uygulamasında kullanılmaya hazır hale getirildi.

3.5.2. Transformasyon Prosedürü

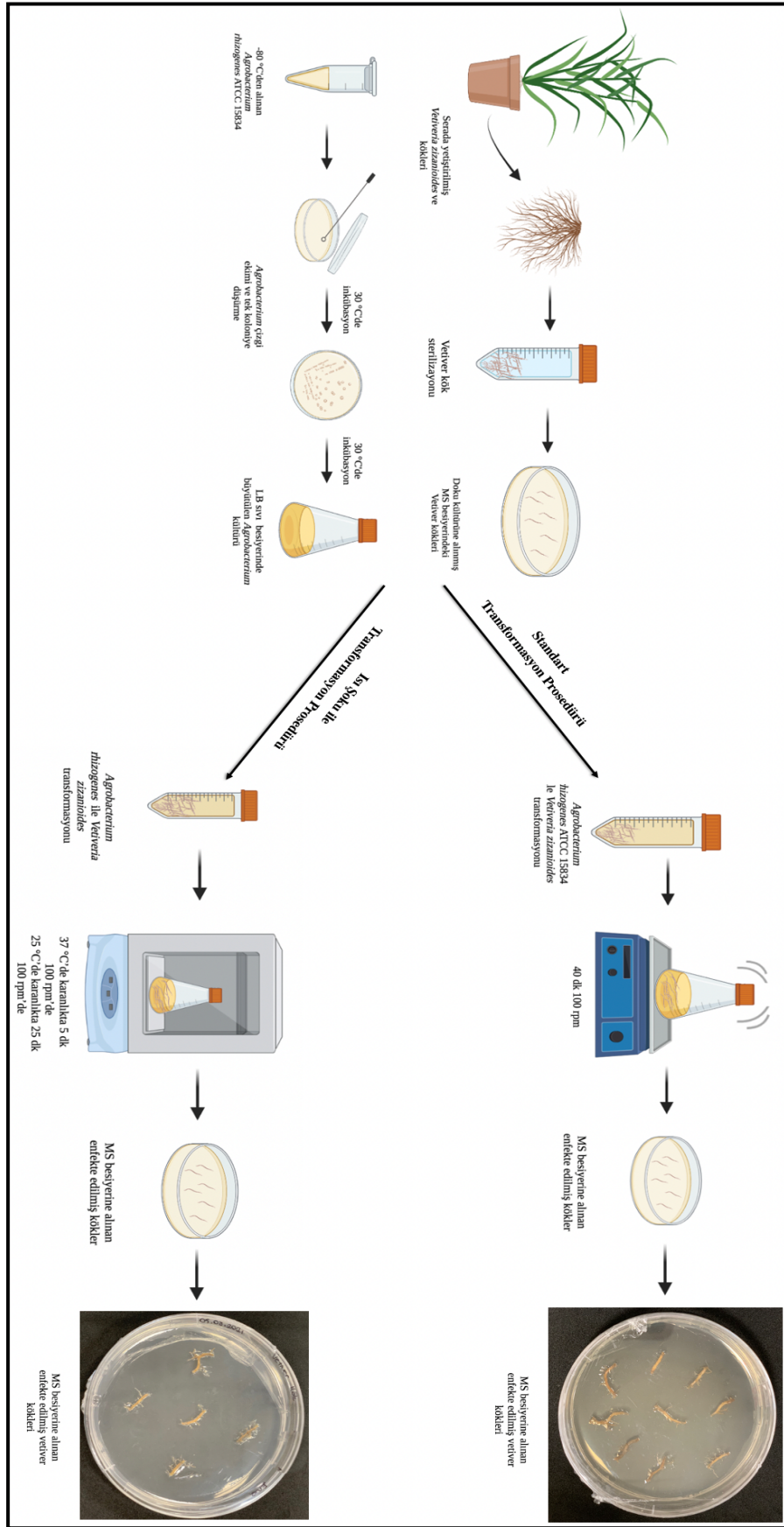
Transformasyon aşamasında standart transformasyon ve ısı şoku ile transformasyon olmak üzere iki farklı prosedür kullanılmıştır. BioRender programı kullanılarak çizilen prosedürün şeması Şekil 3.3’te gösterilmiştir.

3.5.2.1.Standart Transformasyon Prosedürü

Hazırlanmış bakteri kültürünün OD600 değeri 0,6 olduktan sonra kültürden 40 ml alındı ve 15 dakika 4000 rpm’de santrifüj edilerek çöktürüldü. Ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve bakteri pelleti 100 µM acetosyringone içeren 40 ml MS sıvı besiyerinde çözüldü ve vortekslendi. Aseptik koşullar altında doku kültürüne alınmış Vetiver bitki kökleri bisturiyle yaralandı ve ardından kökler hazırlanan süspansiyonun içine aktarıldı. Ardından hazırlanan süspansiyon karanlıkta 40 dakika 100 rpm’de çalkalayıcıda çalkalandı. Daha sonra steril şartlar altında kökler süspansiyondan çıkartıldı ve fazla bakteriden arındırılması için steril filtre kağıdına aktarıldı. Ardından, kökler yarı katı MS besiyerine aktarıldı ve karanlıkta bitki büyütme odasında 3 gün inkübe edildi. Daha sonra köklerin fazla bakteriden kurtulması için örnekler 300 mg/ml Timentin içeren MS besiyerine aktarıldı ve bitki büyüme odasında gelişimleri gözlemlendi.

3.5.2.2. Isı Şoku ile Transformasyon Prosedürü

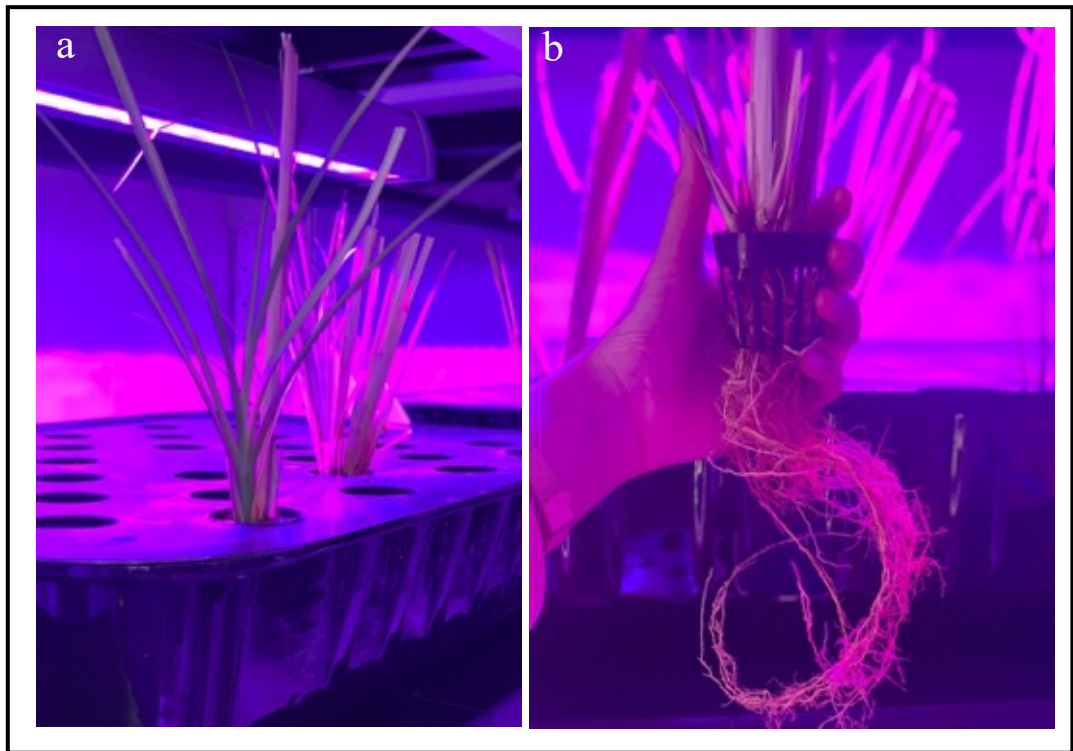
Hazırlanmış bakteri kültürünün OD600 değeri 0,6 olduktan sonra kültürden 40 ml alındı ve 15 dakika 4000 rpm’de santrifüj edilerek çöktürüldü. Ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve bakteri pelleti 100 µM acetosyringone içeren 40 ml MS sıvı besiyerinde çözüldü ve vortekslendi. Aseptik koşullar altında doku kültürüne alınmış Vetiver bitki kökleri bisturiyle yaralandı ve ardından kökler hazırlanan süspansiyonun içine aktarıldı. Hazırlanan süspansiyon 37 °C’de karanlıkta 5 dakika 100 rpm’de çalkalayıcıda çalkalandı. Ardından 25 °C’de karanlıkta 25 dakika çalkalandı. Steril şartlar altında kökler süspansiyondan çıkartıldı ve fazla bakteriden arındırılması için steril filtre kağıdına aktarıldı. Ardından, kökler yarı katı MS besiyerine aktarıldı ve karanlıkta bitki büyütme odasında 3 gün inkübe edildi. Daha sonra köklerin fazla bakteriden kurtulması için örnekler 300 mg/ml Timentin içeren MS besiyerine aktarıldı ve bitki büyüme odasında gelişimleri gözlemlendi.



Şekil 3.3: *Vetiveria zizanioides* saçak kök transformasyon prosedür şeması.

3.6. *Vetiveria zizanioides* Dikey Tarım Uygulaması

Temin edilen bitkiler Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Dikey Tarım Laboratuvarı'nda kapalı sistemler kullanılarak yetiştirildi. Büyüme koşulları şu şekildedir: 24-26 °C 16/8 saatlik fotoperiyot, kırmızı-mavi led ışık. Kullanılan hidroponik sistemde birbirinden bağımsız yetiştirme tepsileri bulunmaktadır (Şekil 3.4) ve her tepsi 1 adet hava motoru içermektedir. Kullanılan kapalı sistemde 2 uzun 2 kısa olmak üzere toplam 4 adet hava taşı bulunmaktadır.



Şekil 3.4: Dikey tarım laboratuvarında yetiştirilen *Vetiveria zizanioides* bitkileri a) Yetiştirme tepsisindeki vetiver bitkileri, b) Vetiver bitki kökleri.

Dikey tarımda yetiştirilen vetiver bitkilerinin EC değeri 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ olarak ayarlandı ve bu değeri koruyacak şekilde 7 günde 1 defa aşağıda içerik listesi verilen besiyerinden tanka eklendi.

Besiyeri içerik listesi; NH_4NO_3 , CaCl_2 , MgSO_4 , KH_2PO_4 , KNO_3 , Boric acid, Cobalt Chloride, Ferrous Sulphate, Manganese Sulphate KI, Na_2MoO_4 , Zinc Sulphate, Copper Sulphate, Myo-İnositol, Nicotinic acid, Pyridoxin, Thiamin, Glycine.

Yukarıda içeriği anlatılan besin çözeltisi 5 lt olarak hazırlandı, su içerisine eklenen kimyasallar çözüldükçe eklendi ve daha sonra pH:5.0 olacak şekilde NaOH pellet ile ayarlandı.

MS besiyeri içeriğinde bulunan ve aşağıda içerik listesi verilen NaFe-EDTA ise ayrı olarak hazırlandı;

- FeSO₄,
- Na-EDTA.

İçeriği tarif edilen NaFe-EDTA 1 lt ve pH:5.0 olarak hazırlandı ve şişesi ışıktan etkilenmemesi için alüminyum folyo ile kaplandı. NaFe-EDTA bileşiği besiyeri ile eklenirken MS besin çözeltisinin %5'i olarak eklendi.

3.7. Ekstraksiyon Çalışmaları

Çalışmada 3 farklı ortamda yetiştirilen vetiver kök örneklerinin ekstraksiyonu Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyon (ASE) cihazı kullanılarak yapıldı. Kökler öncelikle 72 saat karanlıkta ve oda sıcaklığında kurutulduktan sonra toz haline getirildi.

ASE Koşulları: Her bir yetiştirme koşulu için 300 mg $\pm$ 0.5 mg vetiver kök örneği ve 300 mg $\pm$ 0.5 mg diatomik toprak tartılarak 22 mL' lik ekstraksiyon hücresine yerleştirildi. Ekstraksiyon koşulları aşağıda belirtildiği şekilde ayarlandı:

Tablo 3.10: Hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu koşulları.

Sıcaklık	50 °C
Statik zaman	5 dk
Temizleme hacmi	% 60
Yıkama zamanı	90 sn
Statik devir	2
Basınç	150 psi

Ekstraksiyon veriminin doğru hesaplanabilmesi için uçurma balonları yıkandıktan sonra 110 °C etüvde 2 saat bekletildikten sonra 2 saat desikatörde

bekletildi ve uçurtma balonlarının boş darası hesaplandı. Elde edilen ekstrakt öncelikle kaba filtre kağıdından daha sonra Whatman (No:2) filtre kağıdından geçirilerek süzüldü. Süzülen örnekler darası alınan uçurma balonlarına alındı ve 40 °C’ de evaporatörde uçurma işlemi uygulandı. Çözücüsü ortamdan tamamen uzaklaştırılan ekstrakt desikatörde 2 saat boyunca bekletildi. Desikatörde soğuma aşamasından sonra sabit tartıma getirilen uçurma balonlarının ağırlığı tartıldı. Ekstrakt miktarı ve ekstrakt verimi hesaplandı. Son aşamada ekstraktlar çözücülerinde çözülerek stok çözeltiler hazırlandı. Çalışmada etanol, ultra saf su ve hekzan olmak üzere 3 farklı çözücü kullanıldı. Hekzan ve etanol örnekleri 40 ml’de, ultra saf su örnekleri 45 ml’de çözülerek stok çözeltiler hazırlandı.

Ekstraksiyon verimi;

$$\begin{aligned} &\text{Ekstrakt İçeren Uçurma Balonu Ağırlığı (g) - Boş Uçurma Balonu Ağırlığı (g)} \\ &= \text{Ekstrakt Miktarı (g).} \end{aligned} \quad (3.1)$$

$$\begin{aligned} &\text{Ekstrakt Miktarı (g) / Ekstraksiyona Alınan Kök Miktarı (300 mg) x 100 =} \\ &\text{Ekstrakt Verimi (\%)} \text{ (1 g kök için).} \end{aligned} \quad (3.2)$$

$$\begin{aligned} &\text{Ekstrakt Miktarı (mg) / Çözücü miktarı (ml) = 1 mL’deki Ekstrakt Miktarı} \\ &\text{(mg/mL)} \end{aligned} \quad (3.3)$$

denklemleriyle hesaplandı.

3.8. Toplam Fenolik Madde Tayini

Hazırlanan stok ekstrakt çözeltilerinin toplam fenolik asit miktar tayini Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak gerçekleştirildi. Slinkard ve Singleton’un metodu modifiye edilerek toplam fenolik asit miktarı Gallik Asit (GA)’e eşdeğer olarak hesaplandı.

Öncelikle 1 mg/mL olan GA ana stok standart solüsyonları hazırlandı. 10 mg GA tartıldı ve 10 mL MeOH ile çözülerek stok çözeltisi elde edildi. Stoktan 1000 µg/mL- 500 µg/mL-250 µg/mL-125 µg/mL-62,5 µg/mL-31,25 µg/mL-15,75 µg/mL-7,875 µg/ml konsantrasyonlarının her birinden 10 ml standart GA çözeltileri hazırlandı. Her bir ekstrakt stoğundan son konsantrasyon 5 mg/mL olacak şekilde ara stok çözeltisinden 15 ml'lik falkon içerisinde 10 ml solüsyon hazırlandı. Toplam fenolik asit miktar tayini için gerekli diğer kimyasalların hazırlığında;

- 0,2N Folin: 2 N Folinden 1 ml alınarak üzerine 9 ml ultra saf su ile çözüldü.
- %7,5 (a/v) Sodyum Karbonat (Na₂CO₃): 7,5 g Na₂CO₃ tartıldı ve 100 ml ultra saf su ile çözüldü.

Toplam fenolik asit miktar tayini için reaksiyon tüpü hazırlığı Tablo 3.11'de gösterilmiştir.

Tablo 3.11: Toplam fenolik asit miktarı tayini için reaksiyon tüplerinin hazırlanması.

Gallik Asit		Ekstrakt	
Ultra Saf Su	950 µl	Ultra Saf Su	800 µl
GA	50 µl	Örnek	200 µl
*Na ₂ CO ₃ (%7,5)	750 µl	*Na ₂ CO ₃ (%7,5)	750 µl
*Folin (0,2 N)	250 µl	*Folin (0,2 N)	250 µl
Toplam	2000 µl	Toplam	2000 µl
* Eklemelerden sonra vorteks yapıldı. Çalışma üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.			

Reaksiyon tüpleri hazırlandıktan sonra tüpler 2 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildi. Ardından tüm örnekler 765 nm dalga boyunda ultra saf suya karşı okundu. GA standart derişimlerinin absorbans farklarına karşı grafiğe geçilerek, kalibrasyon grafiği elde edildi. Kalibrasyon grafiği kullanılarak ekstraktların toplam fenolik asit miktarı içeriği mg GAE/1g ekstrakt±Standart Hata (SE) olarak hesaplandı.

3.9. Toplam Flavonoid Madde Tayini

Hazırlanan ekstrakt çözeltilerinin toplam flavonoid madde miktarı Barros ve arkadaşlarının (2007) rapor ettikleri çalışma modifiye edilerek Quercetin (QE)'e eşdeğer olarak hesaplandı. Öncelikle, Quercetin, (%95 saflık) standartı yapıldı. 10,52 mg Quercetin, 10 mL EtOH'de çözülerek ana stok hazırlandı. Ana stoktan 400 µg/mL - 350 µg/mL - 300 µg/mL - 250 µg/mL - 200 µg/mL - 150 µg/mL - 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda her bir örnek için 2 mL standart QE çözeltisi hazırlandı.

Toplam flavonoid miktar tayini için gerekli olan diğer kimyasalların hazırlığı aşağıda belirtildiği gibi yapıldı;

- %5'lik NaNO₂: 2,5 g NaNO₂ hassas terazide tartıldı ve 50 ml ultra saf su eklenerek çözüldü.
- %10'luk AlCl₃: 5 g AlCl₃ hassas terazide tartılarak 50 mL MeOH ile çözüldü. (Tartılan AlCl₃ üzerine MeOH hızlıca aktarılarak çözelti şeffaf olana kadar karıştırıldı. Çözelti tamamen berrak olduktan sonra kullanıldı.)
- 1 M NaOH: 8 g NaOH hassas terazide tartıldı ve 200 ml ultra saf su ile çözüldü.

Toplam flavonoid madde tayini için reaksiyon tüpü içerikleri Tablo 3.12'de gösterilmiştir.

Tablo 3.12: Toplam flavonoid madde miktarı tayini için reaksiyon tüplerinin hazırlanması.

Kör		Quercetin		Ekstrakt	
Bileşen	Miktar	Bileşen	Miktar	Bileşen	Miktar
Ultra Saf Su	100 µl	QE	100 µl	Örnek	100 µl
Ultra Saf Su	400 µl	Ultra Saf Su	400 µl	Ultra Saf Su	400 µl
%5'lik NaNO ₂	30 µl	%5'lik NaNO ₂	30 µl	%5'lik NaNO ₂	30 µl
%10'luk AlCl ₃ :	30 µl	%10'luk AlCl ₃ :	30 µl	%10'luk AlCl ₃ :	30 µl

Tablo 3.12: Devam.

1 M NaOH	200 µl	1 M NaOH	200 µl	1 M NaOH	200 µl
*Ultra Saf Su	240 µl	*Ultra Saf Su	240 µl	*Ultra Saf Su	240 µl
Toplam	1000 µl	Toplam	1000 µl	Toplam	1000 µl
*Bileşen eklendikten sonra karışım vortekslendi. ‡ Çalışma üç tekrar olarak gerçekleştirildi.					

Reaksiyon tüpleri Tablo 3.12'deki gibi hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında 40 dk karanlık ortamda bekletildi. Ardından örneklerin 515 nm dalga boyunda kör örneğe karşı absorbans ölçümleri yapıldı.

QE standart derişimlerinin absorbans farklarına karşı grafiğe geçilerek, kalibrasyon grafiği elde edildi. Kalibrasyon grafiği kullanılarak ekstraktların toplam flavonoid madde içeriği mg QE eşdeğeri / 1g polen ekstraktı $\pm$ SE olarak hesaplandı.

3.10. Antioksidan Tayini

3.10.1. DPPH Yöntemiyle Antioksidan Kapasite Tayini

DPPH serbest radikal giderme antioksidan aktivite değerleri Brand-Williams ve arkadaşlarının (1995) rapor ettikleri çalışmadaki gibi troloks eşdeğeri (TE) cinsinden hesaplaması yapıldı.

Öncelikle 800 uM Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil-kroman-2karboksilik asit) standardı için ana stok hazırlandı. 20,6 mg Troloks (%97 saflıkta), 100 mL MeOH ile çözüldü. Ardından ana stoktan konsantrasyonları sırasıyla 560 uM, 520 uM, 480 uM, 440 uM, 400 uM, 360 uM, 320 uM, 280 uM, 240 uM, 200 uM, 160 uM, 120 uM, 80 uM, 40 uM ve 20 uM olan 5 ml'lik Troloks çözeltileri hazırlandı. Her bir reaksiyon tüpü içeriği Tablo 3.13'de verilmiştir.

Tablo 3.13: DPPH tayini reaksiyon tüplerinin içeriği.

Trolox		Ekstrakt	
Trolox	100 µl	Örnek	100 µl
*DPPH	900 µl	*DPPH	900 µl
Toplam	1000 µl	Toplam	1000 µl
*Ekllemelerden sonra vorteks yapıldı.			

Hazırlanan örnek tüpleri oda sıcaklığında 50 dakika boyunca inkübe edildi. Daha sonra örneklerin absorpsanları 517 nm dalga boyunda ölçüldü. Aşağıda verilen denklem ile % inhibisyon değeri hesaplandı:

$$\% \text{ DPPH serbest radikal giderme} = \left[\frac{(\text{Ab}_{\text{Skontrol}} - \text{Ab}_{\text{Stroloks/numune}})}{\text{Ab}_{\text{Skontrol}}} \right] \times 100$$

(3.4)

Hesaplamalar yapıldıktan sonra % DPPH serbest radikal giderme-konsantrasyon türünden kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Grafikten elde edilen doğru denklem ile toplam antioksidan kapasite değerleri hesaplandı.

3.10.2. ABTS/TEAK (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) Yöntemiyle Antioksidan Kapasite Tayini

Hazırlanan ekstrakt çözeltilerinin Re ve arkadaşlarının (1999) çalışmalarında rapor ettikleri gibi ABTS aktivite değerleri Troloks eşdeğeri cinsinden hesaplandı. Öncelikle 800 µM Troloks standartı stok çözeltisi hazırlandı. 20,6 mg Troloks (%97 Saflıkta) 100 ml MeOH ile çözüldü. Konsantrasyonlar sırasıyla 560 uM-520 uM -480 uM -440 uM-400 uM-360 uM -320 uM -280 uM-240 uM-200 uM- 160 uM-120 uM- 80 uM- 40 uM ve 20 uM olacak şekilde 5 ml’lik Troloks standart çözeltileri hazırlandı. Reaksiyon tüp içeriği Tablo 3.14’te gösterilmiştir.

ABTS stok çözeltisinin içeriği şu şekildedir: 6,64 mg (K₂S₂O₈) Potasyum Per Sülfat (2,54 mM), 38,4 mg ABTS (7 mM) ve 10 ml ultra saf suda çözüldü. Ardından çözelti oda sıcaklığında 12-16 saat inkübe edildikten sonra çalışmalarda kullanıldı. 1.25 ml ABTS stok çözeltisinden alındı ve üzerine 48.75 ml EtOH eklenerek 0,75-0,8 aralığında absorpsan (734 nm) elde edilecek şekilde ABTS çözeltisi hazırlandı.

Tablo 3.14: ABTS tayini için reaksiyon tüplerinin hazırlanması.

Ekstrakt reaksiyon tüpü		Troloks reaksiyon tüpü	
*ABTS	100 µl	*ABTS	100 µl
Örnek	900 µl	Troloks	900 µl
Toplam	1000 µl	Toplam	1000 µl
*Karışım vortekslendi. Çalışma üç tekrar olarak gerçekleştirildi			

Aşağıda belirtilen denklem ile % ABTS radikal giderme hesaplandı:

$$\% \text{ ABTS radikal giderme} = [(Ab_{\text{Skontrol}} - Ab_{\text{Stroloks/numune}}) / Ab_{\text{Skontrol}}] \times 100 \quad (3.5)$$

% ABTS radikal giderme-konsantrasyon değerleri hesaplandıktan sonra kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Elde edilen doğru denklemiyle toplam antioksidan kapasite değerlerinin Troloks eşdeğeri hesaplandı.

3.11. GC-MS Analizi

Hazırlanan ekstrakt çözeltilerinden GC-MS’de sıvı numune hazırlandı. Bunun için öncelikle 100 µl örnek ağız kapaklı bir tüpe konuldu. Ardından tüpe 10 ml hekzan eklendi ve vortekslendi. 100 µl 2 N KOH (metanolik) eklendi ve 30 sn vortekslendi. 10 dk boyunca 4500 rpm’de santrifüj edildi. Üst kısımdan 1.5 ml vialle alındı ve GC-MS’de analiz edildi. Analizde Agilent marka 78904 model GC, 5975C model MS ile beraber FID dedektör eş zamanlı olarak kullanıldı. Kolon J&W 122-7061 kullanıldı. Kolonun özellikleri: 250 °C: 60m x 250 µm x 0.15 µm. Enjeksiyon hacmi 1 µl ve splitless mod seçildi. Kolon akış hızı 1 ml, taşıyıcı gaz ise helyumdur, inlet basıncı 20.83 psi, toplam akış 34 ml/min.

Kromatografik koşullar ise şu şekildedir: 50 °C’den başlar burada 2 dakika bekler ve 200 °C’ye 20 °C/dk hızla ulaşır ve daha sonra 230 °C’ye 5 °C/dk hızla ulaşır ve burada 30 dakika bekler. Toplam analiz süresi 55.5 dakikadır.

4. SONUÇLAR

4.1. Doku Kültürü Uygulama Sonuçları

Kontaminasyonu gidermek için Captan, Canesten, Nazotem, Fosetyl Aliette, Maxim gibi birkaç kimyasal çeşitli konsantrasyonlarda kullanılarak ve farklı besi ortamlarına alınarak sterilizasyon denemeleri yapıldı, Şekil 4.1’de kontamine olmuş vetiver kökleri gösterilmektedir.

Denemeler sonucunda küflenme görülmeyen optimize edilmiş prosedürde kullanılan besin ortamı içeriği Tablo 4.1’de, kullanılan prosedürlerde görülen kontaminasyon yüzdeleri ise Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

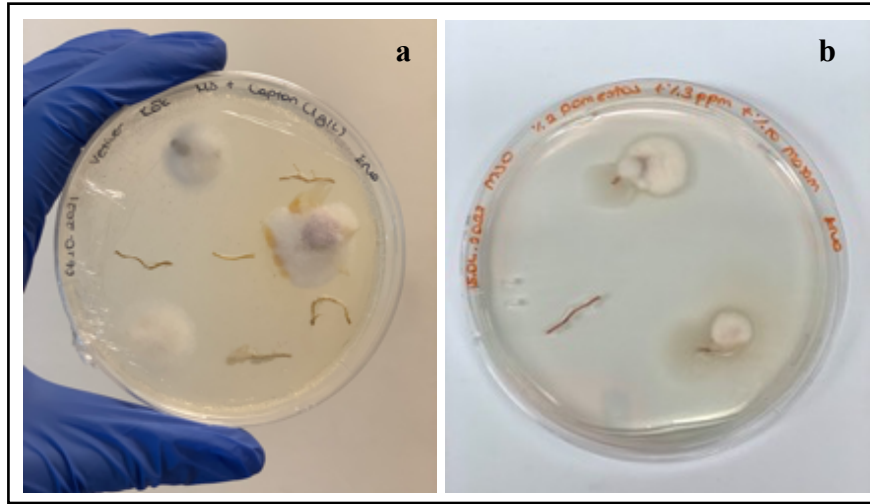
Optimize edilen prosedür için; Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Serası’ndan alınan bitki örnekleri akan musluk suyunda 30 dakika boyunca yıkandı. Daha sonra kabinde %70 EtOH solüsyonunda 2 dakika çalkalandı. Ardından solüsyon dökülerek örnekler steril dH₂O ile 1-2 dakika çalkalanarak durulandı. Bir sonraki aşamada örnekler 800 µl ticari çamaşır suyu (<%5 Sodyum hipoklorit), 0,024 g L-Ascorbic acid içeren çözeltiyle 20 dakika boyunca çalkalandı. Ardından steril dH₂O ile 5’er dakika süreyle 3 kez durulandı. Son aşamada ise, durulanan örnekler 4 g/L Captan fungusit çözeltisiyle 30 dakika boyunca çalkalandı. Ardından, örnekler steril dH₂O ile 5’er dakika süreyle 3 kez durulandı ve steril filtre kâğıdı üzerinde 10 dakika boyunca kurutuldu. Steril kökler ml/L PPM içeren MS besiyerine (Tablo 4.1) alındı. Kullanılan prosedürlerde elde edilen kontaminasyon yüzdeleri kültür başlatıldıktan 2 hafta sonra hesaplandı.

Tablo 4.1: Optimize edilmiş besin ortamı içeriği.

Reaktif	Miktar (Ağırlık/Hacim)	Hazırlanışı
MS	4.43 g/L	Hazırlanan 500 ml MS besiyerine otoklava atmadan önce 2 ml PPM eklendi.
Sükroz	30 g/L	
PPM	5 ml/L	
Agar	7 g/L	

Tablo 4.2: *Vetiveria zizanioides* için yüzey sterilizasyon prosedürlerinin kontaminasyon yüzdeleri.

	Besiyeri	Kontaminasyon (%)*
1. Sterilizasyon	MS+5ml/L PPM	%0
	0,75ml/L Nazatem	%40
2. Sterilizasyon	MS	%38
	MS + 5 g/L Canesten	%32
3. Sterilizasyon	MS	%42
4. Sterilizasyon	MS	%56
	MS + %1 Maxim	%44
*Her bir deneme en az 25 eksplant ile yapılmıştır. Veriler kültür başlatıldıktan 2 hafta sonra toplanmıştır.		



Şekil 4.1: Bitki doku kültüründe kontamine olmuş vetiver kökleri; a) 1 g/L Captan içeren besiyerindeki vetiver kökleri, b) MS besiyerindeki vetiver kökleri.



Şekil 4.2: Optimize edilen prosedürle bitki doku kültürüne alınan MS + 5ml/L PPM besiyerindeki 3 haftalık vetiver kökleri.

4.2. DNA İzolasyon Sonuçları

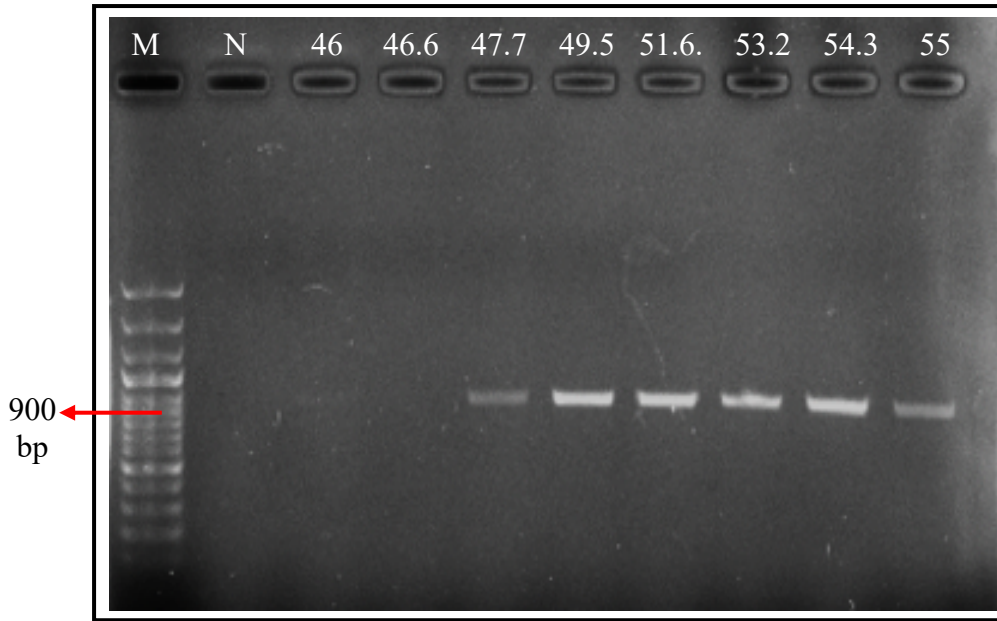
Bitki doku kültürüne alınan Vetiver köklerinde görülen küflerden 2 örnek alınarak, CTAB protokolü ile genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA örneklerinin NanoDrop™ cihazı ile spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda örneklerden elde edilen DNA miktarı ve saflık dereceleri Tablo 4.3'te gösterilmiştir. 260 nm ve 280 nm'lerdeki absorbans oranı, DNA'nın saflığını değerlendirmek için kullanılır. A260/280 oranı DNA için ~1.8 olduğunda DNA saf olarak kabul edilir. Bu oranın düşük olması protein, fenol veya diğer kirliliklerin olduğunu gösterir. Zhang et al. (2008) PZR reaksiyonu için kullanılacak olan DNA'nın saflık oranının 1.7-1.9 aralığında olduğunda reaksiyon için yeterli DNA miktarının olduğunu bildirmiştir. Tablo 4.3'te izole edilen DNA'ların saflık dereceleri gösterilmiştir. İzole edilen iki DNA örneği de bu aralıkta olduğundan PZR reaksiyonu için kullanılmıştır.

Tablo 4.3: DNA'ların spektrofotometrik ölçüm sonuçları ve saflık miktarları.

Örnek	DNA Miktarı (ng/μl)	Saflık Derecesi (A260/280)
1	709.7	1.86
2	1543.2	1.92

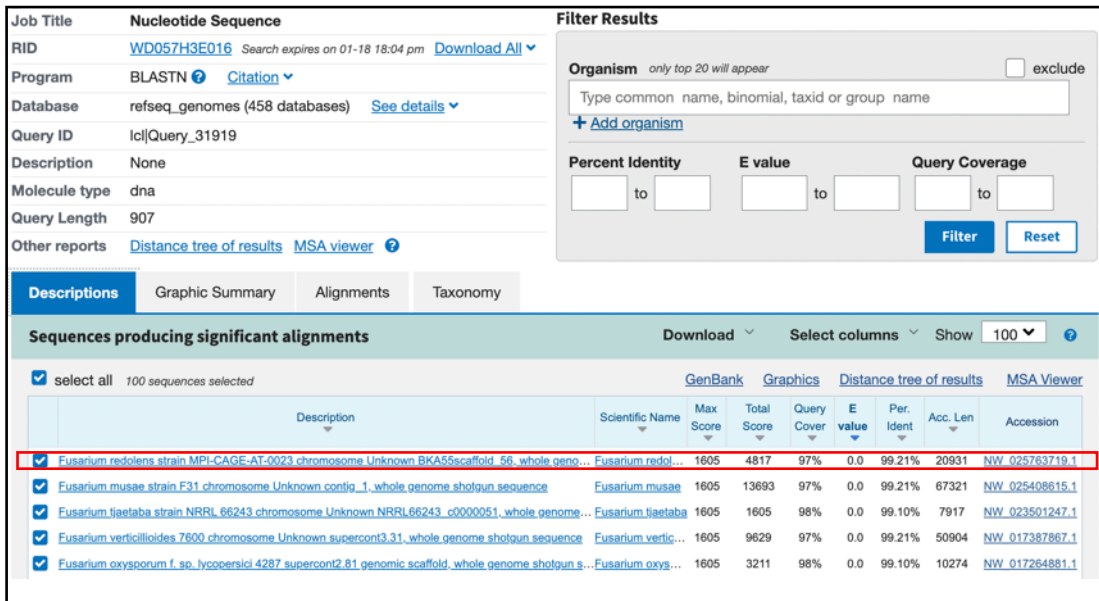
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Dizileme Sonuçları

İzole edilen DNA örneklerini doğrulamak amacıyla, Sentebiolab firmasından temin edilen UF1 ve S3 primerleriyle gradient PZR reaksiyonu kuruldu. Reaksiyon ürünü %1'lik agaroz jelde 100 voltta 30 dakika boyunca yürütüldü. Biorad görüntüleme cihazı ile elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.3'te gösterilmiştir. PZR reaksiyonu ile çoğaltılan bölge 926 bp boyutunda olduğundan bu bölgede beklenen bantlar elde edilmiştir. 49.5-54.3 °C sıcaklıkları arasında daha net bantlar gözlemlendi. 100 bp DNA marker kullanıldı.



Şekil 4.3: 46-55 °C’deki gradient PZR agaroz jel elektroforez görüntüsü, N: negatif kontrol, M: marker.

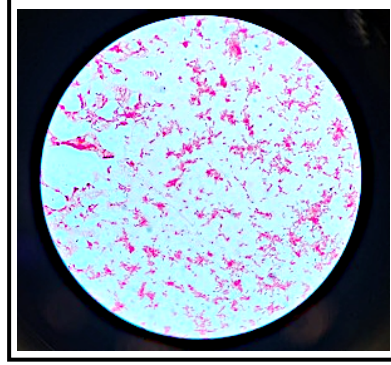
Sterilizasyon optimizasyon denemeleri sırasında örneklerin tamamında küflenme görüldü. Oluşan kontaminasyonun kaynağını tanımlayabilmek için oluşan küflerden alınan örneklerden CTAB ile DNA izolasyonu yapıldı ve ardından BM Laboratuvar Sistemleri firmasına Sanger dizilemesi için gönderildi. Sekans sonuçlarının analizi için ise BLAST veritabanı kullanıldı (Şekil 4.4). Kontaminasyona neden olan organizmanın *Fusarium sp.* ile eşleştiği görüldü.



Şekil 4.4: Kontaminasyon kaynağından izole edilen DNA örneğinin BLAST analizi.

4.4. Gram Boyama Sonuçları

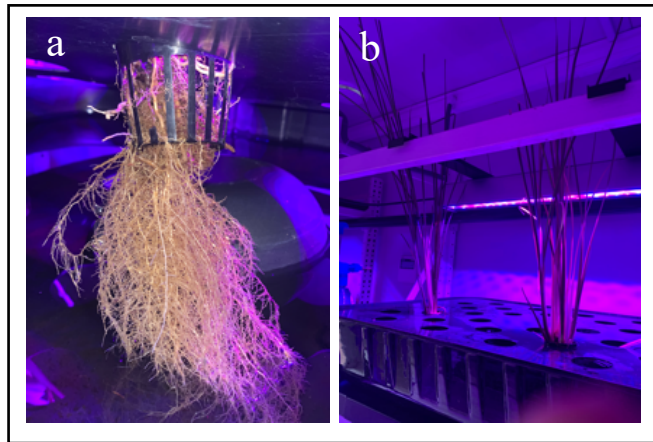
Gram boyama yapıldıktan sonra ışık mikroskobu altında 100X görüntüsü alınan *Agrobacterium rhizogenes* 15834 suşunun görüntüsü Şekil 4.5'te verilmiştir. Sonuç beklenildiği gibi bakteri gram negatif olduğu için pembe renge boyanmıştır ve çubuk şeklinde (basil) yapıya sahiptir ve kültürün saf olduğu görülmüştür.



Şekil 4.5: *Agrobacterium rhizogenes* 15834 suşu ışık mikroskobu altındaki 100X görüntüsü.

4.5. Dikey Tarımda ve Serada Yetiştirilen Örnek Sonuçları

Dikey tarımda yetiştirilmiş 10 haftalık vetiver bitkisi kökleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Dikey tarımda yetiştirilen köklerin morfolojik olarak daha ince tüy yapısına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Vetiver kök uzunluğu dikey tarımda 10 haftada 28 cm'e kadar ulaşmıştır.



Şekil 4.6: a) Dikey tarımda yetiştirilen vetiver kök yapısı, b) vetiver bitkisi.



Şekil 4.7: Serada yetiştirilmiş (sol) ve dikey tarımda yetiştirilmiş (sağ) vetiver kök örnekleri.

Serada yetiştirilen vetiver örneklerinin daha kalın kök yapısına sahip olduğu gözlemlendi. Şekil 4.8’de 16 hafta sera koşullarında yetiştirilen vetiver bitki ve kök yapısı gösterilmektedir.



Şekil 4.8: a) Serada yetiştirilmiş vetiver kökleri, b) vetiver bitkisi.

4.6. Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyon (ASE) Sonuçları

Farklı ortamlarda yetiştirilen vetiver bitkisine ait kök örneklerinde kullanılan ekstraksiyon çözücüsü, ekstrakt miktarı ve ekstraksiyon verimi Tablo 4.4’teki gibidir. Ekstraksiyon veriminin en çok %16,3 olduğu görülmektedir. Bu örnekler ultra saf su ile çözülen bitki doku kültürü ve sera örnekleridir.

Tablo 4.4: Hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu sonuçları.

Kök Örnekleri	Ekstraksiyon Çözücüsü	Ekstrakt Miktarı (mg)	Ekstraksiyon Verimi (%)
Sera	Hekzan	31	10,3
Sera	Ultra saf su	40	13,3
Sera	Etanol	12	4
Dikey tarım	Hekzan	31	10,3
Dikey tarım	Ultra saf su	18	6
Dikey tarım	Etanol	16	5,3
Bitki Doku Kültürü	Hekzan	30	10
Bitki Doku Kültürü	Ultra saf su	49	16,3
Bitki Doku Kültürü	Etanol	28	9,3

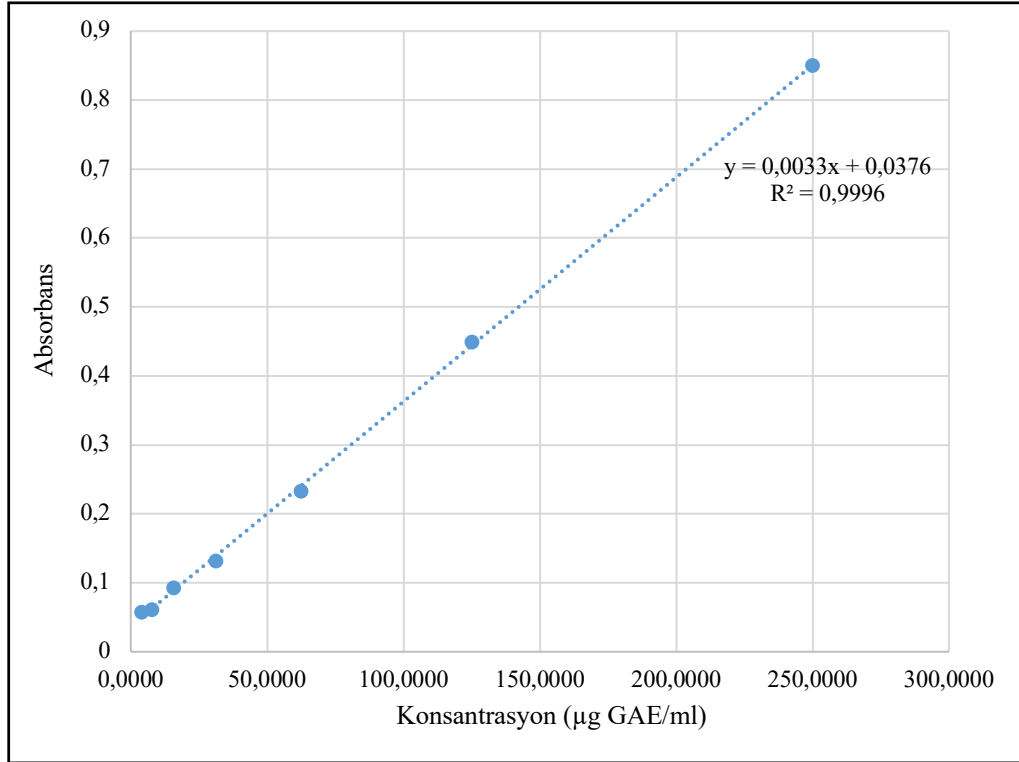
Farklı ortamlarda yetiştirilen vetiver bitkisine ait kök örneklerinin ekstraksiyon çözücüsü, çözücü miktarı ve konsantrasyon değerleri Tablo 4.5'teki gibidir. Hekzan ve etanol ile çözülen örnekler 40 ml'de, ultra saf su ile çözülen örnekler 45 ml'de çözülerek konsantrasyonları hesaplanmıştır.

Tablo 4.5: Ekstraksiyon örneklerinin stok konsantrasyonları.

Kök Örnekleri	Ekstraksiyon Çözücüsü	Çözücü Miktarı (ml)	Konsantrasyon (mg/ml)
Sera	Hekzan	40	0,78
Sera	Ultra saf su	45	0,9
Sera	Etanol	40	0,3
Dikey tarım	Hekzan	40	0,79
Dikey tarım	Ultra saf su	45	0,4
Dikey tarım	Etanol	40	0,4
Bitki Doku Kültürü	Hekzan	40	0,7
Bitki Doku Kültürü	Ultra saf su	45	1,1
Bitki Doku Kültürü	Etanol	40	0,77

4.7. Toplam Fenolik Madde Tayini Sonuçları

Vetiver kök örneklerinin hızlandırılmış solvent ekstraksiyon yöntemiyle farklı çözücülerle elde edilen ekstraktlardan toplam fenolik madde miktarının gallik asit eşdeğeri (GAE) hesaplanarak Tablo 4.6’da gösterilmiştir. Hesaplamalar hazırlanan gallik asit (GA) kalibrasyon grafiği ve denklemi (Şekil 4.9) kullanılarak yapıldı.



Şekil 4.9: Toplam fenolik asit madde tayini için Gallik Asit kalibrasyon grafiği.

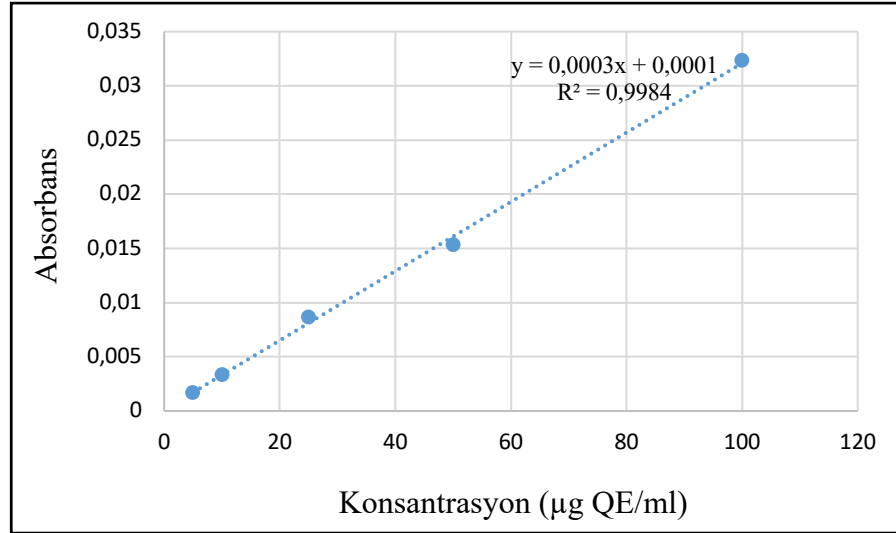
Tablo 4.6’da ekstraksiyondan sonra farklı çözücülerle (ultra saf su, etanol) çözülmüş örneklerden alınan 200 µl örnek için Gallik Asit kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanan toplam fenolik asit miktarı gösterilmektedir. Total fenolik asit miktarı en çok etanol ile çözülmüş örneklerde görüldü. Bu örneklerdeki total fenolik asit içeriği en yüksek olanlar sırasıyla sera ekstrakt örneği, dikey tarım örneği ve bitki doku kültürü örneğidir.

Tablo 4.6: Kök ekstraktlarının GAE cinsinden fenolik madde miktarı.

Örnek	Ekstrakt Çözücüsü	Fenolik Miktar GAE (µg/ml) ± SS
Sera	Ultra saf su	7,89 ± 0,4
Sera	Etanol	118,7 ± 3,7
Dikey tarım	Ultra saf su	15,73 ± 1,72
Dikey tarım	Etanol	69,27 ± 6,72
Bitki Doku Kültürü	Etanol	40,56 ± 1,91
Bitki Doku Kültürü	Ultra saf su	6,55 ± 0,11

4.8. Toplam Flavonoid Madde Tayini Sonuçları

Elde edilen kök ekstraktlarının toplam flavonoid madde tayini için farklı konsantrasyonlardaki Quercetin (QE) miktarının 765 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kullanılarak Şekil 4.10'da gösterilen kalibrasyon grafiği ve denklemi elde edilmiştir.



Şekil 4.10 Toplam flavonoid madde tayini için Quercetin (QE) kalibrasyon grafiği.

Elde edilen doğru denkleminde yararlanılarak, her biri 300 mg olan kök örneklerinden elde edilen ekstraktların toplam flavonoid miktarı QE cinsinden

hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.7’de gösterilmiştir. En çok flavonoid miktarı etanol ile çözülmüş örneklerden sırasıyla dikey tarım, sera ve doku kültürü örneklerinden elde edilmiştir.

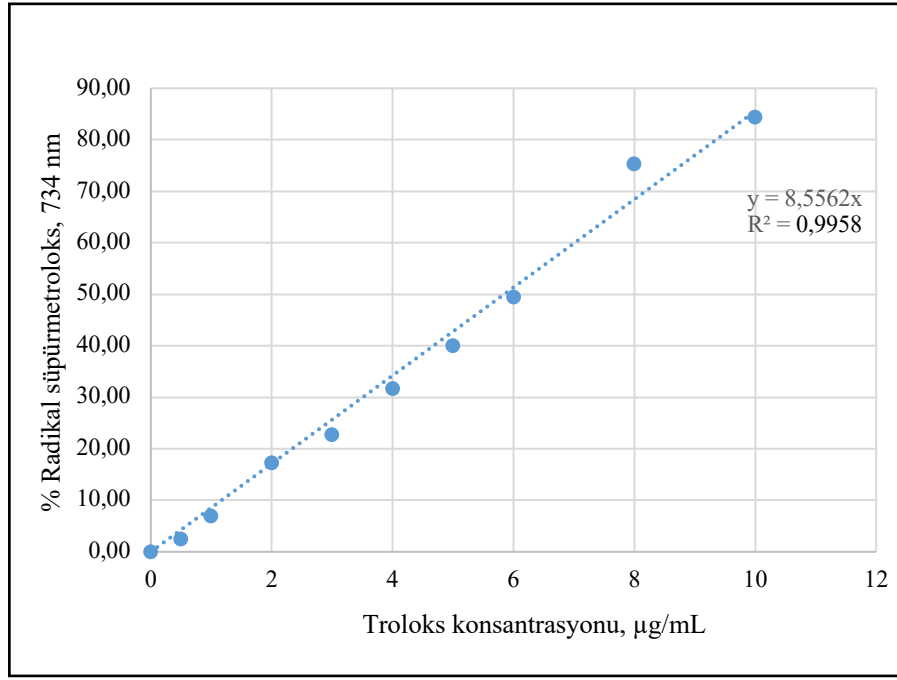
Tablo 4.7: Kök ekstraktlarının toplam flavonoid miktarının QE cinsinden değerleri.

Örnek	Ektraksiyon Çözücüsü	Flavonoid Miktarı (QE) ($\mu\text{g/ml}$) $\pm$ SS
Sera	Ultra saf su	$4,14 \pm 1,07$
Sera	Etanol	$75,37 \pm 8,49$
Dikey tarım	Ultra saf su	$10,69 \pm 2,41$
Dikey tarım	Etanol	$78,75 \pm 4,17$
Bitki Doku Kültürü	Etanol	$26,75 \pm 3,64$
Bitki Doku Kültürü	Ultra saf su	$4,9 \pm 0,87$

4.9. Antioksidan Aktivesi Tayini Sonuçları

4.9.1. DPPH ile Antioksidan Kapasite Tayini Sonuçları

Kök ekstraktlarının DPPH ile antioksidan tayini için oluşturulan kalibrasyon grafiği ve denklemi Şekil 4.11’de gösterilmiştir.



Şekil 4.11: DPPH ile antioksidan kapasitesi tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği ve denklemi.

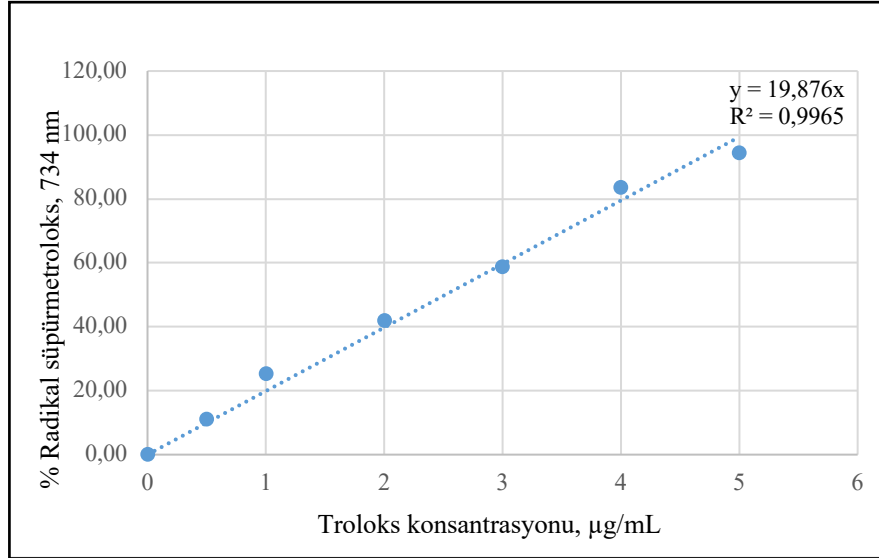
Elde edilen kalibrasyon grafiği ve denklemi ile her bir ekstraktın DPPH antioksidan kapasitesi mg TE/1g kök ekstraktı cinsinden değeri Tablo 4.8’de görüldüğü gibi hesaplandı. DPPH antioksidan kapasitesi en çok etanol ile çözülen sera örneğinde görüldü. Diğer örnekler sırasıyla etanol ile çözülmüş dikey tarım örneği ve etanol ile çözülmüş doku kültürü örneğidir.

Tablo 4.8: DPPH antioksidan kapasite tayini sonuçları.

Örnek	Ekstraksiyon Çözücüsü	DPPH Antioksidan Kapasitesi T.E. ug/mg kök ekstraktı ± SS
Sera	Ultra saf su	4,12 ± 0,3
Sera	Etanol	21,61 ± 0,69
Dikey tarım	Ultra saf su	5,49 ± 0,39
Dikey tarım	Etanol	16,38 ± 1,22
Bitki Doku Kültürü	Etanol	11,02 ± 0,29
Bitki Doku Kültürü	Ultra saf su	2,74 ± 0,14

4.9.2. ABTS/TEAK ile Antioksidan Kapasite Tayini Sonuçları

ABTS serbest radikal giderme antioksidan kapasite tayini için Şekil 4.12’de gösterilen kalibrasyon grafiği ve denklemi elde edilmiştir.



Şekil 4.12: ABTS/TEAK ile antioksidan kapasite değerlerinin kalibrasyon grafiği ve denklemi.

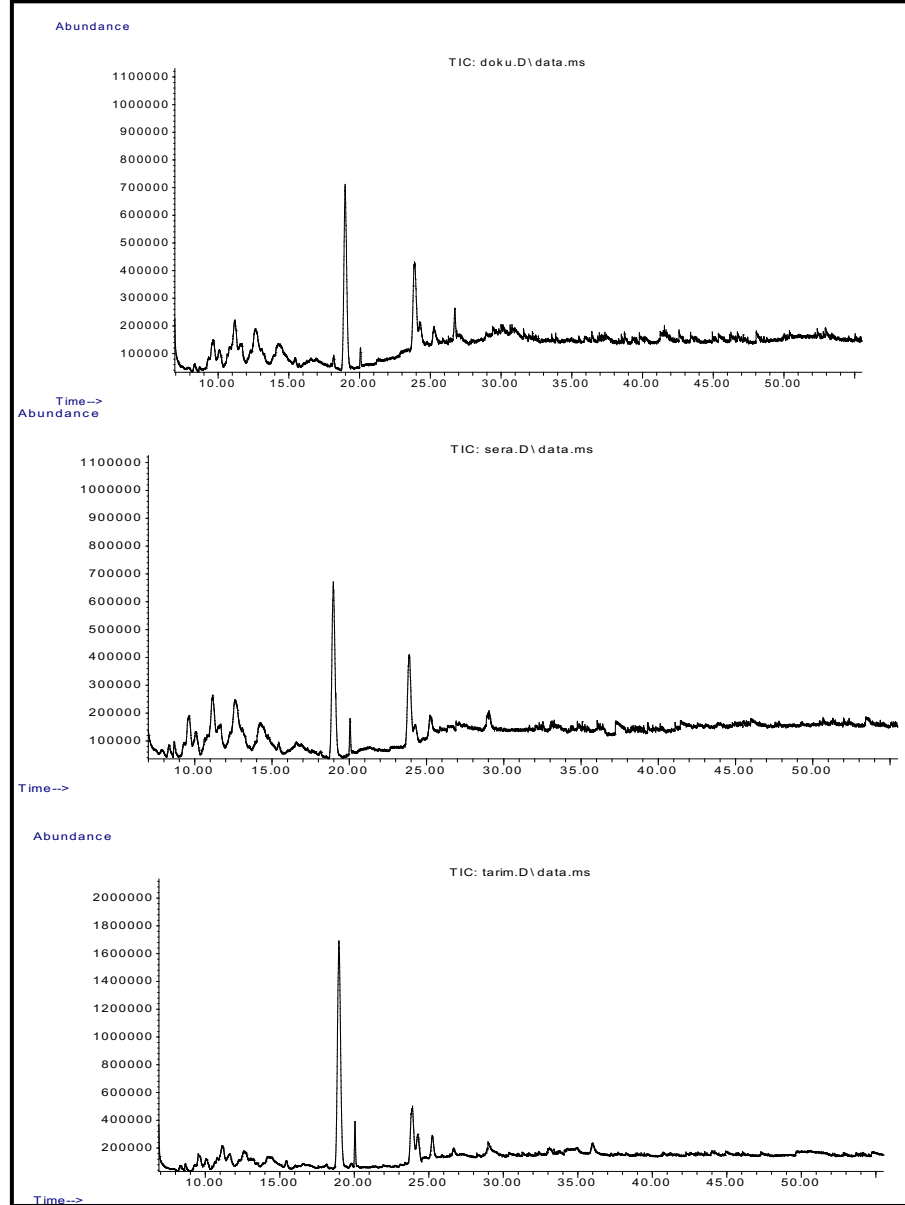
Tablo 4.9: ABTS/TEAK ile antioksidan kapasite tayin sonuçları.

Örnek	Ekstraksiyon Çözücüsü	ABTS/TEAK Antioksidan Kapasitesi TE ug/mg kök ekstraktı ± SS
Sera	Ultra saf su	29,54 ± 0,42
Sera	Etanol	59,35 ± 1,0
Dikey tarım	Ultra saf su	62,4 ± 1,54
Dikey tarım	Etanol	52,78 ± 0,7
Bitki Doku Kültürü	Etanol	28,78 ± 0,79
Bitki Doku Kültürü	Ultra saf su	24,44 ± 0,1

Elde edilen grafik ve denklem ile mg TE/1g ekstrakt ± SS cinsinden elde edilen değerler Tablo 4.9’da gösterilmiştir. Antioksidan kapasitesi en çok olan örnek ultra saf su ile çözülmüş dikey tarım örneğidir. Diğer örnekler sırasıyla etanol ile çözülmüş sera örneği ve etanol ile çözülmüş dikey tarım örneğidir.

4.10. GC-MS Sonuçları

GC-MS kromatogram sonuçları sırasıyla sera, dikey tarım ve bitki doku kültürü örnekleri için Şekil 4.13’ te verilmiştir. Kromatogram sonucuna göre pik alanın bakıldığında en büyük alana sahip etken maddenin tüm yetiştirme koşulları için C 16:0 palmitik asit olduğu görülmektedir.



Şekil 4.13: Sırasıyla sera, dikey tarım ve bitki doku kültürü örnekleri için GC-MS kromatogram sonuçları.

Tablo 4.10: GC-MS analizi sonucunda tespit edilen etken maddeler.

	Etken Madde	DOKU %	SERA %	DIKEY %	Ref.
1	Dodecane	0.62	3.72	-	122014
2	Octadecane	2.92	-	0.42	745952
3	Eicosane	0.47	0.11	0.29	474187
4	n-Hexadecane	6.44	3.78	-	409
5	n-Eicosane	0.09	0.23	0.69	411
6	Docosane	4.65	-	0.12	564053
7	Tetradecane	2.14	1.56	3.45	198847
8	n-Tetracosane	0.31	1.31	1.08	412
9	Hexacosane	0.17	-	-	888877
10	Nonadecane	0.1	-	-	428112
11	Dimethyl 4-(tert-Butyl)phthalate	1.23	-	-	365534
12	C 16:0	40.31	34.92	50.69	12
13	Phenol, 2,4-Bis(1,1-Dimethylethyl)	1.37	-	-	223132
14	C 18:0	21.68	20.12	13.42	16
15	Octadecanoic acid, methyl ester	0.34	-	-	526296
16	10-Octadecenoic, methyl ester	1.35	-	-	519646
17	C 18:1(cis - 9) (omega 9)	3.07	-	-	18
18	C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6)	1.08	-	-	20
19	Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl ester	3.57	-	-	506256
20	Hexacosanoic acid, methyl ester	0.49	-	-	800985
21	Methyl 2-Isopropenyl-3-(Trimethylsilyl)-2-Cyclopropene-1-Carboxylate	0.14	-	-	234457
22	9-Octadecene, 1-(2,3-dimethoxypropoxy)	0.13	-	-	726035
23	(18S,19S)-18,19-Dihydroxy-1,4,7,10,13,16-hexaoxocycloencosane	0.7	-	0.02	605498
24	3-Methyl-4-fluoro-5,6-dihydro-4H-(1,2)-oxazine	0.21	-	0.14	25080
25	1,4,7,10,13,16-Hexaoxacycloicosane-18,19-diol	0.29	-	0.07	605499
26	n-Decane	-	0.2	-	405
27	n-Tetradecane	-	4.19	-	408
28	Decane, 3,8-dimethyl-	-	0.18	-	122085
29	Docosyl nonyl ether	-	0.55	-	855184
30	n-Undecane	-	0.7	-	406
31	Tetracosane	-	5.85	-	646589
32	Pentadecane	-	3.59	0.42	400
33	n-Octadecane	-	1.09	3.92	410
34	Heptadecane	-	4.43	-	335192
35	Eicosane, 1-iodo-	-	0.56	-	474191
36	Tricosane	-	0.09	-	606494

Tablo 4.10: Devam.

37	Docosane, 1-iodo-	-	0.2	-	837082
38	Tetracosane, 1-iodo	-	0.03	-	86601
39	2,4-Di-tert-butylphenol	-	2.34	3.35	223134
40	C 18:2 (trans,trans - 9,12)	-	1.97	3.4	19
41	C 20:0	-	1.52	-	23
42	Eicosanoic acid, methyl ester	-	0.71	0.87	612507
43	Methylvalerate	-	0.31	-	120
44	Tricyclo[6.3.0.0(1,5)]undecan-10-ol, 4-[(2-methoxyethoxy)methoxy]-5-methyl-	-	0.2	-	480347
45	Propanedioic acid, [4-(2-furanyl)-1,3-butadienyl]methyl-, dimethyl ester, (E,Z)-	-	0.45	0.27	411688
46	6-Aza-5,7,12,14-tetrathiapentacene	-	-	0.78	688573
47	n-Dodecane	-	-	0.53	407
48	Dodecyl nonyl ether	-	-	0.88	570579
49	Tritetracontane	-	-	0.43	929297
50	Undecane	-	-	0.05	88927
51	C 14:0	-	-	0.44	8
52	Myristic acid, methyl ester	-	-	0.4	341365
53	9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	-	-	0.4	427906
54	C 18:1 (trans - 9) (omega 9)	-	-	5.76	17
55	Tricyclo[20.8.0.0(7,16)]triacontane, 1(22),7(16)-diepoxy-	-	-	0.12	847018
56	Methyl 6-cis,9-cis,11-trans-octadecatrienoate	-	-	0.2	506532

5. TARTIŞMA

Vetiver bitkisinin kökünde 150'den fazla seskiterpenoid bulunduğundan ilaç ve kozmetik sektörü için oldukça değerli bir bitkidir. Daha çok tropik bölgelerde görülen bu bitki Türkiye'de henüz sınırlı alanlarda yetiştirilmekte ve değeri henüz bilinmemektedir. Vetiver tohumlarına olan ihtiyacın artmasıyla beraber kaliteli ve verimli vetiver bitkilerini yetiştirebilmek için yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca vetiver bitkisinin tümü çiçek veremez ve tohumun çimlenme hızı da oldukça düşüktür. Bu yüzden, bitki doku kültürü teknikleriyle *in vitro* çoğaltma vetiver bitkisinin daha verimli üretimine imkan verebilmektedir.

Widoretno et al. (2017) çalışmasında vetiver bitkisinin *in vitro* çoğaltımını başarılı bir şekilde gerçekleştirmiştir. Bitkinin sürgün kısmından alınan örneklerin *in vitro* ortamda büyütülmesi için öncelikle akan musluk suyu altında yıkanmıştır. Sonra 4 cm uzunluğunda kesilen örnekler %96 alkol ile 1 dakika, %50 ticari çamaşır suyu (%5.25 NaClO) ile 20 dakika boyunca steril edilmiştir. Daha sonra örnekler steril su ile 5 dakika boyunca iki kez durulanmıştır ve BA (1, 2, 3 mgL⁻¹) içeren MS ortamı üzerinde kültürlenmiştir. Esyanti et al. (2013) yaptıkları çalışmada ana bitkideki metabolitleri içeren ve yüksek miktarda vetiver yağı içeren en iyi kök kültürünü elde etmeye çalışmıştır. Çalışmada kök kültürünü başlatmak için bitki köklerinin uç ve gövde kısmına yakın kısımlarından yaklaşık 2 cm örnekler kesilmiştir ve tüm eksplantlar %70 etanol ile yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından steril distile su ile durulanmıştır, 10 dakika %0.8 NaClO ile çalkalandıktan sonra tekrar distile su ile durulanarak steril petri kaplarına aktarılmıştır. Örnekler 1.0 ppm naftalin asetik asit (NAA) ve 0.5 ppm indol asetik asit (IAA) içeren MS sıvı ortamına kültürlenmiştir. Bu çalışmada üretilen en zengin içeriğe sahip vetiver yağı, %19.02 ile gövde eksplantlarından elde edilen kök kültürlerinden olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışmasında 2 farklı bölgeden temin edilen vetiver fideleri doku kültürüne alınmıştır. Sterilizasyon prosedürünün optimizasyonu için denemeler yapılmıştır. Denemeler sırasında görülen kontaminasyon kaynağının dizileme sonucuna göre *Fusarium redolens* olduğu görülmektedir ve bu mikroorganizmanın vetiver bitkisinin köklerinde endofitik olarak yaşadığı düşünülmektedir. Endofitler (genellikle mantarlar ve bakteriler) konakçı bitkilerin sağlıklı dokularında hastalığa neden olmadan yaşayan mikroorganizmalardır. Endofitik mantarlar bitki metabolit üretimini indükleyebilmektedirler. Bu kontaminasyona karşı kullanılan ve örneklerin

tamamında etkili olan Bitki Koruma Karışımı (PPM) bitki doku kültüründe kullanılmak üzere geliştirilmiştir ve geniş spektrumlu bir biyosittir. PPM, bitki doku kültürü büyüme ortamındaki bakteri ve mantarları ve ayrıca kontamine dokuyu hedefler. PPM, esas olarak hava kaynaklı kontaminasyonu, su kaynaklı kontaminasyonu ve insan temasından kaynaklanan kontaminasyonu engellemek için geliştirilmiş olsa da aynı zamanda çoğu durumda endojen kontaminasyonu azaltmak için kullanıldığı bilinmektedir. Bu yüzden endofitik mantar olduğunu düşündüğümüz organizmaya karşı da etki göstermiştir. Bu çalışmada bitki doku kültürü uygulamaları kapsamında vetiverde saçak kök kültürü çalışması da gerçekleştirilmiştir. Isı şoku ile transformasyon ve standart transformasyon olmak üzere iki farklı prosedür denenmiştir. Saçak kök elde edilmemesinin sebebinin vetiverin antibakteriyel içeriğinden dolayı olabileceği düşünülmektedir.

GC-MS kromatogram sonuçlarına göre pik alanları analiz edildiğinde C 16:0 palmitik asit yüzdesinin dikey tarım örneğinde sera örneğine kıyasla yaklaşık 1.5 kat daha fazladır. Palmitik asit bitkilerde ve hayvanlarda bulunan doymuş yağ asitidir ve emülsiyonları stabilize eder. Derideki nemi hapsederek su kaybının azaltılmasına katkıda bulunur. Bu yüzden kuru cildin bakımı için kozmetikte emülsiyonlarda kullanıma uygundur. Yine analiz sonuçlarında görülen C 18:0 stearik asit içeriği en çok bitki doku kültürü örneğinde görülmektedir. Stearik asit doymuş bir yağ asididir ve esas olarak deterjan, sabun gibi kozmetik ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. İleriki çalışmalarda bu yağ asitinin üretiminin de doku kültürü aracılığıyla sağlanabileceği düşünülmektedir.

Total fenolik asit miktarı en çok etanol ile çözülmüş örneklerde görüldü. Bu örneklerdeki total fenolik asit içeriğinin en yüksek değeri 23,7 mg GAE/g bitki ile sera ekstrakt örneğidir. Ardından sırasıyla dikey tarım örneği ve bitki doku kültürü örneği gelmektedir. Seradan alınan kök örneklerinin dikey tarım örneklerine kıyasla koyu renkte olması da fenolik miktarın fazla olduğunun bir göstergesidir. Fenolik bileşikler bitkinin maruz kaldığı bakteri, virüs gibi mekanik streslere karşı savunma mekanizmasında rol alırlar ve bu yüzden ortama bağlı olarak miktarları değişmektedir. Fenolik miktarın serada daha fazla olmasının sebebi toprakta bulunan ve bitkide bazı fenoliklerin oluşumunu tetikleyen mikroorganizmaların topraksız üretimde ortadan kaldırılmasından dolayı olabileceği düşünülmektedir.

En çok flavonoid miktarı etanol ile çözülmüş örneklerden sırasıyla dikey tarım, sera ve doku kültürü örneklerinden elde edilmiştir. Quzounis et al., (2015)

çalışmasında *Lactuca sativa* bitkisinde mavi ışığın altında yetişen bitkilerde kontrol grubuna kıyasla daha fazla flavonoid olduğunu gözlemlemiştir. Dikey tarımda mavi ışığın flavonoid miktarını artırmış olabileceği düşünülmektedir. Total fenolik ve flavonoid miktarlarının etanol ile çözülen örneklerde daha yüksek olduğunu görüyoruz. Bunun nedeni bu bileşiklerin etanolde ve ultra saf suda daha iyi çözülebilmesidir. Yapılan çalışma ileride yapılacak ekstraksiyon analizi çalışmalarında çözücü olarak etanol kullanılabilmesi açısından yol gösterici niteliktedir.

Bitkilerde antioksidan kapasitesi farklı metotlarla tespit edilebilmesine rağmen standart bir metot bulunmamaktadır. Bir çalışmadan elde edilecek antioksidan aktivite sonuçları kullanılan metoda bağlı olarak değişebilmektedir. Bu yüzden farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri DPPH ve ABTS yöntemleriyle doğrulandı. DPPH radikal giderme aktivitesi bitkisel materyallerin antioksidan potansiyellerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılan bir metottur. DPPH antioksidan kapasitesi en çok etanol ile çözülen ekstraktlarda görüldü. Bu örnekler sırasıyla sera örneği, dikey tarım örneği bitki doku kültürü örneğidir. ABTS/TEAK ile antioksidan kapasitesine bakıldığında en çok olan örnek ultra saf su ile çözülmüş dikey tarım örneğidir. Diğer örnekler sırasıyla etanol ile çözülmüş sera örneği ve etanol ile çözülmüş dikey tarım örneğidir. Abeysinghe et al., (2014) çalışmasında tıbbi bir bitki olan *Acmella oleraceae* bitkisini hidroponik tarım, kallus kültürü ve tarla olmak üzere üç farklı koşulda yetiştirmiştir. Üç farklı koşulda yetiştirilen bitkilerin antioksidan kapasitelerine bakıldığında bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile paralel olduğu görülmektedir. En fazla antioksidan kapasitesi hidroponik tarımdaki örnekte ardından tarladaki örnekte görülmektedir. Stres etmenlerinin ve buna bağlı olarak oksidatif stresin vetiver biktisi için dikey tarımda ve serada daha fazla olmasının antioksidan üretimini de paralel olarak artmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Yapılacak ileriki çalışmalarda vetivere özgü karakteristik bileşiklerin kütüphanesine sahip cihazlarla miktar analizi yapılabilir. Bu değerli bileşenlerin ilaç sanayisinde kullanılmak üzere artırılmış üretimleri sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- Ackermann C., (1977), "Pflanzen aus Agrobacterium rhizogenes-tumoren an Nicotiana tabacum", Plant Science Letters, 8(1), 23-30.
- Bingöl B., (2015), "Dikey tarım", Düzce Üniversitesi Ormancılık Dergisi, 11(2), 92-99.
- Bingöl Ö. Ü. B., (2019), "Alternatif tarım yöntemleri; aeroponik, akuaponik, hidroponik", Harman Time Dergisi, 7(82), 34-42.
- Buzby K. M., Waterland N. L., Semmens K. J., Lin L. S., (2016), "Evaluating aquaponic crops in a freshwater flow-through fish culture system", Aquaculture, 460, 15-24.
- Cındık Y., Demirel Ö., "Türkiye'de Varolmaya Çalışan Vetiver Grass Bitkisine Genel Bakış", İnönü Üniversitesi Sanat ve Tasarım Dergisi, 2(6), 20-30.
- Danh L. T., Truong P., Mammucari R., Tran T., Foster, N., (2009), "Vetiver grass, Vetiveria zizanioides: a choice plant for phytoremediation of heavy metals and organic wastes", International Journal of Phytoremediation, 11(8), 664-691.
- David A., Wang F., Sun X., Li H., Lin J., Li P., Deng G., (2019), "Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of Vetiveria zizanioides (L.) nash essential oil extracted by carbon dioxide expanded ethanol", Molecules, 24(10), 1897.
- Efe D., (2019), "The evaluation of the antibacterial activity of Vetiveria zizanioides (L.) Nash grown in Giresun, Turkey", Alinteri Journal Agricultural Science, 34, 21-24.
- Esyanti R. R., Mardisadora O., (2013), "Vetiver oil production from root culture of Vetiveria zizanioides", International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering, 7(9), 863-866.
- Esyanti R. R., Natalia W., Zahya N., (2013), "In vitro plant regeneration of java vetiver (Vetiveria zizanioides)", International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering, 7(9), 867-869.
- Gerszberg A., Wiktorek-Smagur A., (2022), "Hairy root cultures as a multitask platform for green biotechnology", Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 1-17.
- Giannenas I., Sidiropoulou E., Bonos E., Christaki E., Florou-Paneri P., (2020), "The history of herbs, medicinal and aromatic plants, and their extracts: Past, current situation and future perspectives", In Feed additives, 1-18, Academic Press.

Ivani T., Widoretno W., (2019), “Effect of pb and cd elicitors on growth and content of vetiver oil adventitious root in vitro of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash)”, *The Journal of Experimental Life Science*, 9(3), 194-200.

Khan F. A., (2018), “A review on hydroponic greenhouse cultivation for sustainable agriculture”, *International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences*, 2(2), 59-66.

Kim H. J., Chen F., Wang X., Chung H. Y., Jin Z., (2005), “Evaluation of antioxidant activity of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) oil and identification of its antioxidant constituents”, *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 53(20), 7691-7695.

Lavania U. C., (2003), “Other uses and utilization of vetiver: vetiver oil”, In the Third International Vetiver Conference, Guangzhou, China, 475.

Mahajan M., Kuiry R., Pal P. K., (2020), “Understanding the consequence of environmental stress for accumulation of secondary metabolites in medicinal and aromatic plants”, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 18, 100255.

Mariyappillai A., Arumugam G., Raghavendran V. B., (2020), “The techniques of hydroponic system”, *Acta Scientific Agriculture*, 4(7), 79-84.

Mauro M. L., Costantino P., Bettini P. P., (2017), “The never ending story of rol genes: a century after”, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131, 201-212.

Medina-Bolivar F., Condori J., Rimando A. M., Hubstenberger J., Shelton K., O’Keefe S. F., Dolan M. C., (2007), “Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut”, *Phytochemistry*, 68(14), 1992-2003.

Niazian M., Sadat-Noori S. A., Tohidfar M., Galuszka P., Mortazavian S. M. M., (2019), “Agrobacterium-mediated genetic transformation of ajowan (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague): an important industrial medicinal plant”, *Industrial Crops and Products*, 132, 29-40.

Ono N. N., Tian L., (2011), “The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities”, *Plant Science*, 180(3), 439-446.

Ouyang J., Bae H., Jordi S., Dao Q. M., Dossenbach S., Dehn S., List B., (2021), “The smelling principle of vetiver oil, unveiled by chemical synthesis”, *Angewandte Chemie International Edition*, 60(11), 5666-5672.

Pandey R., Jain V., Singh K. P., (2009), “Hydroponics agriculture: its status, scope and limitations”, *Division of Plant Physiology*, 20, 1-5.

Rao R. R., Suseela M. R., (2000), “*Vetiveria zizanioides* (Linn.) Nash—a multipurpose eco-friendly grass of India”, *Journal of Medicinal Plants Studies*, 8, 18-22.

Roberts J. M., Bruce T. J., Monaghan J. M., Pope T. W., Leather S. R., Beacham A. M., (2020), "Vertical farming systems bring new considerations for pest and disease management", *Annals of Applied Biology*, 176(3), 226-232.

Rotkittikhun P., Kruatrachue M., Pokethitiyook P., Baker A. J. M., (2010), "Tolerance and accumulation of lead in *Vetiveria zizanioides* and its effect on oil production", *Journal of Environmental Biology*, 31(3), 329.

Saha A., Basak B. B., (2020), "Scope of value addition and utilization of residual biomass from medicinal and aromatic plants", *Industrial Crops and Products*, 145, 111979.

Sardare M. D., Admane S. V., (2013), "A review on plant without soil-hydroponics", *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 2(3), 299-304.

Singh M., Suyal D. C., Dinkar N., Joshi S., Srivastava N., Maurya V. K., Agrawal S., (2023), "Agrobacterium rhizogenes as molecular tool for the production of hairy roots in *Withania somnifera*", *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 11(2), 1-10.

Singh S., Melo J. S., Eapen S., D'souza S. F., (2008), "Potential of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) for phytoremediation of phenol", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(3), 671-676.

Srivastava J., Kayastha S., Jamil S., Srivastava V., (2008), "Environmental perspectives of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash", *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(4), 413-417.

Velazquez-Gonzalez R. S., Garcia-Garcia A. L., Ventura-Zapata E., Barceinas-Sanchez J. D. O., Sosa-Savedra J. C., (2022), "A review on hydroponics and the technologies associated for medium-and small-scale operations", *Agriculture*, 12(5), 646.

Verma, A. B., (2020), "*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash: A review of magic grass", *Journal of Medicinal Plants*, 8(1), 58-61.

Web 1, (2023), https://www.freepik.com/premium-photo/vetiver-grass-chrysopogon-zizanioides-nature-background_21967458.htm, (Erişim Tarihi: 06/01/2023).

Web 2, (2021), <https://fullsepp.com/tr/yayinlar/475/bitkiye-gen-aktaran-agrobacterium-nedir/1/a>, (Erişim Tarihi: 16/01/2023).

Web 3, (2023), https://personel.omu.edu.tr/docs/ders_dokumanlari/6371_71049_2394.pdf, (Erişim Tarihi: 10/01/2023).

Web 4, (2023), <https://toprakvesu.com/kb/dwc-derin-su-kulturu/>, (Erişim Tarihi: 02/01/2023).

Web 5, (2023), <https://toprakvesu.com/kb/ince-besin-tabakasi-sistemi-nft/>, (Erişim Tarihi: 02/01/2023).

Web 6, (2023), <https://www.resifsera.com/bilgi-bankasi/hidroponik-tarim-topraksiz-tarim-bitki-yetistirme-cesitleri>, (Erişim Tarihi: 02/01/2023).

Web 7, (2023), <https://www.trees.com/gardening-and-landscaping/aquaponic-gardening>, (Erişim Tarihi: 02/01/2023).

Zahoor S., Shahid S., Fatima U., (2018), “Review of pharmacological activities of *Vetiveria zizanoide* (Linn) Nash”, Journal of Basic & Applied Sciences, 14, 235-238.

ÖZGEÇMİŞ

Erva BACACI, 2015 yılında Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2020 yılında tamamladıktan sonra 2020 yılında Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Yüksek Lisans eğitimine devam etmektedir.