

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN
CALENDULA OFFICINALIS L. VE CALENDULA ARVENSIS L.
TÜRLERİNİN HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNDE
BELİRLİ SEKONDER METABOLİTLER ÜZERİNE ETKİLERİ

Nergis KAYA

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **21/06/2016**

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Cüneyt AKI

ÇANAKKALE

Nergis KAYA tarafından Prof. Dr. Cüneyt AKI yönetiminde hazırlanan ve 21/06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin *Calendula officinalis* L. ve *Calendula arvensis* L. Türlerinin Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Belirli Sekonder Metabolitler Üzerine Etkileri**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Cüneyt AKI

.....

Başkan

Doç. Dr. Okan ACAR

.....

Üye

Yrd. Doç. Dr. Canan ÖZTOKAT KUZUCU

.....

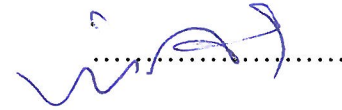
Üye

Prof. Dr. Necip TOSUN

.....

Üye

Doç. Dr. Esin AKÇAM OLUK

.....

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu tez çalışması ÇOMÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FDK-2015-401 numaralı projeden desteklenmiştir.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Nergis KAYA

TEŞEKKÜR

Doktora tezimin gerçekleştirilmesinde, tez çalışmam öncesinde akademik bilgi birikimiyle beni olumlu yönde yönlendiren ve tez çalışmam boyunca her zaman bana yardım eden ve destek olan değerli danışman hocam, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Cüneyt AKI'ya teşekkür ederim.

Doktora tez jüri üyelerim Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Okan ACAR'a; Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Canan ÖZTOKAT KUZUCU'ya; Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Necip TOSUN'a; Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Esin AKÇAM OLUK'a teşekkür ederim.

Hücre süspansiyon kültürlerinin kurulumu aşamasında bilgilerinden faydalandığım Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Aynur GÜREL'e ve Araş. Gör. Begüm AKYOL'a; Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Nazan DAĞÜSTÜ'ye teşekkür ederim. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Elemanı Araş. Gör. Dr. Nurşen ÇÖRDÜK'e; arkadaşlarım Araş. Gör. Nihan AKINCI'ya ve Araş Gör. Rabia Özlem KIPRAK DEMİRASLAN'a teşekkür ederim. Doktora tezimin HPLC analizlerinin yapılmasında yardımcı olan ÇOMÜ, Kimya Bölümü Öğretim Üyesi, Sayın Prof. Dr. Nurettin ŞAHİNER'e ve öğrencisi Selin SAĞBAŞ'a teşekkür ederim.

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)'ne doktora tez çalışmamı desteklediği için teşekkür ederim.

Hayatımın her evresinde bana maddi ve manevi destek olan, güvenen, doktora tez çalışmam süresince her zaman yanımda olan, iyi ki varsınız dediğim değerli ailem; canım annem Kıymet KAYA'ya, canım babam Müjdat KAYA'ya, canım kardeşim Tayfun KAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nergis KAYA
Çanakkale, Haziran 2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

NAA	Naftalen Asetik Asit
BAP	Benzil Amino Purin
NaOCl	Sodyum Hidroksit
2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik Asit
IAA	Indol Asetik Asit
4-CPA	4-Klorofenoksiasetik Asit
H ₂ SO ₄	Sülfirik Asit
MS	Murashige&Skoog
GA ₃	Giberellik Asit
C ₃ H ₆ O	Aseton
C ₂ H ₆ O	Etanol
KNO ₃	Potasyum Nitrat
C ₆ H ₁₆	n-Hegzan
CHCl ₃	Kloroform
CH ₃ CN	Asetonitril
CH ₃ COOH	Asetik Asit
CH ₃ OH	Metanol
NaOCl	Sodyum Hidroksit
HCl	Hidroklorik Asit
µg	Mikro gram
S _x	Standard Hata
L	Litre
Mg	Miligram
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPTLC	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
RP-HPLC	Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
PDA	Fotodiyot Array
LC-MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi
X	İnteraksiyon

ÖZET

BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN *CALENDULA OFFICINALIS* L. VE *CALENDULA ARVENSIS* L. TÜRLERİNİN HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNDE BELİRLİ SEKONDER METABOLİTLER ÜZERİNE ETKİLERİ

Nergis KAYA

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Cüneyt AKI

21/06/2016, 122

Araştırmamızın ilk aşamasında tıbbi ve ekonomik öneme sahip olan *Calendula officinalis* ve *Calendula arvensis* fideleri embriyodan itibaren *in vivo* ve *in vitro* olarak yetiştirilmiştir. İkinci aşamada, *in vitro* olarak yetiştirilen iki *Calendula* fidesinin yaprak eksplantları ile başlatılan ve MS0, MS1, MS4, MS6 besin ortamlarında yapılan biyokütle ölçümleri ile kallus kültürü optimize edilmiştir. Üçüncü aşamada, MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamlarının bulunduğu kallus kültürlerinden hücre süspansiyon kültürlerine geçiş yapılarak hücre sayımı, taze ve kuru ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Dördüncü aşamada, *in vivo* ve *in vitro* olarak yetiştirilen bitkilerin yapraklarında; kallus kültüründe ve hücre süspansiyon kültüründe biriken sekonder metabolitlerin (kuersetin, kaemferol, kafeik asit, beta karoten) miktarları araştırılmıştır. En fazla kafeik asit ve beta karoten miktarları, her iki *Calendula* türünün MS1 besin ortamındaki hücre süspansiyon kültürlerinin 120. gününde saptanmıştır. Kafeik asit miktarının *C. officinalis* ve *C. arvensis* türünde sırası ile 268,585 µg/g ve 235,865 µg/g; beta karoten miktarının ise *C. officinalis* ve *C. arvensis* türünde sırası ile 523,685 µg/g ve 385,115 µg/g olduğu ortaya konmuştur. Tamamlanan araştırmada *C. officinalis* ve *C. arvensis* türünün hücre süspansiyon kültürlerinde biriken kafeik asit ve beta karoten miktarları ilk defa belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *C. officinalis*, *C. arvensis*, oksin, sitokin, kallus, süspansiyon kültür, kafeik asit, beta karoten, HPLC.

ABSTRACT

EFFECTS OF SOME PLANT GROWTH REGULATORS ON CERTAIN SECONDARY METABOLITES IN CELL SUSPENSION CULTURES OF *CALENDULA OFFICINALIS* L. AND *CALENDULA ARVENSIS* L. SPECIES

Nergis KAYA

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Doctoral Dissertation in Natural Science

Advisor: Prof. Dr. Cüneyt AKI

21/06/2016, 122

In the first stage of our research, *C. officinalis* and *C. arvensis* plants having medicinal and economically important were grown from embryo in the *in vivo* and *in vitro* conditions. In the second stage, callus culture was started with leaf explants of *C. officinalis* and *C. arvensis* plants and optimized with measuring of biomass in the MS0, MS1, MS3, MS4, MS6 nutrient medium. In the third stage, the callus culture in the MS1, MS3, MS4, MS6 nutrient medium was passed into the cell suspension culture and done the counting of cell, the measurement of fresh and dry weight in the cell suspension culture. In the fourth stage, secondary metabolites (quercetin, kaempferol, caffeic acid, beta carotene) accumulated in the leaves of plants grown *in vivo* and *in vitro* conditions, in the callus culture and the cell suspension culture were researched. The maximum amount of caffeic acid in the 120th day of MS1 nutrient medium of the cell suspension cultures of *C. officinalis* and *C. arvensis* was found 268,585 µg/g and 235,865 µg/g, respectively. The maximum amount of beta carotene in the 120th day of MS1 nutrient medium of the cell suspension cultures of *C. officinalis* and *C. arvensis* was found 523,685 µg/g and 385,115 µg/g, respectively. The results of this research is important because of the detection of amounts of caffeic acid and beta carotene in the cell suspension cultures supplemented with plant growth regulators of *C. officinalis* and *C. arvensis*.

Keywords: *C. officinalis*, *C. arvensis*, auxin, cytokinin, callus, suspension culture, caffeic acid, beta-carotene, HPLC.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1. Sekonder Metabolitler	2
1.2. <i>In vitro</i> Kültür Teknikleri.....	6
1.2.1. Kallus Kültürü	7
1.2.2. Bitki Hücre Süspansiyon Kültürü.....	9
1.3. <i>Calendula officinalis</i> L. ve <i>C. arvensis</i> L. Türleri	14
BÖLÜM 2	18
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	18
2.1. <i>C. officinalis</i> ve <i>C. arvensis</i> Türünün Tıbbi Önemi.....	18
2.1.1. Antioksidan Aktivite	18
2.1.2. Antiülser Aktivite	19
2.1.3. Antimikrobiyal ve Antiviral Aktivite	19
2.1.4. Hepatoprotektif Aktivite.....	20
2.1.5. Yara İyileştirici Aktivite	21
2.1.6. Antienflamatuvar Aktivite.....	21
2.1.7. Sitotoksik ve İmmunomodulator Aktivite	22
2.1.8. Antimutajenik Aktivite.....	23
2.1.9. Ağrı kesici ve Ateş Düşürücü Aktivite.....	23
2.1.10. Diğer Etkiler	24
2.2. <i>C. officinalis</i> ve <i>C. arvensis</i> Türlerinde Sekonder Metabolitlerin Yapısı ve Biyolojik Aktiviteleri	24
2.2.1. Kuersetin.....	24
2.2.2. Kaemferol	27
2.2.3. Kafeik Asit.....	29
2.2.4. Beta karoten.....	30

2.3. Asteracea Familyasındaki Bitkiler ile İlgili Bitki Doku Kültürü Çalışmaları.....	32
2.4. Asteraceae Familyasındaki Bitkiler İle İlgili Sekonder Metabolit Çalışmaları	36
BÖLÜM 3	43
MATERYAL VE YÖNTEM.....	43
3.1. Bitkisel Materyal	43
3.2. Yöntem.....	43
3.2.1. Tohum Yüzeysel Sterilizasyonu.....	43
3.2.2. Bitkisel Materyalin <i>In vivo</i> Yetiştirilmesi	43
3.2.2.1. Tohum Yüzeysel Sterilizasyonu ve <i>In vivo</i> Embriyo Aktarımı	43
3.2.3. Bitkisel Materyalin <i>In vitro</i> Yetiştirilmesi	44
3.2.3.1. Tohum Yüzeysel Sterilizasyonu ve <i>In vitro</i> Embriyo Aktarımı	44
3.2.4. Sterilizasyon	45
3.2.5. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin ve Besin Ortamlarının Hazırlanması.....	45
3.2.6. Kallus Kültürü	45
3.2.6.1. Eksplanttan Kallus Eldesi	46
3.2.6.2. Kallus Alt Kültürleri	46
3.2.6.3. Kallus Biyokütle Değişimi İle İlgili İstatistiksel Analizler	47
3.2.7. Bitki Hücre Süspansiyon Kültürleri	47
3.2.7.1. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Kurulması.....	47
3.2.7.2. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Büyüme Parametreleri	47
3.2.7.3.1. Hücre Canlılık Testi.....	48
3.2.7.3.2. Hücre Büyümesinin Belirlenmesi.....	48
3.2.7.3. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Devamlılığı	49
3.2.8. Sekonder Metabolit Miktarının Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi	49
3.2.8.1. Sekonder Metabolit Standardlarının Hazırlanışı.....	50
3.2.8.2. Yapraktan, Kallus Kültüründen ve Hücre Süspansiyon Kültüründen Sekonder Metabolitlerin Ekstraksiyonu.....	51
3.2.8.3. HPLC Koşulları	51
BÖLÜM 4	54
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	53

4.1. Tohum Yüzeysel Sterilizasyonu	53
4.2. Bitkisel Materyalin <i>In vivo</i> Yetiştirilmesi ile İlgili Bulgular	53
4.3. Bitkisel Materyalin <i>In vitro</i> Yetiştirilmesi ile İlgili Bulgular	54
4.4. Kallus Kültürü.....	57
4.4.1. Eksplanttan Kallus Eldesi ile İlgili Bulgular	57
4.4.2. Kallus Alt Kültürleri ile İlgili Bulgular	59
4.4.3. Kallus Biyokütle Değişimi ile İlgili İstatistiksel Analizlere Dair Bulgular	59
4.5. Bitki Hücre Süspansiyon Kültürleri ile İlgili Bulgular	65
4.5.1. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Kurulması	65
4.5.2. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Büyüme Parametreleri ile İlgili Bulgular	65
4.5.2.1. Hücre Canlılık Testi ile İlgili Bulgular	66
4.5.2.2. Hücre Büyümesinin Belirlenmesi ile İlgili Bulgular	70
4.6. Sekonder Metabolit Miktarının Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizine Dair Bulgular	74
4.6.1. Sekonder Metabolit Standard Solüsyonlarının Hazırlanmasına Dair Bulgular..	74
4.6.2. Yapraktan, Kallus Kültüründen ve Hücre Süspansiyon Kültüründen Sekonder Metabolit Miktarlarına Dair İlgili Bulgular.....	77
BÖLÜM 5	87
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	87
KAYNAKLAR	91
EKLERİ	I
EK 1. Taze Ağırlık, Kuru Ağırlık ve Sekonder Metabolit Miktarını Hesaplamada Kullanılan Formüller	II
ÖZGEÇMİŞ	III

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Bitki hücrelerinden sekonder metabolit üretimi	13
Şekil 2.1. Kuersetin.....	24
Şekil 2.2. Kaemferol	27
Şekil 2.3. Kafeik asit.....	29
Şekil 2.4. Beta karoten	30
Şekil 3.1. <i>C. officinalis</i> ve <i>C. arvensis</i> tohumlarının torf, torf ve perlit, torf ve kum bitki yetiştirme ortamlarını içeren viyollere <i>in vivo</i> embriyo aktarımı	44
Şekil 3.2. <i>C. officinalis</i> ve <i>C. arvensis</i> tohumları (solda) ve tohum kabuğu çıkarılan embriyoları (sağda)	44
Şekil 3.3. Her 5 günde bir Thoma lamı ile mikroskopta yapılan hücre sayımları	48
Şekil 3.4. Filtrasyon sistemi ve 100 µm por çapına sahip elek.....	48
Şekil 4.1. 5 günlük <i>C. officinalis</i> (a); <i>C. arvensis</i> (b) fideleri ve sakıslara aktarım öncesinde viyoldeki 67 günlük fideler (c)	53
Şekil 4.2. Saksılardaki Torf (2:1) bitki yetiştirme ortamında aktarılan embriyolardan gelişen beş aylık <i>C. officinalis</i> (a) ve <i>C. arvensis</i> (b) fideleri.....	54
Şekil 4.3. <i>C. officinalis</i> (solda) ve <i>C. arvensis</i> (sağda) fideleri 9. ayında.....	54
Şekil 4.4. MS0 besin ortamında gelişen protoklorofil aşamasındaki <i>C. officinalis</i> (solda) ve <i>C. arvensis</i> (sağda) fidelerinin 0. günü	55
Şekil 4.5. MS0 besin ortamında gelişen protoklorofil aşamasındaki <i>C. officinalis</i> (solda) ve <i>C. arvensis</i> (sağda) fidelerinin 0. günü	55
Şekil 4.6. <i>In vitro</i> aktarımı yapılan embriyolardan gelişen on günlük (solda), yirmi günlük (sağda) <i>C. officinalis</i> fideleri	55
Şekil 4.7. <i>In vitro</i> aktarımı yapılan embriyolardan gelişen on günlük (solda), yirmi günlük (sağda) <i>C. arvensis</i> fideleri.....	56
Şekil 4.8. Aktif karbon eklenen MS0 besin ortamında 20 günlük <i>C. officinalis</i> fideleri	56
Şekil 4.9. Aktif karbon eklenen MS0 besin ortamında 20 günlük <i>C. arvensis</i> fideleri	56
Şekil 4.10. <i>In vitro</i> aktarımı yapılan embriyolardan gelişen 40 günlük <i>C. officinalis</i> ve <i>C. arvensis</i> fideleri.....	57
Şekil 4.11. <i>C. officinalis</i> ve <i>C. arvensis</i> türünün yaprak eksplantının yerleştirildiği gün ...	57
Şekil 4.12. MS1 (a), MS3 (b), MS4 (c), MS6 (d) besin ortamında yaprak eksplantları.....	58
Şekil 4.13. MS1 besin ortamına yaprak eksplantı yerleştirilmesinden 30 gün sonra kallus stereo mikroskop fotoğrafları.....	58
Şekil 4.14. MS3 besin ortamına yaprak eksplantı yerleştirilmesinden 30 gün sonra kallus stereo mikroskop fotoğrafları.....	58
Şekil 4.15. MS4 besin ortamına yaprak eksplantı yerleştirilmesinden 30 gün sonra kallus stereo mikroskop fotoğrafları.....	58
Şekil 4.16. MS6 besin ortamına yaprak eksplantı yerleştirilmesinden 30 gün sonra kallus stereo mikroskop fotoğrafları.....	58
Şekil 4.17. MS1 besin ortamında 1. kallus alt kültürü (a), 2. kallus alt kültürü (b), 3. kallus alt kültürü (c), 4. kallus alt kültürü (d) sonunda gelişen kalluslar	59
Şekil 4.18. Hücre süspansiyonları 4. kültür sonunda (120. gün). a) MS1, b)MS3, c) MS4, d) MS6 besin ortamları	65
Şekil 4.19. Hücre süspansiyonları 0. kültürün 10. gününde stereo mikroskop görüntüleri (X40 objektif).....	66
Şekil 4.20. Hücre süspansiyonları 0. kültürün 20. gününde stereo mikroskop görüntüleri (X10 objektif).....	66

Şekil 4.21. Hücre süspansiyonları 0. kültürün 30. gününde stereo mikroskop görüntüleri (X10 objektif).....	66
Şekil 4.22. <i>C. officinalis</i> hücre süspansiyon kültürü hücre canlılığı (%).....	69
Şekil 4.23. <i>C. arvensis</i> hücre süspansiyon kültürü hücre canlılığı (%)	69
Şekil 4.24. <i>C. officinalis</i> hücre süspansiyon kültürü taze ağırlık (g/l).....	72
Şekil 4.25. <i>C. officinalis</i> hücre süspansiyon kültürü kuru ağırlık (g/l).....	72
Şekil 4.26. <i>C. arvensis</i> hücre süspansiyon kültürü taze ağırlık (g/l)	73
Şekil 4.27. <i>C. arvensis</i> hücre süspansiyon kültürü kuru ağırlık (g/l).....	73
Şekil 4.28. Kuersetin (a), kaemferol (b), kafeik asit (c), beta karoten (d) standartlarına ait kromatogramlar	75
Şekil 4.29. Kafeik asit (1), Kuersetin (2) ve kaemferol (3) standartlarının 330 nm'deki kromatogramı	75
Şekil 4.30. Kuersetin standardı	76
Şekil 4.31. Kaemferol standardı	76
Şekil 4.32. Kafeik asit standardı	76
Şekil 4.33. Beta karoten standardı	77
Şekil 4.34. <i>C. officinalis</i> MS1 besin ortamı hücre süspansiyonları 4. kültür sonunda kafeik asit piki kromatogramı	78
Şekil 4.35. <i>C. arvensis</i> MS1 besin ortamı hücre süspansiyonları 4. kültür sonunda kafeik asit piki kromatogramı	78
Şekil 4.36. <i>C. officinalis</i> MS1 besin ortamı hücre süspansiyonları 4. kültür sonunda beta karoten piki kromatogramı.....	79
Şekil 4.37. <i>C. arvensis</i> MS1 besin ortamı hücre süspansiyonları 4. kültür sonunda beta karoten piki kromatogramı.....	79
Şekil 4.38. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> olarak yetiştirilen <i>C. officinalis</i> ve <i>C. arvensis</i> yapraklarında saptanan kafeik asit miktarları ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)	83
Şekil 4.39. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> olarak yetiştirilen <i>C. officinalis</i> ve <i>C. arvensis</i> yapraklarında saptanan beta karoten miktarları ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)	83
Şekil 4.40. <i>C. officinalis</i> ve <i>C. arvensis</i> kallus kültüründe ve hücre süspansiyon kültüründe saptanan kafeik asit miktarları ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)	84
Şekil 4.41. <i>C. officinalis</i> ve <i>C. arvensis</i> kallus kültüründe ve hücre süspansiyon kültüründe saptanan beta karoten miktarları ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1 . <i>C. officinalis</i> ve <i>C. arvensis</i> tohumlarına yapılan ön uygulamalar.....	44
Çizelge 3.2. Yaprak eksplant yerleştirilmesinin ve kallus biyokütle alt kültürlerinin yapıldığı MS besin ortamları (MS0-MS12 arası)	46
Çizelge 4.1. <i>C. officinalis</i> ve <i>C. arvensis</i> tohumlarına yapılan ön uygulamalar ve çimlenme yüzdeleri (%).....	54
Çizelge 4.2. Biyokütle göre bitki türü, alt kültür ve uygulamalara göre tanıtıcı istatistikler ve Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	61
Çizelge 4.3. Alt Kültürlere Göre Tanıtıcı İstatistikler	62
Çizelge 4.4. Bitki Türüne Göre Tanıtıcı İstatistikler	62
Çizelge 4.5. Genel Tanıtıcı İstatistikler	62
Çizelge 4.6. <i>C. officinalis</i> ve <i>C. arvensis</i> hücre süspansiyon kültürleri toplam hücre sayısı (n/ml) ve hücre canlılığı (%).....	68
Çizelge 4.8. Kuersetin, kaemferol, kafeik asit, beta karoten standartlarının HPLC sonuçları	77
Çizelge 4.9. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> olarak yetiştirilen <i>C. officinalis</i> ve <i>C. arvensis</i> türlerinde kafeik asit ve beta karoten miktarı ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)	81
Çizelge 4.10. <i>C. officinalis</i> ve <i>C. arvensis</i> kallus kültüründe ve hücre süspansiyon kültürlerinde kafeik asit ve beta karoten miktarı ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)	82

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Çağımızda dünyadaki insanların ciddiyetini anladığı ve önemli çalışmaların sürdürüldüğü etnobotanik, yüzyıllardan beri insanlar ve bitkiler arasında süregelen bağ sonucunda doğarak bitkilerin akademik dünyadaki değerlendirilmelerine dikkate değer katkısı olmuştur. Bitkiler, insanların ve bütün diğer canlıların beslenmesinde gerekli olan primer bileşikler (karbonhidratlar, lipidler, proteinler, vitaminler, mineraller) sağladıkları için çok önemlidir. Bunun yanı sıra insanlar bitkileri, sadece yiyecek olarak değil, aynı zamanda uyarıcı içecek, baharat, ilaç, şifalı bitki özü, zehir (sekonder bileşikler) olarak da kullanmaktadır. Sekonder bileşiklere alkaloidler, uçucu yağlar, reçineler, tanenler, glikozitler, saponinler vb. örnek verilebilir. Bunlar vücudun bağışıklık sistemini artırır, organların fonksiyonlarına yardımcı olur ve iyileşmeyi hızlandırarak organizmadaki bazı dokuların ve organların fonksiyonlarına pozitif olarak etkilemektedir. Bitkilerin sentezlediği bu doğal ürünler doğrudan ya da dolaylı olarak endüstrinin temel ürünlerini oluşturmaktadır. Sekonder metabolitlerin hem ekonomik öneme sahip olduğu hem de bitkilerin hayatında ekolojik ve fizyolojik görevleri bulunmaktadır. Örneğin bitkilerin karşılaşılabileceği olumsuz ortam şartlarına adaptasyonunu sağlamanın yanı sıra, bitkileri mikroorganizmaların ve hayvanların hücumuna karşı korumaktadır. Böylece sekonder metabolitler bitkilerin özel bir habitat için diğer bitki türleriyle yarışabilmesine olanak tanımaktadır. Sekonder metabolizma stres koşullarında ortaya çıkması nedeniyle bitkiler için negatif etkisi varmış gibi görünse de, bitkinin karşılaştığı stres etmenleri sekonder metabolit üretimini uyardığından dolayı bilim adamları tarafından olumlu etkisinin olduğu anlaşılmaktadır.

Tıbbi bitkiler; hastalıkların önlenmesi, hastalıkları iyileştirmek ve sağlıklı yaşam amacı ile ilaç olarak kullanılan bitkilere verilen isimdir. Tıbbi bitkilerin tedavi amacı ile kullanımları dışında; diyet ile alınarak, parfümeride, vücut bakımında, tütsü hazırlanmasında ya da dini merasimlerde kullanıldığı bilinmektedir (Anonim, 2005). Tıbbi bitkiler genellikle etken maddelerine göre gruplandırılır. Bitkisel ilaç: iyileştirici nitelikte ve insan sağlığına faydası olan bir bitkinin ya da birden çok bitkinin sentezlediği bileşiklerin ham ya da işlenmesiyle meydana getirilen ürünlerdir ya da maddelerdir. Bitkisel ilaçların; tıbbi yararlı ot ürünleri, işlenmemiş ve işlenmiş bitkisel materyal olarak 3 grubu vardır (Van Overwalle, 2007).

İnsanlık tarihine bakıldığında, çoğu hastalığın (diyabet, hepatit B, astım vs.) tedavisinde bitkiler kullanılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünyadaki insanların yaklaşık 4 milyarının (toplam nüfusun 80%'i) hastalıklarını öncelikle bitkisel droglarla iyileştirmek için uğraşmıştır. Bunun yanı sıra, gelişmiş ülkelerde reçete edilen ilaçların 25% kadarının bitkisel kökenli etken maddelerden (vinblastin vs.) meydana geldiği bilinmektedir (Farnsworth ve ark., 1985). Özellikle 2000'li yıllarda, her geçen gün yeni kullanım alanları bulunan tıbbi bitkiler sayesinde doğal ürünlere olan talep artmıştır. Tıbbi bitkilerin ekonomik değeri, 2000'li yılların ilk 10 yılındaki piyasa değeri yaklaşık 60 milyar dolar olarak belirlenmiştir (Kumar, 2009).

1.1. Sekonder Metabolitler

Bitkilerin savunma mekanizmaları başlıca iki grup altında incelenmektedir. Bunlardan ilki bitkinin herhangi bir stres durumuna maruz kalmadan sahip olduğu korunma şeklindeki savunma durumu (Hutcheson, 1998), diğeri ise bitkinin strese maruz kaldıktan sonraki savunma durumudur. Bitkilerin stres faktörlerine karşı aşırı hassasiyet sürecine girdiklerinde, bir takım içsel sinyaller ilettikleri bilinmektedir. Bu sinyaller; salisilik asit, (Malamy ve Klessig, 1992), etilen (Ohtsubo ve ark., 1999) ve jasmonatlar (Farmer ve Ryan, 1992; Gundlach ve ark., 1992; Hiraga ve ark., 2000) olarak bilinmektedir. Bu sinyal maddelerinin her birisi, savunma mekanizmalarının başlatılmasında rol oynamaktadır. Bu nedenle sekonder bileşikler bazı yazarlara göre iki tip olarak bulunmaktadır. İlk tip sekonder metabolitler, fitoaleksinlerdir. Bunlar stress metabolitleridir ve streslendirilmemiş ortamda meydana gelmemektedir (Meijer, 1989). Bir fitoaleksin olan ve bitkinin aktif savunma mekanizmasını oluşturan jasmonik asit ve onun metil esteri metil jasmonat (Sökmen ve Gürel, 2001; Theis ve Lerdau, 2003) tüm yüksek yapılı bitkilerde bulunmaktadır. Bitki metabolizmasında bu bileşiklerin önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur (Creelman ve Mullet, 1997). Bunlara ek olarak berberin, rozmarinik asit, şikonin ve antrokinonlar fitoaleksinlere örnek olarak sayılabilmektedir (Meijer, 1989). Bu maddelerin üretiminin meydana getirilebilecek stresle, iz miktarlardan bir litre kültürde farklı gramlara kadar miktarlarının fazlalaşabileceği bildirilmiştir (Meijer, 1989). Düşük moleküler ağırlıklı olan fitoaleksinlerin, bitkilerin strese maruz kalmalarının ardından birkaç saat sonra sentezlendikleri ve birkaç gün sonra da maksimum seviyeye ulaştıkları belirtilmiştir (Purkayashta, 1995). Fitoaleksinlerin tersine, çok düşük miktarlarda bile olsa genellikle streslendirilmemiş ortamlarda da bulunan sekonder metabolitlerin ise morfolojik farklılaşmaya bağlı olarak oluştuğu bilinmektedir. Ayrıca

fitoaleksinlerdeki kadar olmasa da bu sekonder metabolitlerin (ajmalisin, kinin, kodein, morfin) miktarı da stresle arttırılabilmektedir (Luckner ve Nover, 1977).

Sekonder metabolitler: bitkilerden elde edilen ve bitkilerin kendi hayati işlevleri üzerinde primer bileşikler (karbonhidrat, yağ, protein) gibi etki etmemesine rağmen, öncelikle ilaç sanayiinde (Göktürk Baydar ve ark., 2010); boya maddesi, tatlandırıcı, renk ve koku verici olarak gıda sanayiinde; pestisit olarak zirai mücadelede; kozmetikte ekonomik bakımdan önemli yeri olan kimyasallardır. Ayrıca ikincil metabolitlerin: kuraklığın, tuzluluğun, UV ışınlarının etkili olan çeşitli stres ortamlarında bulunan bitkilere bu koşullara karşı koyma; mikroorganizmalar ve herbivorlara karşı kendini savunma; böceklerle tozlaşan bitkilerin tozlanma esnasında böcekleri kendine çekme gibi görevleri bulunduğu bilinmektedir (Göktürk Baydar ve ark., 2010).

In vitro kültürlerde biriken sekonder metabolitlerden maddi yarar elde edilebildiği gibi, bu metabolitler canlıların yararlanımına da katkı sağlayabilmektedir (Parr, 1989; Park ve Martinez, 1992). Kültürdeki hücrelerden oldukça çeşitli sekonder metabolitler elde edilebilmektedir (Vanisree ve ark., 2004). Bu nedenle *in vitro* kültürlerdeki hücrelerde biriken bütün bileşikler önemlilik arz etmektedir. Biriken bu bileşiklerin miktarının hem türler arasında hem de aynı türdeki canlılar içinde değişik olabileceği bildirilmiştir. Hücre süspansiyonlarından büyük ölçüde yararlanılabilmasia amacıyla belirlenen optimum şartlar hem hücrelerdeki ürün miktarını arttırmak, hem de bu bileşiklerin hücre dışına çıkışını gerçekleştirme amacına hizmet etmelidir (Parr, 1989; Park ve Martinez, 1992; Misawa, 1994; Nartop ve Gürel, 2004; Haq, 2005; Gürel ve ark., 2006).

Mikroorganizmalar ile hayvanlar tarafından salgılanmayan bitkilerdeki hemen hemen bütün sekonder metabolitlerin benzersiz olduğu belirtilmiştir. Fakat gen aktarımı çalışmalarındaki gelişmeler bitkilerdeki orijinal sentezleri gibi olmayan bazı metabolitlerin üretimini sağlamıştır (Ramachandra Rao ve Ravishankar, 2002). Sekonder metabolitlerin ticari olarak önem kazanmasıyla birlikte, doğadaki bitkiler önemli ölçüde tahrip edilmeye başlanmış ve bu nedenle bazı türler yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmıştır. Sentetik madde içeren ürünlerin insan ve çevre sağlığı bakımından yan etkilere sahip olması nedeniyle de son zamanlarda doğal yapıdaki sekonder metabolitlere yoğun bir ilgi ve talep artışı gözlenmektedir. Sentetik kimyada gelişmeler olmasına rağmen, kompleks yapı özellikleri nedeniyle sentezlenemeyen biyolojik kaynaklı birçok sekonder metabolite halen daha ihtiyaç vardır (Ramachandra-Rao and Ravishankar, 2002). Son zamanlarda ikincil metabolitlerin ekonomik öneminde görülen artış sekonder metabolik yolağı ve ikincil metabolitlerin hücre ve doku kültürlerinin aracılığıyla üretimi bilim adamlarının ve

insanlığın ilgisini çekmiştir (Vanisree ve Tsay, 2004). Bu nedenle ikincil bileşiklerin bitki biyoteknolojisi ile elde edilmesine dair çalışmalar hızla artış göstermiştir. Bitki hücre ve doku kültürleri aracılığıyla, kültür şartları en uygun hale getirilerek ve metabolik yolda kalıtsal değişikliklerin meydana getirilmesiyle istenen sekonder metabolitler elde edilmeye başlanmıştır (Hayta, 2009). *In vitro* teknikler ile sekonder metabolitlerin elde edilmesindeki esas avantaj üretimdeki devamlılığın standardize edilebilmesidir. Bununla beraber, hücre ve doku kültürü yöntemleri ile çevredeki stres faktörlerine diğer bitkilere nazaran iyi karşı koyabilen ve daha yüksek verimli çeşitlerin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Bu yönüyle, dünya çapındaki açlık sorununun çözüme ulaşmasında önemli rol oynayabilecektir (Vanisree ve Tsay, 2004).

Sekonder metabolitlerin ekonomik düzeyde üretilmemiş olmaları, söz konusu tekniğin önündeki en önemli problem olarak karşımıza çıkmaktadır (Callebaut ve ark., 1997; Kim ve ark., 2004). Bunun yanında kültür süresinin uzun olması ve sabit bir üretimin sağlanamamış olması da aşılması gereken bir diğer problem olarak görülmektedir. Hücre süspansiyon kültürlerinde istenen sekonder metabolit eldesinde istenilen başarının elde edilememiş olmasında çok sayıda mekanizmanın etkili olduğu ileri sürülmektedir. Bunlar içinde en önemlilerinin, kaynak bitki materyalinin genetik olarak heterojen olması, genetik ve epigenetik stabilitenin söz konusu olmaması, çevresel stres faktörleri ile doku farklılaşmasının yetersiz olması ve kimyasal bir takım sinyal iletimlerinin etkisi olduğu düşünülmektedir (Dörnenburg ve Knorr, 1995; Kim ve ark., 2004; Nail ve Roberts, 2004). Ayrıca bitki hücreleri mikroorganizmalarla kıyaslandığında nispeten büyük olmalarından ve çalkalama sırasında kolayca zararlanabilmelerinden dolayı da metabolit üretiminin düşebileceği belirtilmektedir (Kieran ve ark., 1997). Tüm bu olumsuzlara karşın her bitki türü için uygun olan sistem sağlanabildiğinde hücre süspansiyon kültürleri, sekonder metabolitlerin elde edilmesinde önemli bir yöntem haline gelebilecektir.

İkincil metabolitlerin homojen ve yüksek saflıkta olmalarının önemli bir kriter olması nedeniyle hücre süspansiyon kültürleri büyük önem taşımaktadır (Zhang ve Furusaki, 1999; Sajc ve ark., 2000; Ramachandra Rao ve Ravishankar, 2002; Qu ve ark., 2006a). Hücre süspansiyon kültürlerinde ikincil bileşiklerin sentezlenmesini artırmak amacıyla kimyasalların veya uygulamaların yalnız veya birlikte kullanılarak bitki hücre süspansiyonu kültürlerine çeşitli müdahalelerin yapıldığı da bilinmektedir. Bunlar müdahaleler arasında en yaygın olarak kullanılanları; kültür ortamına bu metabolitlerin öncüllerinin ilavesi, elisitasyon (Cormier ve ark., 1990; Aoyagi ve ark., 1996; Rajendran ve ark., 1994), kültürden yüksek üretkenlikteki ırkların seçimi sayılabilmektedir. Ayrıca *in*

vitro kültürlerde oluşturulan stres etmenleri bazı ikincil bileşiklerin sentezlenmesini sağlamaktadır (Moreno ve ark., 1995). Bitkilerin kendilerini abiyotik ve biyotik stres faktörlerine karşı korumak için farklı stratejiler geliştirmektedir. Bitki hücre kültürleri ile sekonder metabolitlerin birikimi; ozmotik şok, ışık radyasyonu, UV (ultraviyole) ışıklandırması, ortama inorganik tuzların veya metal iyonlarının (Cu^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+4} vs.) ilavesi, bitkiler için stres etmeni olabilecek uygulamalar (jasmonik asit, etilen, metil jasmonat, ozon) sayesinde kısa sürede, yüksek kalitede ve miktarlarda elde edilebilmektedir (Van Der Heijden ve ark., 1989; Nojiri ve ark., 1996; Rakwal ve ark., 1996; Whitmer ve ark., 1998; Qu ve ark., 2006b). Böylece strese karşı oluşan yanıt, birincil metabolizmadan değişik olan biyolojik yolağın enzimlerinin uyarılmasına neden olmaktadır. Böylece sekonder metabolitlerin birikimi meydana gelmektedir. Bu açıdan bitki hücre süspansiyon kültürleri, sekonder metabolit üretim olanakları sunmakta ve daha az çalışma alanına ihtiyaç duymaktadır. Bunun yanı sıra, son yıllarda bitki hücre ve doku kültürü uygulamalarındaki ilerlemeler transkripsiyon faktörleri ile oluşan sekonder metabolitlerin miktarının arttırılabileceğini gündeme getirmiştir (Vanisree ve ark., 2004). Ayrıca, doğada yetişen bitkiler ile laboratuvar koşullarında yetiştirilen bitkiler karşılaştırıldığında, *in vitro* hücre süspansiyon kültürlerindeki hücrelerin büyümesi daha hızlı bir şekilde sağlanabilmektedir. Ticari üretim yöntemlerinin geliştirilmesi ile ihtiyaç duyulan bazı sekonder metabolitler, bazı ürünler karşılanabilir duruma gelebilmektedir ya da gelebilecektir. Hücre süspansiyonlarında kültür koşulları kolaylıkla kontrol edilebilir (Misawa, 1994). Yüksek kalitedeki ürünlerin kontrollü ve güvenilir tedarigi sağlanabilmektedir. Sekonder metabolitlerin küçük ve büyük ölçekli üretimi gerçekleştirilebilmektedir (Haq, 2005). Ayrıca doğal substratlara analog olan bileşikler ile beslenme sağlanarak doğada mevcut olmayan yeni bileşiklerin de sentezlenebilmektedir (Nartop ve Gürel, 2004; Gürel ve ark., 2006).

Büyük ölçekli kültürlerde hızlı ve yüksek kalitede sekonder metabolit elde edilebilmesi için ortamda biyoreaktörlerin kullanımının zorunlu olduğu belirtilmiştir (Decendit ve ark., 1996). Sekonder metabolitlerin üretilen miktarlarının arttırılmasını sağlamanın yanı sıra, endüstriyel düzeyde üretilmelerini sağlamak için biyoreaktörler tasarlanmıştır (Endress, 1994). Biyoreaktör kullanımı sonucunda, temel amaç olan kaynak bitkide az miktarlarda sentezlenen sekonder bileşiklerin düşük maliyet ile çok miktarlarda üretilibilmeleri gerçekleştirilmiştir (Surmuş Asan, 2013).

1.2. *In vitro* Kültür Teknikleri

Bitkilerin doğada sabit bir Şekilde yaŐamaları ve uzun yaşam süreleri nedeni ile zorlu koşullarda yaŐamlarını devam ettirebilmeleri aÇısından, hayvanlardan daha yetenekli organizmalar olduğu bilinmektedir. Bitkiler, büyüme ve geliŐmede birÇok çevresel uyum ve adaptasyon süreci içine dahil olmaktadır. Bu adaptasyonun önemli özelliği ise, bitkinin herhangi bir hresinden hücre bölünmesini baŐlatabilmesi ve kaybolmuŐ organların rejenere olabilmesi veya herhangi bir uyarıcıya karşı değişik geliŐimsel yollara ynelebilmesidir. Bu durum, bir tip hücre ya da organdan farklı tipte hücre ve organların oluŐturulmasına imkan vermektedir.

In vitro kültürler, herhangi bitki kısmından alınan eksplant ile çoğaltılabilmektedir. Böylece, eksplantlardan uygun besin ortamı içeriğiyle tam organizasyonlu bir bitkinin geliŐmesi mümkün olabilmektedir. Bitki hücrelerinin totipotensi yeteneğinin, *in vitro* bitki üretimi amaçlı kullanılma çalışmaları 1900'l yıllara dayanmaktadır. Alman bilim adamı Haberlandt tarafından, ilk *in vitro* kültür 1902 yılında denenmiŐtir. Bitki hücrelerinin canlılığını *in vitro* Şartlarda saęlayabilmiŐtir fakat bitki büyüme düzenleyicileri o zamanlarda keŐfedilmemiŐtir. Dolayısıyla bu hücreleri oęaltamamıŐtır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin keŐfedilmesi ile 1940'lı yıllarda doku kültürü alanındaki asıl çalışmalar baŐlamıŐtır. Yapılan ilk çalışmalar, besin ortamına konulan bitki hücre, doku ya da organ gibi bitki kısımlarının *in vitro* oğaltılması ve rejenerasyonunun sağlanması üzerine olmuştur (Babaoğu ve ark., 2002). Olgun embriyoların kültürü, kök kültürü, apikal meristem kültürü, kallus ve hücre süspansiyon kültürü ilk çalışmalar olarak sayılabilmektedir. Doku kültürü alanındaki çalışmalar, daha sonraki yıllarda çeŐitlilik göstermeye baŐlamıŐtır. Germplazm muhafazasından, somatik hibridizasyondan, haploid bitki üretiminden, doğada tozlaŐmayan bitki türlerinin hibritleŐtirilmesinden, somaklonal varyasyondan ve bitki ıslahı amacıyla yapılan gen transferinden; bunun dışında bitkilerin mikroçoğaltımında ve sekonder metabolitlerin sentezlenmesinde yararlanılabilecek doku kültürü çalışmaları yapılmaya baŐlamıŐtır (Babaoğlu ve ark., 2002). (apan, 2006). Son zamanlarda, doku kültürlerinin genellikle kalıtım mühendisliği için bir yöntem olarak kullanıldığı görülmektedir. Son zamanlarda uygulanan *in vitro* yöntemler arasında; ovül ve ovaryum kültürleri, kallus ve hücre süspansiyon kültürü, embriyo, kök, anter, meristem, sürgün ve protoplast kültürleri ile farklı bitki organlarının kültürlerinin bulunduğu bildirilmiştir.

Bitki doku kültürü besin ortamları, herhangi bir bitki kısmının tamamen yapay ortamda gelişmesine olanak tanınmalıdır ve mineral elementler (makro ve mikro), organik maddeler (vitaminler, amino asitler), karbon kaynağını içermelidir (Smith, 2000).

Genellikle herhangi bitkinin steril parçaları (eksplant) *in vitro* kültürleri başlatmak için kullanılır. Bu parçalar, yapraklardan ya da köklerden elde edilebileceği gibi polen ve endosperm gibi özel hücre tiplerinden elde edilebilmektedir. Kültürün başlatılmasında birçok neden eksplantı etkileyebilmektedir. Genellikle genç ve daha hızlı büyüyen (veya dokuların erken gelişim evreleri) dokuların daha etkili olduğu bilinmektedir (Smith, 2000).

Bitki doku kültürü; steril olarak hazırlanan doğal olmayan besin ortamında, tam organizasyonlu bitkinin veya hücrelerin, bitki dokularından (alınan eksplanttan), organlarından yeni dokuların, bitkilerin veya bitkilerin sentezlediği metabolitlerin (ikincil ve primer bileşikler gibi) elde edilmesidir (Babaoğlu ve ark., 2002). Doku kültürünü başarılı olarak uygulayabilmemiz, bitki hücrelerinin sahip olduğu totipotensi ve rejenerasyon olabilmekle karakteristiktir.

Bitkilerin kullanıldığı *in vitro* kültür sistemleri geleneksel yöntemlere nazaran çeşitli avantajlar sunmaktadır. Bu avantajlar arasında en önemlileri şunlardır;

a) Sekonder metabolitler, optimizasyonu sağlanan laboratuvar koşullarında mevsimsel değişimlere bakılmaksızın oluşabilmektedir.

b) *In vitro* ortamda kültüre alınan bitki kısımları ya da hücreleri ile ilgili çalışmalar steril şartlarda sürdürülür.

c) Bitki hücrelerinin sayısının artırılmasıyla, bu hücrelerden bitkinin karakteristik metabolitleri elde edilebilmektedir.

d) Kültür periyodu süresince hücre çoğalmasının kontrollü şartlarda gerçekleştirildiği *in vitro* kültürlerde metabolizmaya ait işlevler düzenlenebilmektedir, bu nedenle daha fazla sarf edilecek olan iş gücünün daha az oranda kullanılmasıyla sekonder metabolitlerin birikimi daha fazla seviyeye yükseltilebilmektedir (İşlek, 2009).

1.2.1. Kallus Kültürü

Farklılaşmış hücrelerin ve dokuların yaralanması ile mekanik yaralanmaya reaksiyon olarak yaralanma yerlerinde oluşan farklılaşmamış/organize olmamış parankimatik hücreleri içeren yığın kallus olarak adlandırılmaktadır. Kallus; doku farklılaşmasının olmadığı yara hücreleridir (Kaya, 2012). Kallus kültürünün; bitkiden kesilip çıkarılan ve bölünme özelliğine sahip doku ya da organ bölümlerinin karbon ihtiva eden bir maddenin ve bitki büyüme düzenleyicilerinin eklendiği yarı-katı besin ortamında gelişen morfolojik

olarak belli bir düzene sahip olmayan hücrelerden oluştuğu belirtilmektedir. Kallus kültürü ile sekonder metabolitlerin üretilmesi düşünülmez. Kallus kültürü, süspansiyon kültürünün başlangıcı ya da organ oluşumuyla seri üretimin amaç edinildiği bir geçiş kültürüdür (Türkmen, 2009).

Kallus kültürü yapılan besin ortamındaki çeşitli elementler homojen dağılmadığı için hücreler yavaş büyümektedir. Bu hücreler topluluk oluşturarak birbirleriyle temas halinde bulunmaktadır. Ayrıca bu hücrelerin hücre farklılaşmasının başlangıç aşamasında olması nedenleriyle kallus kültürü sekonder metabolitlerin üretimini desteklememektedir (Lindsey ve Yeoman, 1983).

Kalluslar sekonder metabolit sentezleyen ilgili kaynak dokudan ya da embriyo gibi başka dokulardan başlatılabilmektedir (Lindsey ve Yeoman, 1983). Kallus kültürlerinde besin ortamına uygun bitki büyüme düzenleyicisi eklenerek kallus yapısı istenilen dokulara dönüştürülebilmektedir. Kallus sertliği yara hücrelerinin birbirleri ile olan sıklığını göstermektedir. Süspansiyon kültüründe ise daha gevşek ve yumuşak olan kallus hücreleri istenmektedir (Türkmen, 2009). Kallus oluşumuna neden olan uyarılmayı birçok faktör etkileyebilmektedir. Bunlar arasında mineral besin elementleri ve bitki büyüme düzenleyicileri gibi kimyasal faktörler; ışık sıcaklık, nem gibi çevresel faktörler ve bitkinin genetik yapısı sayılabilmektedir. Bu nedenle bir bitki türünde kallus oluşumu bir ortamda teşvik edilebilirken diğer bir türde başarısız olabilmektedir (Trigiano ve Gray, 1996). Kallus kültürlerinde genellikle gövde ve köklerdeki kambiyal dokular kullanılmaktadır. Fakat bu dokuların yanı sıra bitkilerin meyvelerinin, polenlerinin, endospermilerinin, embriyosunun kallus kültürlerini başlatmak için kullanıldığı bilinmektedir.

Besin ortamına uygulanan bitki büyüme düzenleyicileri, bitki kısımlarından ve bunlardan gelişen kalluslardan morfojenetik farklılıklar oluşturabilmektedir (Akı, 1997). Oksin ve sitokin miktarları önem arz etmektedir (Molnar ve ark., 2005). Oksin:sitokin konsantrasyonu *in vitro* morfojenik fonksiyonlarda rejenerasyonu gerçekleştiren faktördür. Eşit oksin/sitokin oranının, kallus oluşumuna neden olmaktadır (Yamaguchi ve ark., 2003). Her bitkide farklı konsantrasyonlarda bulunan endojen hormone miktarı farklı olduğundan dolayı *in vitro* şartlarda bitki eksplantlarından kallus gelişiminin sağlanması için oksinler ve sitokinler farklı miktarlarda besin ortamına ilave edilmektedir. *Catharanthus roseus* türünde yapılan bir araştırmada farklı konsantrasyonlardaki oksin ve sitokin kombinasyonlarının kallus biyokütle artışı üzerine olan etkileri ortaya konmuştur (Akçam Oluk ve Yürekli, 1995; Kaya, 2012; Kaya ve Akı, 2012; Kaya ve Akı, 2013). Besin ortamında oksinin sitokine göre daha yüksek oranda kullanılmasının kallus

gelişimine olumlu etki yaptığı belirlenmiştir (Kaya, 2012; Kaya ve Akı, 2012; Kaya ve Akı, 2013). Bitki biyoteknolojisinde ise kallus kültürü; *in vitro* çoğaltım, *in vitro* kültürde ortaya çıkan somaklonal varyasyondan yararlanmada ve hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması amacıyla kullanılmaktadır (Bürün, 1996).

1.2.2. Bitki Hücre Süspansiyon Kültürü

Bitki hücre süspansiyon kültürlerinin hücre bölünmesi, viral enfeksiyona karşı dokuların duyarlılığı, hücresel farklılaşma gibi hücre fizyolojisi (Muir ve ark., 1958) ve hücre metabolizması (sekonder metabolit sentezlenmesi) araştırmalarında (Kurz ve Constabel, 1979) genellikle kullanıldığı akademik dünyada çok öncelerden beri bilinmektedir. Bitkilerin sentezlediği sekonder metabolitlere benzer niteliklere sahip olan veya bu sekonder metabolitlerden daha üstün niteliklere sahip olanların elde edilebildiği süspansiyon kültürlerinin kurulması özellikle son yıllarda artış gösterdiği bilinmektedir. Canlı biliminde ait inceleme yöntemlerinin kullanılmasıyla yeni sekonder metabolitlerin tespit edildiği belirtilmiştir. Hücre süspansiyon kültürlerinin özelliklerinin düzenlenebilmesi sayesinde kültürdeki hücrelerin biyosentetik kapasitelerinin daha yüksek düzeye çekilebileceği ortaya konmuştur. Hem yapay seçilim sayesinde hem de metabolik kapasitesi fazla olan hücrelerin teşvik edilmesi sayesinde bunlardan elde edilen sekonder metabolitlerin miktarının dikkate değer ölçüde fazla olduğu saptanmıştır. Bitkilerde morfolojik ve fizyolojik olarak farklılaşmış bitki organlarının sentezlediği bileşikler, farklılaşmamış hücrelerin de laboratuvar koşullarında uyarılması sayesinde sentezleyebildiği bilinmektedir (Vanisree ve ark., 2004).

Hücre süspansiyon kültürleri; çalkalanmakta olan besin elementlerinin ve büyüme etkenlerinin eklendiği sıvı besin ortamı içerisinde büyümekte olan dağının kallus hücreleri ve hücre kümelerinden meydana gelmektedir Bu şekilde hücre miktarının daha hızlı (hücre sayısının on beş saatte iki katına çıkabilmesi gibi) biçimde artması sağlanabilmektedir. Basit bir yöntem olması nedeniyle bitki hücrelerinden sekonder metabolitleri elde etmek amacıyla genellikle kullanılmıştır (Street, 1977; Lindsey ve Yeoman, 1983; Teli ve Timko 2004; Oskay ve Oskay 2009). Bir kültür periyodu boyunca hücre sayısı artmaktadır ve en fazla olduğu noktaya ulaşmaktadır. Kültür bu noktada geriye (başlangıç hücre sayısına) seyreltilirse [alt kültür], bunu izleyen kültür periyodunda benzer olarak büyümektedir ve aynı sayıda hücre sayısını oluşturmaktadır (Street, 1977). Süspansiyon kültürlerine özgü olan bu özelliğin, sekonder metabolitlerin eldesi için önemli yarar sağladığı bilinmektedir. Süspansiyon kültürlerindeki hücrelerin yapısal düzenlenmesi birbirinden değişkenlik

gösterebilmektedir. Bazı kültürlerdeki hücrelerin birbirinden ayrılmış olarak kültür ortamının tamamında dağıldığı; bazılarında ise hücrelerin biraraya gelerek milimetreler ile belirlenebilen agregatlar oluşturduğu bilinmektedir. Büyüme hızı düşük olan hücre agregatlarından meydana gelen kültürlerin çok miktarda sekonder bileşik sentezleyebilmektedir (Lindsey ve Yeoman, 1983).

Temeli 1800'lü yıllara dayanan hücre süspansiyon kültürlerinin esası, çok daha önceki zamanlardan süregelerek araştırılan ve bazı maddelerin (enzim, antibiyotik, etanol vb.) elde edilmesiyle endüstri alanındaki kullanımının belli bir yöntemle oturtulduğu mikrobiyolojik sistemlere benzetilebilmektedir. Farklı olan ögenin ise, bitki hücre süspansiyon kültürlerinde mikroorganizmaların yerine bitki hücrelerinin bulunması gösterilmektedir. Kültürlerdeki hücreler sentezledikleri metabolitlerin bazılarını besin ortamına salgılamakta bazıları ise hücre bazında biriktirmektedir. Bu nedenle kültürlerdeki hücreler üretken birer fabrikaya benzetilebilir. Hücre süspansiyon kültürleri ile günümüzde ifade edilen metabolomikler terimi; son yıllarda kozmetik ürünlerin, aromatik maddelerin ve baharatların elde edilebildiğini belirtmektedir ve metabolitlerin (sekonder ve primer metabolit) biyolojik yolağında birbiriyle olan bağlantısını incelemek amacıyla yapılan analizleri kapsamaktadır (Hall ve ark., 2002). Böylece 1990'lı yıllara kadar hücre süspansiyon kültürlerinin kuruluşu, bitki hücrelerinin üretkenliğinin artırılması vb. amacıyla yapılan araştırmalar şimdilerde ise genellikle sentezlenen metabolitlerin izolasyonu ve belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır.

Hücre süspansiyon kültürlerinin eldesi için farklılaşmış doku parçasından alınan eksplant ya da farklılaşmamış bir hücre yığını olan kallus ta kullanılabilir (Butcher ve Ingram, 1976). Farklılaşmamış yapılar olan kallustan hücre süspansiyon kültürlerine geçiş, farklılaşmış bitki kısımlarından geçişe göre daha kısa zaman gerektirmektedir. Bu nedenle kallusların hücre süspansiyon kültürlerinde başlangıç materyali olarak tercih edildiği belirtilmektedir (Dodds ve Roberts, 1985). Bununla beraber, kallustan bile serbest hücre elde etmek (dissosiasyon), yıllar boyunca araştırılmıştır (King ve ark., 1973). Araştırmacılar, hücrelerin birbirinden ayrılması için önemli olan uygulamaların olduğunu belirlenmiştir. Birincisi kimyasal etmendir; ikincisi ise mekanik etmendir. (King ve ark., 1973; Street, 1977). Kimyasal etmen uygulamasında; bitki türüne göre uygun besin ortamı seçilmektedir ve hücre çeperini ve özellikle orta lameli parçalayan ortama belli ozmotik basınçta uygulanan selülaz ve pektinaz enzimleri ortama ilave edilmektedir (King ve ark., 1973). Mekanik etmen uygulamasında; mekanik olarak hücrelerin birbirinden ayrılmasını ve kültür atmosferi ile kültür ortamı arasındaki gaz alışverişini sağlayan çalkalama şekli

belirtilmektedir. Sıvı olan kültür ortamının hareket etmesi hücreleri ve hücre agregatlarını dağılmış olarak bulunmasını sağlamaktadır (Street, 1977). Bu amaçla farklı tiplerdeki çalkalayıcılar kullanılabilir. Yere 45°C'lik açıyla yatay olarak bulunan ve hücre süspansiyonlarının çeviriciyle döndürüldüğü çıkık ve orbital çalkalayıcılar bulunmaktadır (Butcher ve Ingram, 1976; Street, 1977). Birçok tür için özellikle orbital çalkalayıcıların kullanıldığı belirtilmiştir (Butcher ve Ingram, 1976). Orbital çalkalayıcılardaki hücre süspansiyon kültürleri, belirli sürelerde alt kültüre (kültür ortamının ve kültür ortamında tükenen O₂'nin geri kazanımı) alınmasına ihtiyaç duyulan kesintili kültürlerdir. Ayrıca sürekli kültür sistemleri de mevcuttur. Sürekli kültür sistemleri ise, 1 litreden 10 litreye kadar değişen kültür kapları ile yapılan ve büyük ölçekli araştırmalara amacıyla kullanılan sistemler olan açık ve kapalı olarak iki farklı kültür sistemi bulunan biyoreaktörlerdir (Moreno ve ark., 1995).

Kültürdeki hücrelerden proteinler, çeşitli sekonder metabolitler (alkaloidler, terpenoidler ve bazı fenolik moleküller) gibi oldukça farklı ürünler elde edilmesi mümkün olabilmektedir. Hücre süspansiyon kültürlerinde proteinlerin de elde edilebilmesi, bağışıklık sisteminde görevli olan terapötik özellikteki proteinlerin sentezlenebileceğini göstermiştir (Vanisree ve ark., 2004).

Bitki hücre süspansiyon kültürü ile yapılan çalışmalarda; farklılaşmamış ve organize olmamış kültürlerden yeterli miktarlarda sekonder metabolit eldesinin sağlanamadığını belirtilmiştir. Bu nedenle ürün arttırımı amacıyla çeşitli tekniklerin kullanımı ile dışarıdan kültürle muamele edilmesi gerekmektedir. Kallus kültürü ile yapılan çalışmalarda ise; sekonder metabolit üretiminde kültürün başlatıldığı doku parçasının orijininin önemli olduğu ve alt kültürlemeler boyunca genetik stabiliteyi sağlamanın gerekli, ancak zor olduğu belirtilmiştir. Özellikle, belli bir organ (yaprak, hipokotil, kök, sürgün veya embriyo benzeri yapılar) oluşturmak üzere farklılaşan kallus kültürlerinde sekonder metabolit birikiminin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, son yıllarda farklılaşmış ve organize olmuş kültürlerden elde edilen sekonder metabolitlerin, farklılaşmamış ve organize olmamış kültürle göre çok daha avantajlıdır (Sökmen ve Gürel, 2001). Farklılaşmamış ve organize olmamış kültürler ya da farklılaşmış ve organize olmuş kültürlerin elde edilmesini ve devamlılığını sağlamak için her bitki için farklı konsantrasyon ve/veya kombinasyondaki bitki büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç vardır. Bu bitki büyüme düzenleyicilerinden hem oksin ve sitokinlerin niteliği ve miktarı, hem de birbirlerine olan oranları kallus ya da organ oluşumunu ve böylelikle sekonder metabolit sentezini önemli ölçüde etkilemektedir (Giri and Narasu, 2000). Akçam ve Demiray

(2000), *C. roseus* hcre süspansiyon kültürlerine ozmotik stress uyguladığında hücre sayısının en fazla olduğu zamanda kültürlerde araştırılan alkaloidlerden aymalisin alkaloidin saptamıştır.

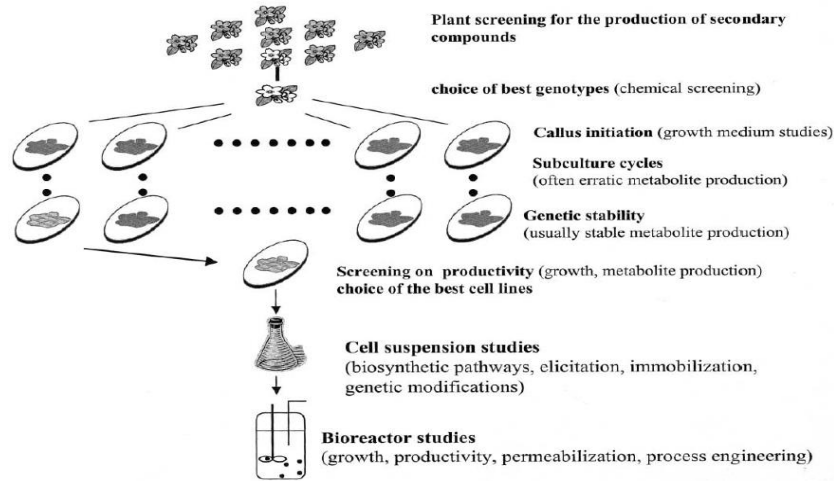
Farklılaşmamış hücrelerin tersine farklılaşmış hücrelerden elde edilen kültürlerin biyokimyasal ilerlemeleri önceden tahmin edilebilmektedir. Böyle hücre süspansiyon kültürlerinde sentezlenen sekonder metabolitler, nicelik ve nitelik açısından doğal ortamlarında bulunan bitkilerin sentezlediği metabolitlere yakın özelliktedir. Ayrıca bunların metabolik ve genetik bakımdan değişmez yapıdadır. Bu özellikleri nedeniyle ayrıca bir optimizasyon basamağına gerek olmadan kullanılabilir (Parr, 1989).

Kallus ve hücre süspansiyon kültürlerine uygulanan uyarıcılar kaldırıldığında hücrelerden elde edilen sekonder metabolitlerin miktarının da düştüğü belirlenmiştir. Bu nedenle sekonder metabolitlerin eldesini arttıracak yöntemler ortaya konmuştur. Besin ortamına uygulanan bitki büyüme düzenleyicilerinin çeşitliliği ve miktarı sentezlenen sekonder metabolit miktarı üzerinde belirleyici olmaktadır. Kültür ortamına uygulanan besin seviyesi, ışık miktarı ve sıcaklık gibi çevresel faktörler hücrelerden sekonder metabolitlerin eldesini etkilemektedir. Ortamda azalan fosfat miktarının, sekonder metabolit sentezini arttırdığı belirlenmiştir (Lindsey, 1985). Bu çevresel etmenlerin kültürdeki hücreler üzerindeki etkileri türler arası farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle optimum şartların saptanması için her kültür tek tek denenmeli ve bu çevresel faktörler türlere ait hücrelerin hücre süspansiyon kültürlerindeki durumuna göre uygulanmalıdır (Yeoman ve Yeoman, 1996).

In vitro kültürlerde bazı sekonder metabolitlerin birikimi farklı biyotik (elisitasyon gibi) ya da abiyotik (metal iyonları vs.) uyarıcı bileşiklerin besin ortamlarına ilave edilerek arttırılabildiği bilinmektedir (Di Cosmo ve Misowa, 1985; Zhao ve ark., 2005; Savitha ve ark., 2006; Namdeo, 2007). *In vitro* kültürlerde biriken sekonder metabolit miktarını arttırabilen bu bileşiklerin çoğunlukla hem hücrelerin büyümesini hem de canlılığını azalttığı için iki basamaklı olacak şekilde uygulamaların yapıldığı kültürler ortaya çıkmıştır. Bu kapsamda öncelikle hücrelerin en uygun koşullarda büyümesi ve sonrasında üretimin gerçekleştirileceği ortama geçirilmektedir. Geçiş yapılan bu kültür ortamındaki şartlar, elde edilmek istenen ürünün sentezlenmesini hem teşvik etmelidir hem de arttırmalıdır. Üretim ortamındaki uygulamaların sonucunda verimli bir üretimi gerçekleştiren kültürün elde edilmesinin ardından, bu kültürün karalılığı devam eden süreçlerde takip edilmelidir. Çoğu kültürde belli bir zamanın geçmesinin ardından epigenetik (DNA asetilasyonu ve metillenmesi gibi) ve genetik (kromozom kırıkları,

kromozom translokasyonu ve kromozom delesyonu gibi) değişiklikler veya yapılarında meydana gelen farklılıklar gibi sebeplerle kültürlerdeki sentezlenen sekonder metabolitlerin verimi azalmaktadır. Kültürdeki hücrelerde meydana gelen farklılıklar nedeni ile ürün verimindeki bu azalmanın olumlu yönü olduğu da belirtilebilmektedir. Kültürdeki hücrelerin tümü aynı olmamaktadır ve kültürde maksimum sekonder metabolit sentezleyebilen hücreleri diğer hücrelerden ayırt edebilmek mümkündür. Bu hücreler kültürden izole edilerek başka bir kültür ortamına aktarılabilir. Böylece yüksek üretkenliğe sahip olan bu hücrelerden daha fazla miktarlarda ürün elde edilebilir. Bu hücrelerin bulunduğu kültürler sentezlenen metabolitler açısından takip edilmelidir. Böylece bu kültürlerde bazen farklılaşarak daha az miktarlarda sekonder metabolit biriktiren hücreler tespit edilebilmektedir. Az miktarlarda metabolit biriktiren hücrelerin elenmesi ve daha fazla miktarlarda metabolit üretenlerin kültürden izole edilmesiyle istenen sekonder metabolitin daha fazla miktarlarda eldesi gerçekleştirilebilir (Parr, 1989; Yeoman ve Yeoman, 1996).

Bitki hücrelerinden sekonder metabolit üretimi amacıyla izlenen yol Şekil 1.1'de özetlenmiştir.



Şekil 1.1. Bitki hücrelerinden sekonder metabolit üretimi

Sekonder metabolitlerin çeşitli sanayi sektörlerindeki rollerinin anlaşılmasından sonra özellikle son yıllarda bu metabolitlerin elde edilmesine yönelik çalışmalar giderek artış göstermiştir. Bununla beraber yapılan son araştırmalar ile sekonder metabolitlerin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinin anlaşılması sayesinde önemi daha da artmıştır (Göktürk Baydar ve ark., 2010). Bunlardan özellikle fenolik bileşikler ve tokoferoller insan

sağlığı üzerine olumlu etkilerinin yanı sıra tedavi amaçlı antikanserojen, antifungal gibi tıp sektöründeki ilaçların bileşim maddesi olarak da kullanılmaktadır. *Calendula officinalis* özellikle fenolik bileşiklerce zengin bir tür olması nedeniyle, sekonder metabolit üretimi için de son derece uygun bir model oluşturmaktadır (Olennikov ve Kashchenko, 2013; Rigane ve ark., 2013; Ghédira ve Goetz, 2016).

1.3. *Calendula officinalis* L. ve *C. arvensis* L. Türleri

Calendula officinalis ve *C. arvensis* türleri, Asteraceae (Compositae) familyasına ait, Doğu Avrupa'ya ve Akdeniz'e özgüdür. Bunun yanı sıra Mısır'dan köken aldığına da inanılmaktadır (Mohammad ve Kashani, 2012) ve şu anda Avrupa'da ve Orta Doğu'da tıbbi özellikleri nedeniyle yetiştirilmektedir (Khalid ve Silva, 2010; Hussain ve ark., 2011; Krol 2011; Rahmani ve ark., 2011; Taherkhani ve ark., 2011; Szejewska ve Bielski, 2012). Sarı ve turuncu renklere sahip, aromatik, hızlı büyüyen ve tek yıllık otsu bitkilerdir (Gilman ve Howe, 1999).

Calendula adı, *Calendula* kelimesinden gelmektedir. Latince isim olan *Calendula* kelimesi ayın ilk günü demektir. Bu adın nedeni olarak ise, çiçeklerinin koparıldıkça yeni çiçekler oluşturduğu belirtilmiştir. *C. officinalis* İngilizcede "pot marigold" denen kadife çiçeği olarak bilinmekle beraber; tıbbi nergis, aynısefa çiçeği, portakal nergisi, bahçe nergisi, susi, şamdan çiçeği, altıncık gibi isimlerle de bilinmektedir. Ayrıca Zergul olarak da bilinmektedir (Mehta ve ark., 2012).

Calendula (*C. officinalis*) medikal özellikleri nedeniyle Roma döneminden beri yetiştirilmektedir (Macht, 1955). *C. officinalis* türü, süs bitkisi olarak kullanıldığı gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için geleneksel tıpta da kullanılmaktadır. Tıbbi aktivitesi sekonder metabolit içeriğine bağlıdır. *C. officinalis* türünde bulunan temel sekonder metabolitler: flavonoidler (kuersetin, rutin, narsisin, izorhamnetin, kaempferol), karotenoidler, glikozitler, steroller, fenolik asitler (kafeik asit vb.), terpenoidler, serbest ve esterlenmiş triterpenik alkoller, kalendulin, bitterler ve diğer bileşiklerden oluşmaktadır (Ukiya ve ark., 2006; Kurkin ve Sharova, 2007; Fonseca ve ark., 2010; Mehta ve ark., 2012). Bitkilerin çiçeklerinde likopen ve beta karoten bulunmaktadır (Ukiya ve ark., 2006; Fonseca ve ark., 2010). *C. officinalis* türünün temel olarak triterpenleri, flavonoidleri, fenolik asitleri içerdiği bilinmektedir (Re ve ark., 2009). Fitokimyasal çalışmalar başlıca flavonoid glikozitleri ile rutin, narsisin ve kuersetin gibi klorojenik asitleri içeren bu polar ekstraktları belirtmektedir (Leach, 2008).

C. officinalis türünün farklı ekstraktlarında, bu türün fitokimyasal bileşenleri değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin metanolik ekstraktı karbonhidratları, glikozitleri, saponinleri, triterpenleri, yağ asitlerini ve diterpenleri; *C. officinalis* türünün etanolik ekstraktı ise karbonhidratları, glikozitleri, saponinleri, triterpenleri, yağ asitlerini ve diterpenleri; sulu ekstraktı karbonhidratları, glikozitleri, saponinleri, triterpenleri, flavonoidleri ve diterpenleri içermektedir (Roopashree ve ark., 2008).

C. officinalis çiçekleri yenilebilir. Ayrıca bu çiçekler baharat ve çay olarak, yemek pişirmek için, yiyeceklere tat ve renk katmak amacıyla kullanılabilmesinin yanı sıra tıpta merhem ve kozmetik amaçlarla da kullanılabilirdiği belirtilmektedir (Mehta ve ark., 2012; Torbaghan, 2012). Deri problemlerine karşı herkes tarafından kullanıldığı bilinmektedir. Bu bitki türünün; fitoterapi amaçlı kullanılmasının (Mehta ve ark., 2012) yanı sıra dermatoloji (yaralara ve güneş yanıklarına) (Azırak, 2007) ve kozmetikte de kullanıldığı bilinmektedir (Mehta ve ark., 2012). On iki parmak bağırsak ve mide kanserinde, mantar hastalıklarında kullanılmaktadır (Azırak, 207). Triterpen alkollerin antiinflamatuar aktiviteye katıldığı kanıtlanmıştır (Mehta ve ark., 2012). Antioksidan, sitotoksik, fotoprotektif (Ukiya ve ark., 2006; Fonseca ve ark., 2010), mide-bağırsak/karaciğer bozuklukları üzerindeki etkililiği, nöro psikiyatri anatomisi üzerindeki olası sakinleştirici etkisi, östrojenik ve uterotonik etkilere, immün uyarıcı anti-inflamatuvar, antibakteriyel, antiviral, antifungal gibi farklı biyolojik aktivitelere sahip olduğu belirtilmiştir (Kemper ve ark., 1999; Shah ve Seth, 2010). *C. officinalis* çiçeklerinden elde edilen ekstre, safra üretimini düzenleyen, antifungal aktivitesi bulunan, gastrik ve on iki parmak bağırsağı ülser tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Bako ve ark., 2002). Ekstraktın kardiyovasküler sistemi, böbrek fonksiyonlarını etkilemediği; anti-HIV aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir (Campos ve ark., 2005).

C. officinalis ekstraktlarının terapötik özellikleri; kısmen terpen içeriği ve özellikle ülsere karşı sedatif aktivitesi olan glikol terpenoidler sayesinde (Bako ve ark., 2002). Ekstraktın en önemli bileşeni; triterpenoidlerdir, özellikle anti-inflamatuvar aktivitesiyle faradioldür (Kalvatchev ve ark., 1997). Ekstraktın kimyasal kompozisyonunun diğer bileşenleri: flavanoidler, esansiyel yağ ve seskiterpenlerdir. *C. officinalis* türünün tıbbi aktivitesi esansiyel yağlar, flavonoidler, steroller, karotenoidler, taninler, saponinler, triterpen alkoller, polisakkaritler, müsilaj, resin gibi birkaç sekonder metabolit sınıfının içeriği ile ilişkilidir (Vidal-Ollivier ve ark., 1989).

Calendula cinsinin sekonder metabolitlerinin konsantrasyonu ise yetiştiği bölgeden ve yetiştirme koşullarından etkilenmektedir. *Calendula* cinsine ait olan bitkilerin yetişmesi

güneşli yerlerde, tınlı ya da kumlu topraklarda ve aşırı nemli yerlerde zor olduğu için bu bitkiler drenajı iyi yapılmış topraklarda daha iyi yetişmektedir (Hussain ve ark., 2011).

Calendula yetiştirilmesinin amaçları; özel dekoratif olan değerli genotipleri elde etmek ve çok sayıda tohum sağlamak amacıyla bol çiçek elde etmek, bitkilerden türevlenen tıbbi ürünlerin niteliğini arttırmak, hastalık ve pestisitlere dirençli kültivarlar elde etmek olmak üzere 4 işlevine odaklanmıştır (Zitterl-Eglseer ve ark., 2001; Baciu ve ark., 2010).

Calendula genusu, 25 tür içermektedir. Bunlardan en yaygın bulunanlar ise şunlardır: *C. officinalis*, *C. arvensis*, *C. suffruticosa*, *C. stellata*, *C. tripterocarpa*, *C. alata* olarak bilinmektedir. Bunlardan en çok yetiştirilene ise *C. officinalis* türüdür (Goncariuc, 2003). *C. officinalis*, farklı toprak koşullarını tolere edebilmektedir ve tohumdan hızlıca gelişebilmektedir. Spiral olarak düzenlenmiş, hafifçe tüylü olan yapraklara sahiptir (Gilman and Howe, 1999). *C. officinalis* ve *C. arvensis* türlerinin yaprakları ve çiçekleri tıbbi tedavide kullanılabilir (Kemper, 1999).

C. officinalis ve *C. arvensis* türünün sistematik sınıflandırılması aşağıda belirtilmiştir (Goodwin, 1954; USDA, 2005).

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivision	: Spermatophyta
Division	: Magnoliophyta
Classis	: Magnoliopsida
Subclassis	: Asteridae
Ordo	: Asterales
Familya	: Asteraceae (Compositae) (Papatyagiller)
Subfamilia	: Asteroideae
Tribe	: Calenduleae
Genus	: <i>Calendula</i>
Species	: <i>Calendula officinalis</i> Linn. (Tıbbi nergis, Aynısefa) (Pot Marigold) <i>C. arvensis</i> Linn. (Çayır nergisi) (Field Marigold)

Doktora tezimizde, tıbbi ve ekonomik öneme sahip olan *Calendula officinalis* ve *Calendula arvensis* türlerinin *in vivo* ve *in vitro* şartlarda tohumdan fideleri yetiştirilmiştir. *In vitro* olarak yetiştirilen 10-12 haftalık fidelerin yaprak eksplantları alınarak 12 farklı konsantrasyondaki oksin ve sitokinin kombinasyonunun eklendiği MS besin ortamında ve MS0 ortamında kültüre alınmıştır. Bu ortamlardan sadece MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamında gelişen kalluslardan devam ettirilen kültürlerde 120. güne kadar kallus biyokütle

karşılaştırmaları, hücre süspansiyon kültürlerinde hücre sayımı, yaş/kuru kallus biyokütle karşılaştırması yapılmıştır. *In vivo* ve *in vitro* olarak yetiştirilen bitkilerin yapraklarındaki sekonder metabolitlerin (kuersetin, kaemferol, kafeik asit, beta karoten) 60. güne kadar olan miktarları araştırılmıştır. Sekonder metabolitlerden sadece kafeik asit ve beta karoten miktarları ortaya konmuştur.

Tezimizin amaç ve hedefi, *in vitro* koşullar altında kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde gerçekleşen farklılaşma olayından faydalanarak sekonder metabolitlerin, doğal bitkide bulunduğu farklı miktarlarda ve içeriklerde elde edilebilmesi temeline oturtulmuştur. Kontrollü koşullar altında tüm denetimlerin araştırmacılarca olduğu şartlarda araya öncül maddelerin eklenmesi neticesinde bitki tarafından üretilen son sekonder metabolitler değişime uğratılabilmekte ve biyotransformasyon neticesinde istenenin daha üzerinde ve kaliteli maddeler elde edilebilmektedir. Bu tür tıbbi ve ekonomik sekonder metabolitlere sahip olan bitkilerin hücre süspansiyon kültürleri yolu ile çoğaltılması ve sekonder metabolitlerin daha ileri aşamada biyoreaktör sistemlerinde ticari olarak yüksek miktarda üretilebilmeleri mümkün olmaktadır. Yapılan literatür taramalarında, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda tohumdan yetiştirilen *Calendula officinalis* ve *Calendula arvensis* türlerinin sekonder metabolit miktarlarının karşılaştırıldığı, hücre süspansiyon kültürlerinin bitki büyüme düzenleyicileri yolu ile uyarılarak sekonder metabolit miktarındaki değişimlerin belirlendiği bilimsel bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yönü ile de tamamlanan Doktora tezimizin özgün nitelikte olduğu düşünülmektedir.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *C. officinalis* ve *C. arvensis* Türünün Tıbbi Önemi

Calendula genusu üzerinde yapılan araştırmalar sayesinde, *C. officinalis* L. ve *C. arvensis* L. türünün birçok biyolojik aktivitesi kanıtlanmıştır. Bu biyolojik aktivitelerin başlıcaları; antioksidan, antiülser, antimikrobiyal, antiviral, hepatoprotektif, yara iyileştirici, antienflamatuvar, sitotoksik, immunomodulator, antitumör, analjezik ve antipiretik aktivitelerinin yanı sıra diğer bazı etkileri de bulunmaktadır.

2.1.1. Antioksidan Aktivite

Cordova ve ark. (2002), *C. officinalis* türünün bütanolik fraksiyonunu reaktif oksijen ve nitrojen parçalarına karşı etkisini araştırmıştır. Karaciğer mikrozomlarındaki $Fe^{(2+)}$ /askorbat indüklü demir peroksidasyonunun, 0,5mg/ml bütanolü fraksiyon varlığında 100% inhibe edildiği belirlenmiştir. *C. officinalis* türünün bütanolü ekstresinin serbest radikal süpürücü ve antioksidan aktivitesinin olduğu belirlenmiştir.

Herold ve ark. (2003), *C. officinalis* türünün sulu alkollü ekstresinin, antioksidan kapasitesinin bir sonucu olarak, reaktif oksijen parçaları üreten sistemler (insan nötrofilleri) kullanıldığında, ekstrenin güçlü reaktif oksijen süpürücü özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu özellikleri nedeni ile sulu alkollü ekstrenin; farklı iltihaplı alerjik hastalıklara karşı ilaç olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu, yeni antioksidan ve antienflamatuvar ajanların içeriğine girebileceği belirtilmiştir.

Kaurinovic ve ark. (2003), *C. officinalis* çiçeklerinden, yapraklarından, gövdesinden ve köklerinden hazırlanan bütün ekstraların dezoksiribozun kimyasal bozunması sonucu oluşan hidroksi radikallerini inhibe ettiğini belirtmiştir. Özellikle etilasetatlı ekstresinin en yüksek hidroksi radikali süpürücü etkisi olduğu ortaya konmuştur.

Cetkovic ve ark. (2004), *C. officinalis* ve *C. arvensis* türünün ekstralarının, uygulanan konsantrasyonlara bağlı olarak araştırılan bütün radikalleri süpürebildiği belirlenmiştir. *C. officinalis* türü ekstralarının, *C. arvensis* türü ekstralarına göre daha iyi antioksidan ve radikal süpürücü olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan özelliklerin ekstradaki toplam fenolik madde bileşimi (14.49-57.47 mg/g) ve flavonoid bileşimi (5.26-18.62 mg/g) ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Lipid peroksidasyon sisteminde o-semikinon

radikallerinin; rutin ve kafeik asitten oluşması bu mekanizmanın doğruluğunu kanıtlamıştır (hidrojen donörluğu ve/veya bir elektron indirgeme). Böylece, *C. officinalis* türü ekstralarının *in vivo* ve *in vitro* antioksidan aktiviteleri olduğu belirlenmiştir.

Preethi ve ark. (2006), *C. officinalis* ekstresinin *in vivo* olarak hidroksi radikallerini süpürücü; *in vitro* olarak ise lipid peroksidasyonunu inhibe edici özellikte olduğunu belirlemiştir. Ekstrenin IC₅₀ (inhibe edici konsantrasyon) değerleri 6.5 ve 100 µg/ml olarak belirlenmiştir. Lipid peroksidasyonunun 50% inhibisyonu için gerekli konsantrasyonlar sırası ile 500, 480 ve 2000 µg/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca ekstre, kültürde doza bağımlı nitrikoksit süpürücü etki de göstermiştir; IC₅₀ 575 µg/ml olarak bulunmuştur. Oral yolla alım sonrasında, makrofajlarda süperoksiti 12,6% ve 38,7% oranında inhibe ettiği belirlenmiştir. Farelere bir ay boyunca oral yolla verilmesi ile katalaz aktivitesinde, karaciğerde ve kanda glutatyon değerlerinde belirgin bir artışın olduğu görülmüştür (glutatyon redüktaz artmış, glutatyon peroksidaz azalmıştır). Bu sonuçlar sayesinde, *C.officinalis* türü ekstralarının *in vivo* ve *in vitro* antioksidan aktiviteleri olduğu kanıtlanmıştır.

2.1.2. Antiülser Aktivite

Chakurski ve ark. (1981), duodenal ve gastroduodenal ülserli hastaların *Symphytum officinalis* ve *C. officinalis* türlerinden oluşan bitki kombinasyonları ile tedavi edilebildiğini belirtmiştir. Hastaların 90%'ında hissedilen ağrıların kaybolduğu ve ülser yerinin iyileşme gösterdiği kanıtlanmıştır.

Yoshikawa ve ark. (2001), ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada *C. officinalis* çiçeklerinin metanolik ekstresi ve bütanolde çözünebilen fraksiyonundan elde edilen kalendulaglikozit A, B, C, D ve F bileşiklerini kullanmıştır. Bu maddelerin, ratlarda gastrik lezyonları inhibe ettiği belirtilmiştir.

2.1.3. Antimikrobiyal ve Antiviral Aktivite

Kalvathev ve ark. (1997), *C. officinalis* türünün kurutulmuş çiçeklerinin ekstralarının *in vitro* deney ortamında potansiyel anti-HIV aktivite göstererek HIV-1 replikasyonunu inhibe ettiğini belirtmiştir. Bu nedenle, *C. officinalis* çiçeklerinin organik ekstresinin, anti-HIV özellikleri bakımından terapötik özelliği ortaya konmuştur.

Kemper (1999), *C. officinalis* çiçeklerinin 70%'lik sulu alkollü tentürünün influenza virüsüne karşı yüksek virüsidal aktivite gösterdiği ve *Herpes simplex* türünün büyümesini fark edilir olarak baskıladığını belirlemiştir.

Sakharkar ve ark. (2000), *C. officinalis* çiçeklerinin petrol eteri ve kloroform ekstresinin *in vitro* *Staphylococcus aureus*, *S. aureus coagulase* pozitif, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. Stearothermophilus* ve *Pseudomonas aeruginosa* türlerine karşı yüksek aktivite gösterdiğini saptamıştır. Ekstrenin inhibe edici etkisinin, standart antibiyotik kullanımı ile elde edilen inhibe edici sonuca çok yakın olduğu belirtilmiştir.

Malabadi ve ark. (2005), *C. officinalis* etanollü ekstrelerinin sulu ekstrelerinden daha aktif olduğu ve en yüksek antidermatofitik aktiviteyi 0.27 mg/ml dozda deri hastalığı bulunan kişilerden izole edilen *Trichophyton rubrum* ve *T. mentragrophytes* türleri üzerinde gösterdiğini belirtmiştir.

Wiktorowska ve ark. (2009), *C. officinalis* türünden izole edilen 0,1-0,3 mg/ml konsantrasyonundaki glukuronitlere en duyarlı mantarın; inkübasyondan dört gün sonra *F. oxysporum* ve *A. brassicicola* (mantar büyümesinin inhibisyonu sırasıyla 36% ve 70%) olduğunu belirlemiştir. 0,2-0,3 mg/ml konsantrasyonundaki triterpenoidlerin, *T. viride* türünün büyümesinin inhibisyonu (47-62%) üzerinde benzer etki gösterdiği bildirilmiştir. En yüksek saponin konsantrasyonun (0.1%), en etkili konsantrasyon olduğu ve *F. oxysporum* f. sp. *callistephi*; *Botrytis cinerea*; *B. tulipae*; *Phoma narcissi* türlerinin büyümesini sırasıyla 84,4%; 69,9%; 68,6%; 57,2% inhibe ettiği belirlenmiştir. Böylece *C. officinalis* glukuronitlerinin, triterpenoidlerinin ve saponinlerinin antifungal özelliği olduğu belirlenmiştir.

2.1.4. Hepatoprotektif Aktivite

Pintea ve ark. (2003), karbontetraklorit ile muamele edilmiş sağlıklı erkek Wistar ratlara *C. officinalis* tohum yağını 7 gün süresince uygulamıştır. Ratlarda lipid peroksidasyonunun düştüğü ve süperoksit dismutaz aktivitesinin arttığı saptanmıştır. *C. officinalis* tohum yağının ise, ratlarda serum transaminazı ve alkalen fosfatazı düşürdüğü belirtilmiştir. Böylece *C. officinalis* tohum yağının hepatoprotektif özelliği ortaya konmuştur.

Rusu ve ark. (2005), *C. officinalis* çiçeklerinin sulu alkollü ekstresinin karbontetraklorürlü karaciğerdeki etkinliğini albino erkek Wistar ratlar üzerinde araştırmıştır. Çalışmanın sonucunda; enzimlerin normal değerlere döndüğü görülerek olumlu etkilerinin olduğu saptanmıştır.

2.1.5. Yara İyileştici Aktivite

Pommier ve ark. (2004), *C. officinalis* merheminin akut dermatitlerden koruyucu etkilerini ortaya koymak amacıyla meme kanseri nedeni ile operasyon geçirmiş ve operasyon sonrası radyoterapi uygulanmış hastaları rastgele seçmiştir. Calendula uygulaması sonucunda, ikinci ve daha yüksek derecedeki dermatitlerde belirgin bir düşüş olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Calendula merhemi uygulanan hastalarda radyoterapiye daha az ara verilmiştir ve radyasyonun oluşturduğu ağrılarda belirgin düzelme görüldüğü belirlenmiştir. Meme kanserinde operasyon sonrası adjuvan radyoterapi uygulanan hastalara, ikinci ve daha yüksek derecedeki akut dermatitlerden korunmak için Calendula merhemi önerildiğı belirtilmiştir.

Braun (2005), Calendula preparatının göğüs kanseri ameliyatı sonrası radyoterapi uygulanması ile oluşan akut radyasyon indüklü dermatitleri önlemede etkili olduğunu belirtmiştir.

Duran ve ark. (2005), *C. officinalis* çiçeklerinin ekstresini içeren merhemi bacaklardaki venöz ülserlere uygulamıştır. Tedavi edilen grupta tüm ülserlerin yüzey alanının 41,71%; kontrol grubunda ise 14.52% oranında azaldığı belirtilmiştir. *C. officinalis* çiçek ekstresinin uygulandığı hastalarda yara iyileşmesinde hızlanma olduğu belirlendiğinden dolayı *C. officinalis* ekstresi merheminin venöz ülserlerde epitelizasyonu sağladığı saptanmıştır.

Gopinathan ve ark. (2006), *C. officinalis* türünün yanık yaralarına karşı etkisini buzağı ve düveler üzerinde çalışmıştır. Grup 1, Calendula gliserini; Grup 2, Calendula gliserin+himaks; Grup 3, Calendula gliserin+Calendula merhemi; Grup 4, Calendula gliserin+loreksan olarak ayrılmıştır ve karşılaştırılmıştır. Calendula gliserin+loreksan kombinasyonunun, yanık yaralarını iyileştirmede etkili olduğu görülmüştür.

Leach (2008), literatürde genellikle apolar ekstraktlardan izole edilen triterpenoid alkollerin biyoaktivitesi üzerine odaklanılmasına rağmen, *C. officinalis* sulu alkollü ekstraktlarının da yara iyileştirmesi için sıklıkla kullanılan halk ilacına benzediğini belirtmiştir.

2.1.6. Antienflamatuvar Aktivite

Zitterl-Eglseer ve ark. (1997), *C. officinalis* çiçek başlarından elde edilen faradiol-3-miristik asit ester, faradiol-3-palmitik asit ester ve psi-taraksasterol bileşiklerinin fare kulağında ödemi inhibe etmeleri ile anti-ödemik aktivitelerini test etmiştir. Her iki faradiol

esterin de, doz bağımlı olarak yaklaşık aynı aktiviteyi gösterdiği belirtilmiştir. Psitaraksasterol'ün biraz daha düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Ukiya ve ark. (2006), *C. officinalis* çiçeklerinden oleanen-tip triterpen saponozitler; dört yeni bileşik olan kalendulaglikozit A-6'-0-n-metil ester, kalendulaglikozit A-6'-0-n-butil ester, kalendulaglikozit B-6'-0-n-butil ester, kalendulaglikozit C-6'-0-n-butil ester; bilinen beş flavonol glikozitleri izole etmiştir. Kalendulaglikozit A hariç bütün bileşiklerin, 0,05-0,20 mg ID₅₀ değerinde antienflamatuvar etki gösterdiği belirlenmiştir.

2.1.7. Sitotoksik ve İmmunomodulatör Aktivite

Amirghofran ve ark. (2000), *C. officinalis* çiçeklerini 70% etanolde ekstre etmiştir. *C. officinalis* çiçeklerinin insan lenfosit veya timositlerinde doğrudan mitojenik etkisinin olmadığını tespit etmiştir. Fitohemaglutinin varlığında, *C. officinalis* çiçeklerinin lenfositlerin çoğalmasında inhibitör etkisinin olduğu belirtilmiştir.

Suzuki ve ark. (2001), *C. officinalis* tohum yağından elde edilen ana yağ asitlerinin (t8,t10,c13- konjuge linoleik asit ~33.4% oranında) 163 µM'ı aşan konsantrasyonda bile fare tümör ve monositik lösemi hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olmadığını belirtmiştir.

Jimenez-Medina ve ark. (2006), *C. officinalis* çiçeklerinin lazer ile aktivite edilmiş sulu ekstresi (LACE)'nin *in vitro* sitotoksik ve immunomodulatör, *in vivo* antitümör aktivitesini araştırmıştır. LACE ekstresinin, çeşitli insan ve fare tümör hücrelerinin proliferasyonu üzerinde güçlü bir *in vitro* inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir (70-100% oranında). İnhibisyon mekanizmalarının, hücre siklusunun G0/G1 ve Kaspaz-3-indüklü apoptozis safhasında durdurma yoluyla olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda *in vitro* olarak proliferasyonun uyarıldığı ve hücrelerin aktive olduğu görülmüştür. Çalışmanın sonuçları; LACE sulu ekstresinin *in vitro* ortamda tümör hücreleri üzerinde sitotoksik aktiviteye ve lenfosit aktivasyonuna sahip olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra, ekstrenin *in vivo* koşullarda farelerin ando-2 melanoma hücrelerinde tümör büyümesini engellediği tespit edilmiştir.

Ukiya ve ark. (2006), Uluslararası Kanser Enstitüsü programı kapsamında, *C. officinalis* türünün *in vitro* koşullarda insan kanser hücreleri üzerindeki muhtemel sitotoksik etkisini incelemiştir. İnceleme sonucunda, kalendulaglikozit F6'-butilester ve kalendulaglikozitG6'-metilester triterpen saponozitlerinin kolon kanseri, lösemi ve melanomada yüksek sitotoksik etki sergilediği belirtilmiştir.

Matysik ve ark. (2008), *C. officinalis* çiçeklerinin heptan, etilasetat ve metanol ekstralarını insan deri fibroblast hücre kültürlerine ve insan meme kanser hücrelerine uygulamıştır. 25 µg/ml'nin üzerindeki konsantrasyonlardaki etil asetatlı ekstrenin mitokondriyal dehidrogenazı aktivite ederek hücre çoğalmasını ve metabolizmasını stimüle ettiği belirlenmiştir. Konsantrasyon 75 µg/ml'yi geçtiğinde ise, bu ekstrenin hücreler üzerinde toksik etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Bütün saponinlerin 400 µg dozda nontoksik ve antimutajenik olduğu belirtilmiştir.

2.1.8. Antimutajenik Aktivite

Ramos ve ark. (1990), *C. officinalis* çiçeklerinin sulu alkollü ekstresinin (0,1-1 mg/ml arasında değişen beş farklı denemede) mitotik ayrılımda doz bağımlı toksisite ve genotoksisite (hem mitozun krossing over evresinde hem de kromozomların ayrılma döneminde) gösterdiği heterozigot diploit D-30 *Aspergillus nidulus* türünde belirtilmiştir.

Elias ve ark. (1998), *C. officinalis* ve *C. arvensis* türlerinden izole edilen on üç saponin bileşiğinin mutajenik ve antimutajenik aktivitelerini Salmonella mikrozomal deneyi modifiye sıvı inkübasyon tekniğini kullanarak araştırmıştır. Antimutajenik aktiviteyi gözlemek için sigara içen kişiden örnek alınmıştır.

Perez-Carreón ve ark. (2002), *C. officinalis* çiçeğinden sulu, sulu-etanolü, etanolü, kloroformlu olmak üzere hazırlanan dört farklı ekstresinin kullanılmasıyla farelerin hem karaciğer hücrelerindeki hem de dietilnitrozamin indüklü programlanmış DNA sentezini geri döndürebilmesine dair araştırma yapmıştır. Sulu ve sulu etanolü ekstrenin düşük mg/ml konsantrasyonlarının dietilnitrozaminin etkilerine karşı koruyucu; yüksek mg/ml konsantrasyonlarının genotoksik ve hasar yapıcı olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle *C. officinalis* çiçeği ekstresinin; biyolojik olarak aktif olduğu, genotoksik ve koruyucu özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir.

2.1.9. Ağrı kesici ve Ateş Düşürücü Aktivite

Saify ve ark. (2000), *C. officinalis* yaprak ekstresini fareye iç karın zarına enjekte ettikten sonra bu ekstrenin ağrı kesici özellikler gösterdiği belirlenmiştir.

Ahmad ve ark. (2000), *C. officinalis* türünün kuru etanolik ekstresinin ratlar üzerinde belirgin bir ateş düşürücü (74,95% inhibisyon 300 mg/kg dozda) ve ağrı kesici (27,42% inhibisyon 40 mg/kg dozda) aktivite sergilediğini belirlemiştir.

Braun (2005), *C. officinalis* türünün orta kulak iltihabı ile ilişkili ağrılarda kullanımı üzerine araştırmalar yapmaktadır.

2.1.10. Diğer Etkiler

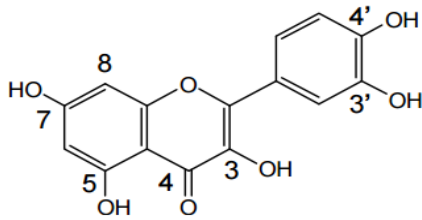
Perez-Gutierrez ve ark. (1998), *C. officinalis* türünün sulu ekstresinin kardiyovasküler sistem üzerine olan etkilerini, erkek Wistar ratlarda araştırmıştır. Bu ekstrenin 0,3; 0,5; 0,7 ve 1 mg/ml dozlarının her birinde kalp kasılmalarını 100%'e yakın oranda inhibe edici etki sergilediği belirlenmiştir.

Bashir ve ark. (2006), *C. officinalis* çiçeklerinin sulu-etanol ekstresinin izole edilen tavşan bağırsak preparatları üzerinde muhtemel spazmojenik ve spazmolitik etkilerini araştırmıştır. *C. officinalis* çiçeklerinden hazırlanan ekstrenin, belirgin atropine hassas spazmojenik etki göstermesine rağmen hiçbir spazmolitik etki göstermediği gözlenmiştir. Bu nedenle abdominal kramp ve konstipasyonlar için ticari olarak *C. officinalis* türünün kullanılabilirliği ileri sürülmektedir.

2.2. *C. officinalis* ve *C. arvensis* Türlerinde Sekonder Metabolitlerin Yapısı ve Biyolojik Aktiviteleri

2.2.1. Kuersetin

Kuersetin, (3,3',4',5,7-pentahidroksflavon) olarak adlandırılır. Flavonoidlerin flavon grubuna ait olan hardal sarısı renkte sekonder metabolittir. Yapısında 3, 3', 4' ve 5, 7 pozisyonlarında –OH grubu bağlıdır. Moleküler formülü $C_{15}H_{10}O_7$ 'dir. Yapısal formülü Şekil 2.1'deki gibidir (Cui, 2014). Genellikle birçok bitkide farklı flavonoidlerle birlikte bulunur (Ergüzel, 2006). Moleküler ağırlığı 302,24 g/mol olan bileşiktir. Kimyasal ismi: 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one'dir.



Şekil 2.1. Kuersetin

Kuersetin birçok etnik bitkide bulunan bir pigmenttir. Özellikle soğan ve çayda bulunmaktadır. Bu nedenle günlük olarak yeterli miktarda tüketilebilmektedir (Manach ve ark., 2005). İnsanların günlük diyetinde bulunmaktadır (Ferry ve ark., 1996). Kuersetin temel bir flavanoiddir ve insanların beslenmesinin önemli bir parçasını oluşturur. Hollanda'da kuersetin bileşiğinin beslenme sırasında ortalama günlük alım miktarının

23mg olduğu kanıtlanmıştır (Zhang ve ark., 2012). Kuersetin'in antioksidan, antikanser, nörolojik etkisi (nöroprotektif, nörotoksik), antimikrobiyal, anti-enflamatuvar, antiviral, karaciğeri ve kardiyovasküler sistemi koruyucu, anti-obezite ajanı ve daha birçok biyolojik aktivitesinin olduğu bilinmektedir (Dajas, 2012).

Kuersetin, antioksidan özellikleri olan bir sekonder metabolittir. Etkili bir serbest radikal temizleyicisi olduğu belirtilmiştir (Ferry ve ark., 1996). Antioksidan aktivitesi kapsamında reaktif oksijen türlerini temizleme yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir (Boots ve Haenen, 2008). Vücuttaki hücreleri serbest radikallerin zararlarından da korumaktadır (Ergüzel, 2006). *In vitro* çalışmalarda kuersetin bileşiğinin antioksidan aktivitesi, hidrojen peroksit ortamında kültüre edilen sıçan gözünün lensinde oksidatif stresin neden olduğu kataraktı inhibe edebilme yeteneğine sahip olmasını sağladığı bildirilmiştir (Stefek ve Karasu, 2011). Ayrıca kuersetin'in insan sperm hücrelerinde lipid peroksidasyonunu uyaran tert-butylhydroperoxide'i *in vitro* inhibe edici etkisinin olduğu belirtilmiştir (Moretti ve ark., 2012). Bir diğer çalışmada 25-50 mg/kg doz kuersetin'in sıçanlarda streptozotosin uyarımlı diyabetin neden olduğu oksidatif strese karşı antioksidant özlellik gösterdiği belirlenmiştir (Maciel ve ark., 2013). Ayrıca kuersetin'in 250 ppm dozundaki polietilende etkili bir antioksidant ve stabilizatör olduğu belirlenmiştir (Tátraaljai ve ark., 2014). Kötü kolesterolün okside olmasını önleyebilir ve hücrelerin kansere dönüşmesini geciktirebilir. Kolesterolü, kalp hastalıkları ve akciğer kanserine yakalanma oranını düşürdüğü bilinmektedir. Hem akciğerleri hem de solunum yollarını kirli havanın ve sigaranın olumsuz etkilerinden koruduğu belirlenmiştir. (Ergüzel, 2006). Kuersetin; karaciğer yaralanmasında geleneksel olarak tedavi için kullanılan bitki esaslı bir antioksidanttır (Cui ve ark., 2014). Astım hastalıklarının ve alerjinin tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Ergüzel, 2006).

Nörolojik etkisi kapsamında nöroprotektif ve nörotoksik olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle balık yağı ile kombine olarak kullanıldığında fare beyinde nöroprotektör olarak davrandığı bildirilmiştir (Joseph ve Muralidhara, 2013). Asetilkolinesteraza karşı inhibe edici etki gösteren nörodejeneratif hastalıklara (Alzheimer) karşı yararlı etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Choi ve ark., 2012). Ayrıca kuersetin'in sıçanların nöronlarında 6-hidroksidopamin ile uyarılan oksidatif stresi azalttığı belirtilmektedir (Haleagrahara ve ark., 2013). Sağlıklı P19 nöronları üzerinde bir çalışmada quercetin muamelesinin nöron yaşamını etkilemediği fakat hücreler arası glutatyon içeriklerindeki bir azalma durumunda sinir sisteminin çalışmasını etkileyebileceği belirtilmiştir (Jazvinscak ve ark., 2012).

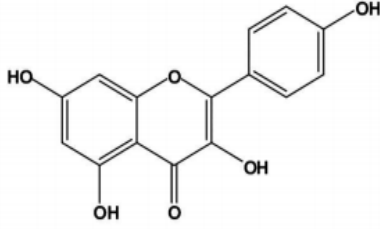
Kuersetin bileşiminin antiviral aktivitesi kapsamında çeşitli virüslere karşı etkili olduğu belirlenmiştir. İnsan T-lenfotropik virüsü 1'in neden olduğu MT-2 hücrelerinin gelişmesine karşı potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (Coelho-Dos-Reis ve ark., 2011). IC50 = 212.1 µg/mL ile kuersetin'in düşük antiviral aktivitesinin Japanese encephalitis olarak bilinen sivrisinek yoluyla bulaşan bir hastalıktan sorumlu olan anti-Japanese encephalitis virus (JEV)'üne karşı etkili olduğu belirtilmiştir (Johari ve ark., 2012). Fakat kuersetin'in dengue virus tip-2'ye karşı yüksek bir antiviral etkisi olduğu bildirilmiştir (Zandi ve ark., 2011). Lesithin formülasyonlarının katıldığı kuersetin'in Afrika yeşil maymununun Vero hücrelerini üzerinde *in vitro* antiviral aktivitesi gösterdiği kanıtlanmıştır (Ramadan ve Selim, 2009). Ayrıca non-structural protein-3 proteaz aktivitesini inhibe ederek hepatitis C virüsünü baskıladığı belirlenmiştir (Bachmetov ve ark., 2012). *In vivo* çalışmalar süresince kuersetin-3-O-β-D-glukuronit'in influenza-A virüsüne karşı etkili olduğu (Fan ve ark., 2011), kuersetin-7- ramnosit'in domuz ishal virüsüne karşı etkili olduğu belirtilmiştir (Song ve ark., 2011). Klinik denemelerde (faz-1), kuersetin bileşiminin antitümör terapötik potansiyeli olduğu belirtilen tirozin kinaz üzerinde inhibe edici etkisinin olduğu belirtilmiştir (Jan ve ark., 2010). Bunun yanı sıra çeşitli türevlerinin lethal virüslerin neden olduğu hastalıkların tedavisi amacıyla ilaç geliştirmek amacıyla kullanıldığı da bildirilmiştir (Maalik ve ark., 2014).

Son zamanlarda yeni ve etkili olan yiyecek ya da tıbbi ilaçların geliştirilmesinde önde gelen bir bileşik olması sağlık açısından önemli yararları kapsamında kuersetin bileşiği dikkati çekmektedir (Zhang ve ark., 2012; D'Archivio ve ark., 2010). Fakat kuersetin bileşiminin daha düşük biyoyararlanımına sahip olduğu bilinen kimyasal yapısı nedeniyle çözünürlüğü düşüktür (Cui ve ark., 2014) ve kuersetinin sadece yenen küçük bir yüzdesi dolaşıma emilmektedir (D'Archivio ve ark., 2010). Bu nedenle muhtemel uygulamalar için kuersetinin suda çözünür türevlerini geliştirmek önemlidir. Bunun için kimyasal modifikasyon yoluyla canlıların yararlanımını geliştirmek için çeşitli denemeler yapılmaktadır (Needs ve Kroon, 2006)

Cui ve ark (2014), elde ettiği sonuçlar ve histopatolojik gözlemler sonucu kuersetin sülfasyonunun farelerde kuersetinin hepatoprotektif etkilerini ve absorpsiyonunu arttırdığını belirtmiştir. Kuersetin-5',8-disülfonat molekülünün karaciğer hastalıkları için kemopreventif ve kemoterapötik bir ajan potansiyeline sahip olduğu anlaşılmıştır.

2.2.2. Kaemferol

Kaemferol, meyve ve sebzelerde bulunan polifenol bir flavonoidtir. Tıbbi ve nutrasötik aktivitelere sahip olan doğal bitki ürünüdür. Kaemferol düşük moleküler ağırlığa (MW: 286,24 g/mol) sahiptir. Kimyasal ismi 3,5,7-Trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one olan yeşil bir bileşiktir (Şekil 2.2). Kemferol genellikle bitki türevli yiyeceklerde ve geleneksel tıpta kullanılan bitkilerde bulunmaktadır (Calderón-Montaño ve ark., 2011).



Şekil 2.2. Kaemferol

Yapılan araştırmalarda kaempferolün kanseri, arteriosklerozisi, kardiyovasküler bozuklukları azalttığı; anti-oksidant ve anti-inflammatör gibi aktivitelere sahip olduğu belirtilmiştir (Lau, 2008).

Süperoksit temizleyicisi olarak antioksidan olduğu belirlenmiştir (Wang ve ark., 2006). Hücre içi ROS (reaktif oksijen türleri) birikimini azalttığı ve *Caenorhabditis elegans* türünün canlılığını arttırdığı belirlenmiştir (Kampkotter ve ark., 2007).

Birçok çalışma besin olarak alınan kaemferol'ün kronik hastalıkları ve özellikle kanseri azalttığına işaret etmektedir (Chen ve Chen, 2013; Lin ve ark., 2013). Epidemiyolojik çalışmalar insanların kaemferol içeren yiyecekleri yemesi ile kanser ile kalp-damar hastalıklarının gelişiminin azalması arasında pozitif bir bağlantı olduğunu belirtmektedir (de Pascual-Teresa ve ark., 2010; Lin ve ark., 2013). Akciğer kanserinde kaemferolce zengin yiyeceklerin tüketiminin (yaklaşık 2 mg kaempferol/gün) akciğer kanseri riskiyle ters olarak bağlantılı olduğu bulunmuştur (Cui ve ark., 2008). Kaemferol içeren yiyeceklerin tüketiminin azalan gastrit kanseri (Garcia-Closas ve ark., 1999) ve pankreas kanseri (Nothlings ve ark., 2007) riskiyle ters olarak bağlantılı olduğu; koroner kalp hastalıklarından ölüm oranını azalttığı belirlenmiştir (Hertog ve ark., 1993). Kaemferol açısından zengin gıdalarla beslenmenin (yaklaşık 11 mg kaempferol/gün alımı) epitelyal ovaryum kanseri riskini 40% azalttığı bulunmuştur (Gates ve ark., 2007). Kaemferol, kanser gelişimini teşvik eden serbest radikallere karşı vücudun antioksidan

sistemini arttırarak yardımcı olabilir. Moleküler seviyede; kaemferolün apoptozis, angiogenesis, inflammasyon, metastaz ile bağlantılı hücrel sinyal iletiminde bir grup anahtar elementi düzenlediği bildirilmiştir. Özellikle kaemferol kanser hücre gelişimini ve anjiojenesisi inhibe etmektedir ve kanser hücre apaoptozisini uyarmaktadır. Diğer yandan kaemferolün koruyucu etkisini ortaya çıkaran bazı araştırmalarda normal hücre canlılığını koruduğu görülmüştür (Chen ve Chen, 2013). İnsan dil skuamoz hücreli karsinom SCC4 hücrelerinde anti-metastatik etkilere sahiptir, böylece kaemferolün ağız kanseri riskinden korunmada önemli olduğu belirtilmiştir (Lin ve ark., 2013).

Diğer flavonoidler gibi kaempferol de antienflamatuvar aktiviteye sahiptir. *In vitro* ve *in vivo* olarak yapılan birçok çalışmada kaempferol'ün, kaempferol glikozitleri'nin antienflamatuvar aktivitesinin olduğu belirtilmektedir. Kaempferol bileşiğinin uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) proteinini, mRNA ekspresyonunu ve doz bağımlı durumda nitrik oksit (NO) üretimini inhibe ettiği görülmüştür. iNOS için önemli bir transkripsiyon faktörü olan nüklear aktivasyon faktörü- κ B (NF- κ B)'yi inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca sinyal iletiminin aktivasyonunu ve transkripsiyon 1 aktivatörünü (STAT-1) inhibe etmektedir. Belirtilen çalışmada aktive edilen makrofajlarda kaemferolün iNOS ekspresyonu ve NO üretimi üzerine olan etkisi ve mekanizması belirtilmiştir. Böylece antienflamatuvar bileşikler olarak kaemferolün tıbbi aktivitesi açıklanmıştır (Hämäläinen ve ark., 2007).

Kaemferol bileşiğinin, osteoblastik aktiviteyi düzenlediği bildirilmiştir. Böylece osteoporozisin tedavisi için yeni bir tıbbi araç olarak karşımıza çıkmaktadır (Prouillet ve ark., 2004). Kaemferolün miyokardiyal iskemi/reperfüzyonu olan sıçanlarda antioksidan aktivitesi ve GSK-3 β aktivitesinin inhibisyonu sayesinde kalbin korunmasının sağlandığı belirlenmiştir (Zhou ve ark., 2015).

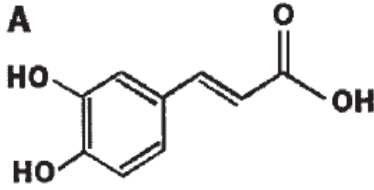
Kaemferol bileşiğinin herpes simplex virus (Amoros ve ark., 1992; Lyu ve ark., 2005), cytomegalovirus (Mitrocotsa ve ark., 2000), influenza virus (Jeong ve ark., 2009) ve human immunodeficiency virus (HIV)'e (Mahmood ve ark., 1996; Min ve ark., 2001) karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir.

Kaemferol, antiprotozoal ajan olarak tanımlanmıştır (Barbosa ve ark., 2007; Calzada, 2005; Calzada ve ark., 1999; Meckes ve ark., 1999). Ayrıca kaempferol *Leishmania* spp. türüne karşı ve (Marin ve ark., 2009; Muzitano ve ark., 2006) ishale neden olduğu bilinen *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* türlerine (Calzada ve ark., 1999) karşı aktivite göstermektedir. Ayrıca kaempferolün anti giardial aktivitesi *Giardia lamblia* ile enfekte olan dişi CD-1 sıçanlarında *in vivo* olarak gözlenmiştir (Barbosa ve ark., 2007).

Kuersetin ve kaemferol bileşiklerinin tiroid hormonlarının taşınmasını, metabolizmasını ve çalışmasını etkilediği belirtilmektedir (Petkov ve ark., 1981). Flavonollerin endotel hücrelerin adenzin deaminaz aktivitesini inhibe ettiği; flavonların ise inaktive ettiği saptanmıştır (Nagai ve ark., 1992).

2.2.3. Kafeik Asit

Kafeik asit çoğunlukla kahve, zeytinyağı, meyve ve sebzelerde bulunan fenolik asittir. (Shahidi ve Nacz, 1995). Moleküler formülü $C_9H_8O_4$, Kimyasal ismi: 3,4-Dihidrokinamik asit, moleküler ağırlığı 180.16 g/mol olan bileşiktir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kafeik asit

Kafeik asit; antioksidant (Vieira ve ark., 1998), antitümör (Tanaka ve ark., 1993), antienflamatuvar (Fernandez ve ark., 1998) aktivitesine ve HIV replikasyonunu inhibe etme özelliğine (Kashiwada ve ark., 1995; Fesen ve ark., 1993) sahiptir.

Kafeik asit'in UVC indüklü sitotoksiteden insan KF1 diploid fibroblastını ve A431 epidermoid karsinoma hücre hatlarını koruduğu bilinmektedir (Neradil ve ark., 2003).

Fare derisinde UVB (280–320 nm) radyasyonu indüklü IL-10 ekspresyonunu ve mitojen-aktive edilen protein kinaz (MAPKs)'ların aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Staniforth ve ark., 2006). Ayrıca 2500 mikromolar konsantrasyondaki kafeik asit'in HT29 kolon kanser hücrelerinin büyümesini 50% inhibe ettiği belirtilmiştir. Böylece kolon kanser hücrelerinde kafeik asit'in apoptozis özelliği kanıtlanmıştır (Rao ve ark., 1992). HCT15 kolon kanseri hücrelerine karşı kafeik asit'in antiproliferatif özelliği ortaya konmuştur. Kolon kanserinden korunmada kemopreventif aday olarak gösterilmiştir (Jaganathan, 2011).

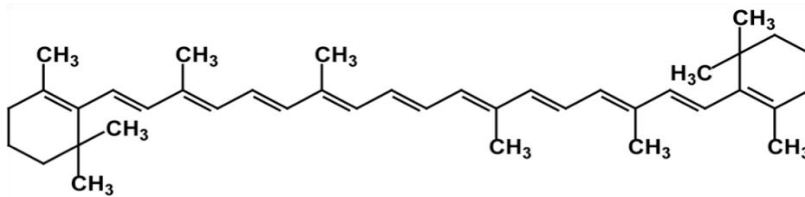
Diyabetik fare böbreğinde kafeik asit'in koruyucu etkisi araştırılmıştır. Farelerin diyetine kafeik asit ilavesinin diyabetik böbrek hastalıklarının önlenmesinde ve

azaltılmasında yardımcı olabileceği belirtilmiştir. Böylece antienflamatuvar etkisine işaret edilmiştir (Chao ve ark., 2010).

MCF-7 hücrelerinde TAM (Tamoksifen) sitotoksitesi üzerine birçok bitkide bulunan ve kafeik asit'in esterifikasyonu ile elde edilen (Nagaoka ve ark., 2002) bileşik olan kafeik fenilettil ester (CAPE)'in etkisinin araştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Tamoksifen, göğüs kanserini tedavi etmek için geniş çapta kullanılan ilaçtır. Fakat tamoksifen ile uzun süreli tedaviden sonra birçok kişinin hastalığının tekrar nüksettiği görülmektedir. Yapılan çalışmada MCF-7 hücreleri tamoksifen ve kafeik fenilettil ester'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat süresince muamele edilmiştir. Çalışmanın sonucunda kafeik fenilettil ester'in tamoksifen sitotoksitesini arttırdığı görülmüştür. Direncin ve düşük toksisitenin üstesinden gelebilen göğüs kanseri tedavisi için yeni bir terapötik yaklaşım olarak kafeik fenilettil ester belirtilmiştir (Motawi ve ark., 2015).

2.2.4. Beta karoten

Doğada 750'den fazla karotenoid izole edilmiştir (Ranawat ve Merillon, 2013). Fakat bunlardan sadece 40 karotenoid insan vücudunda absorbe ve metabolize edilerek kullanılabilir (Britton ve Khachik, 2009). Karotenoidler tetraterpenoidler grubundadır; bitki ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilir. Ayrıca birçok hayvan türünde de bulunabilir ve kuşlarda, böceklerde, balıklarda, eklem bacaklı kabuklularda önemli renlendiricilerdir (Britton, 1995; Olson ve Krinsky, 1995). Beta karoten karotenoidlerin en çok bilinenidir (Olson ve Krinsky, 1995; Woutersen ve ark., 1999; Het Hof ve ark., 2000). Karotenoidler arasında insan vücudunda en bol bulunanıdır (Krinsky ve Johnson, 2005). Moleküler formülü $C_{40}H_{56}$ (Şekil 2.4), kimyasal ismi 1,3,3-Trimetil-2-[(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17E)-3,7,12,16-tetrametil-18-(2,6,6-trimetilsikloheksan-1-yl)oktadeka-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaenyl]sikloheksan, moleküler ağırlığı 536.88 g/mol olan lipofilik bir bileşiktir (Arnum, 2000).



Şekil 2.4. Beta karoten

Beta karoten yoğun kırmızı-turuncu renklidir ve birçok bitki türünde çok renkli renklenmeden sorumludur; ayrıca ticari olarak yiyecek renklendirme de kullanılabilir. Tahıllarda, baklagillerde ve hayvansal gıdalarda (balık, kabuklu deniz hayvanları, yumurta sarısı) bulunmaktadır. Hint yer elması (tatlı patates), balkabağı, havuç, yeşil biber gibi birçok yiyecek bu bileşiği içermektedir (http://www.ankalab.com/fileadmin/standortseiten/synlab_tr/pdf/A_vitamini_ve_karotenler.pdf, Haziran 2016). Karotenoidler, klorofilde bulunmaktadır ve tuttuğu ışığı klorofile aktarmaktadır. Bu şekilde fotosenteze katkıda bulunduğu belirtilmektedir (Cerullo ve ark., 2002).

Bera karoten, insan fizyolojisi üzerine etkileri bakımından az sayıda çalışılan gıda karotenoidlerinin yüzlercesinden biridir. Meyve ve sebzelerde provitamin A (A vitamini)'nin en çok bulunan formudur. Diğer karotenoidlerle karşılaştırıldığında daha yüksek provitamin A aktivitesi bulunmaktadır (Krinsky ve Johnson, 2005) ve genellikle güvenlidir (Olson, 1994; Ross, 1999).

Bazı medikal yararları belirlenmiştir. Eritropoietik protoporfiri'de tedavide yardımcı olarak etkili olduğu; yaşa bağımlı makular dejenerasyon riskini; menapoz öncesi kadınlarda göğüs kanseri riskini azaltmada kullanıldığı belirlenmiştir (Gandini ve ark., 2000; Seddon ve ark., 1994; Thomsen ve ark., 1979).

Beta karoten bileşiğinin; düşük kısmi oksijen basıncında immun düzenleyici, tekil oksijen giderici ve peroksi serbest radikal reaksiyonlarını inhibe etmek gibi kimyasal özellikleri belirlenmiştir (Sies and Stahl, 1995; Wang ve ark., 1999). Ayrıca GAP bağlantıları aracılığıyla normal hücre-hücre iletimini arttırdığı (Edes ve ark., 1989; Acevedo and Bertram, 1995).; karsinojenleri detoksifiye eden hepatik enzimleri uyardığı belirtilmiştir (Edes ve ark., 1989). Birçok karsinojen gap bağlantılarının iletişimini inhibe ettiği için (Gregus and Klaassen 1996), kansere karşı korunmada diyet ile alınan maddeler sayesinde bu aktivitenin korunması önemli bir fonksiyon olabilmektedir.

Karotenoid bakımından zengin meyve ve sebzelerin alımının kardiyovasküler hastalık riskiyle ters orantılı olarak ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Tavani ve La Vecchia, 1999). Epidemiyolojik çalışmalar beta karoten'in yüksek miktarlardaki alınımının kanser ve kalp hastalıkları gibi çeşitli hastalıkların riskini azalttığını göstermiştir (Van Poppel ve Goldbohm, 1995; Ziegler ve ark., 1996). Birçok hayvan ve laboratuvar çalışması; tümör hücre büyümesini ve karsinogenezin gelişimini inhibe etme özelliği olduğunu göstermiştir.

Sigara içen kişilerde beta karoten'in yüksek dozlarda alınmasının akciğer kanseri riskini arttırdığı belirtilmiştir (Misotti ve Gnagnarella, 2013). Bu etkinin nedeni olarak tütün içimi durumunda beta karoten bileşiğinin kararsızlığı-dayanıksızlığı nedeniyle bu bileşiğin karsinojenik metabolitlere degradasyonuna neden olduğu hipotezi ileri sürülmektedir (Russell, 2002). Beta karoten'in yüksek dozlardaki alınımın, özellikle sigara içme durumunda, histopatolojik değişiklikler tarafından gösterildiği üzere akciğer kanseri riskini arttırdığı ortaya konmuştur (Liu ve ark., 2000; Wolf, 2002). Fakat beta karoten'in korunan formlarla yürütüldüğü denemelerde akciğerlerde histopatolojik değişiklikler göstermediği belirlenmiştir (Kim ve ark., 2006; Fuster ve ark., 2008). 2012 yılında, the European Food Safety Authority (EFSA) çok sigara içenlerde beta karotene tüketimi ve kanser artışı arasında olası bir bağlantıyı belirtmiştir. Kanser riskine karşı beta karoten takviyesi ile ilgili koruma eksikliği olduğu ortaya konulmuştur (Druesne-Pecollo ve ark., 2010). Beta karoten'in (25 mg/gün) etkisinin klinik bir denemesinde, sigara içmeyen ve alkol tüketmeyen kişilerde nükseden kolorektal adenoma riskini azalttığını; fakat sigara içen ve alkol tüketenlerde bu riski arttırdığı belirtilmiştir. Böylece beta karoten'in sigara içen ve içmeyenler üzerinde farklı etkilere sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Baron ve ark., 2003).

2.3. Asteracea Familyasındaki Bitkiler ile İlgili Bitki Doku Kültürü Çalışmaları

Grezelak ve Janiszowska (2002), *C. officinalis* kotiledon eksplantlarından elde ettiği kalluslar ile 0.4mg/l 2,4-D+0.4mg/l Kin ve 0.1mg/l 2,4-D+0.5mg/l 2iP eklenen MS besin ortamlarında hücre süspansiyon kültürlerine karanlık ve aydınlık koşullarda devam etmiştir. 0.1mg/l 2,4-D+0.5mg/l 2ip eklenen MS besin ortamında 0.4mg/l 2,4-D+0.4mg/l Kin eklenenlerinkine nazaran daha kompakt ve daha büyük kümeler (kütleler) oluşturduğu, hücre dağılımının ise daha düşük olduğu saptanmıştır. 0.1mg/l 2,4-D+0.5mg/l 2ip kültüründe aydınlık koşullarda maksimum agregat çapına (35mm); karanlık koşullarda ise daha az agregat çapına (10mm) ulaştığı belirlenmiştir.. Her iki kültürde de aydınlık koşulların hücre kümelenmesini arttırdığı belirtilmiştir. 0.4mg/l 2,4-D+0.4mg/l Kin kültüründe ise daha az agregat çapının olduğu saptanmıştır. Üç ay boyunca, besin ortamlarında oluşan kültürlerde hem dağılan hücrelerin artan miktarının ve hem de büyük agregatların artan boyutunun gözlemlendiği ortaya konmuştur. 0.4mg/l 2,4-D+0.4mg/l Kin kültüründe, aydınlık koşullar altında büyük kırılğan agregatların 5mm çapına ulaştığı, karanlık koşullar altında ise agregatların görünmediği belirtilmiştir.

Bertoni ve ark. (2006), *C. officinalis* mikroçoğaltımını tohumdan itibaren gerçekleştirilmiştir. Böylece çiçek boyutu, rengi ve kimyasal niteliği farklılık gösteren

bitkilerin mikroçoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Eksplantlar, kapituladan alınmıştır. 0,5 mg/l :6,0 mg/l Kinetin:Phytigel™ eklenen besin ortamı sürgün uzamasını arttırırken; 1,0:6,0 mg/l BAP:Phytigel ilave edilen kültür ortamının ise kökün uzamasını arttırdığı belirtilmiştir. 1,0 mg/l IBA ilave edilen ½ MS ortamında kültüre alınan bitkiciklerin köklendirildiği belirtilmiştir.

Arya ve ark. (2008), *Pluchea lanceolata* (Asteraceae) türünün yaprak eksplantlarından kallus uyarımı amacıyla oksinlerin (NAA, IAA, IBA, 2,4-D) tek olarak ya da sitokininler (BAP, Kin) ile kombine olarak eklendiği MS besin ortamında kültüre almıştır. Denenen oksinler arasında NAA'nın yeşil, hızlı büyüyen ve kırılğan özellikte kallus oluşturmak için en iyi oksin olduğu belirlenmiştir. 1mg/l IAA+IBA olan en uygun konsantrasyonun eklendiği MS besin ortamından kahverengi, yavaş büyüyen ve kallus gelişiminin meydana geldiği saptanmıştır. NAA'nın optimum konsantrasyonu (1mg/l), BAP (0.25-2mg/l) ya da Kin (0.25-2mg/l) ile kombine edildiğinde 0.5mg/l BAP konsantrasyonunun kallus uyarımı için en uygun olduğu ortaya konmuştur.

Leal ve ark. (2009), *C. arvensis* türünde bulunan çeşitli sekonder metabolitleri elde etmek için bitkinin nodal segmentlerinin *in vitro* kültürlerinden kallus ve rejenere olan bitkicikleri elde etmişlerdir. Çalışmada bitki büyüme düzenleyicilerinin eklenmediği MS0, iki sitokinin konsantrasyonun (1-2 mg/l) eklendiği, sitokinin:oksin kombinasyonunun (1:0.1 mg/l BAP:NAA; 2:0.1 BAP:NAA) eklenen besin ortamlarının etkileri değerlendirilmiştir. Kallus oluşumunun, organogenesis ile eş zamanlı olarak *in vitro* kültürden 4 hafta sonra gözleendiği ve çiçek uyarımının elde edildiği belirtilmiştir. Sürgün sayısının kültür ortamından etkilenmediği belirlenmiştir.

Singh ve Chaturvedi. (2012), *Spilanthes acmella* türünün yaprak eksplantlarını çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin eklendiği yarı-katı MS besin ortamında kallus uyarımı amacıyla inkübe etmiştir. 5µM BAP+1µM 2,4-D+1µM NAA eklenen MS besin ortamından maksimum kallus gelişiminin meydana geldiği belirtilmiştir. 2 hafta sonra, eksplantlardan kırılğan ve açık kahverengi özellikte kallus gelişiminin başladığı saptanmıştır. Gelişen kallusların, devam eden alt kültürler ile arttığı fakat 5 hafta aralıkla yapılan 2 alt kültür boyunca kahverengi özellikte kaldığı tespit edilmiştir. Kültürün 11. haftasında, açık yeşil ve kırılğan özellikte farklılaşmamış kallus elde edildiği ortaya konmuştur. Belirtilen bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonu ile hücre süspansiyon kültürleri oluşturulmuştur. Elde edilen yaş ve kuru kallus ağırlığına göre, en iyi çalkalama hızının 120 rpm olduğu belirlenmiştir. Ölüm fazı boyunca, ortamın ph'ının artmaya devam

ettiği ortaya konmuştur. Kullanılan karbon kaynakları arasında, spilantol bileşiğinin maksimum miktarının sükröz eklenen ortamda; bunu takiben glukoz eklenen besin ortamında 56.8µg/g kuru ağırlıkta saptandığı belirtilmiştir. Spilantol bileşiğinin, fruktoz eklenen besin ortamında saptanmadığı belirlenmiştir. Kültürün 6.gününden 21.gününe kadar ph'ın arttığı, sonrasında kültürün son günlerine kadar (24.gün) ph'ın sabit olduğu belirtilmiştir. Ph'taki artışın nedeni olarak intrasellüler maddelerin ortaya salınmış olabileceği gösterilmiştir.

Victorio ve ark. (2012), kök ve sürgün çoğalmasını sağlamak için *C. officinalis* fidelerinin segmentlerini kullanarak doku kültürü için bir yöntem uygulamıştır. Farklı tipteki eksplantların (bazal, aradaki, apikal) etkisini doğrulamak için NH₄NO₃ ve KNO₃'ün konsantrasyonlarının yarısının azaltıldığı MS ortamı kullanılmıştır. MS ortamında agar yerine sahil kumu konulmuştur. *In vitro* bitki gelişimi üzerine oksin ve sitokin (TDZ; BAP; IAA; IBA; NAA) etkisi incelenmiştir. Katı ortamların *C. officinalis* kültürleri için daha uygun olduğunu belirtmektedirler. Sonuçlar, apikal eksplantlardan belirgin bir köklenmeyi göstermiştir. Bu eksplantlardan gelişen köklerin daha çok uzadığı ve yaprakların sayısının daha çok olduğu gözlenmiştir. Kök gelişimi diğer muameleler ile karşılaştırıldığında, TDZ ve BAP'ın etkisinden daha iyi sonuç veren sitokine bağımlı olduğu belirtilmiştir. Bitkilerin TDZ içeren ortamda rejenere olduğu belirtilmiştir. En yüksek köklenme oranı (80%) IAA 0,1 mg/l'den elde edildiği belirtilmiştir.

Torbaghan (2012), 6 farklı tuzluluk düzeyi ve tıbbi nergis fidelerinin 3 tipini (karenat, alat, orbikular) kullanarak tuzluluk stresinin bitki üzerinde gösterdiği etkiyi incelemiştir. Deney sonucunda, artan tuzluluk ile çimlenme yüzdesi ve oranının arttığı belirlenmiştir. Karenat tipi fidenin, tüm tuzluluk düzeylerinde diğer iki tip tıbbi nergis fidelerinden daha fazla çimlenme oranına sahip olduğu belirtilmiştir. Alat tipi fidenin, düşük tuzluluk düzeylerinde (0,1 ve 3 dS/m) orbikulardan daha fazla çimlenme düzeyine sahip olduğu gösterilmiştir. Tuzluluğun, kökçük ve plumula uzunluğunu her 3 tip fidede de azalttığı belirlenmiştir. Tuzluluk stresine maksimum duyarlılık, orbikular tıbbi nergis fidelerinde belirlenmiştir.

Miri ve ark. (2013), çimlenme üzerine 2, 3, 4 ml konsantrasyonlarda biyolojik gübre olarak Nitragin ve kontrol olarak distile su ile tohum inokülasyonunun etkisi ve tıbbi nergisin erken büyümesi çalışılmıştır. Sonuçlar kontrolle kıyaslandığında, 3 cc ile inoküle edilen tıbbi nergis fidelerinde kök uzunluğunun 56% arttığı ortaya konulmuştur. 2 cc Nitragin ile ekimden önce, tıbbi nergis fidelerinin inokülasyonu, kök uzunluğunda 56%

artış gösterdiği belirlenmiştir. Kontrolle kıyaslandığında, 2cc ile muamele edilen fide uzunluğunun 136mm'ye kadar ve kök/sürgün oranının 1.9% arttığı belirlenmiştir. 3cc Nitragin ile inoküle edildiğinde, fide ağırlığının 5.25 gram arttığı belirlenmiştir. Tıbbi nergis çiçeği üreticileri, Nitragin ile inoküle edilen tohumlar ile tıbbi nergis çiçeğinin çimlenmesini ve erken büyümesini geliştirebileceğini belirtmiştir.

Çetin ve ark. (2015), *C. officinalis* türünün farklı eksplantlarını (hipokotil, kotiledon, kotiledon nod) kallus gelişimi amacıyla farklı konsantrasyonlarda sitokin (BAP; 1mg/l, 2mg/l) ve oksin (IBA; 0.1mg/l, 0.5mg/l) eklenen MS besin ortamlarında inkübe etmiştir. Sekiz haftanın sonunda, 1mg/l BAP+0.5mg/l IBA ve 2mg/l BAP+0.5mg/l IBA eklenen MS besin ortamında inkübe edilen hipokotil ve kotiledon eksplantından sırasıyla %100 ve %88; 2mg/l BAP+0.1mg/l IBA eklenen MS besin ortamında inkübe edilen kotiledon nod eksplantından ise %100 kallus gelişiminin meydana geldiği en iyi sonuçlar olarak belirtilmiştir. Hipokotil eksplantlarının farklı besin ortamlarında inkübe edilmesi sonucu gelişen kallusun rengi ve dokusu bakımından farklılık gösterdiği belirtilmiştir. 1mg/l BAP eklenen MS besin ortamında inkübe edilen hipokotil eksplantından yeşilimsi kahverengi ve sert yapıda; 1mg/l BAP+0.1mg/l IBA eklenen MS besin ortamında inkübe edilen hipokotil eksplantından ise kahverengi, yeşil ve sarı renkli kırılğan yapıda kallus gelişiminin meydana geldiği saptanmıştır. 1mg/l BAP+0.5mg/l IBA eklenen MS besin ortamında inkübe edilen hipokotil eksplantından kahverengi sert ve kırılğan yapıda; 2mg/l BAP+0.1mg/l IBA ve 2mg/l BAP+0.5mg/l IBA eklenen MS besin ortamında inkübe edilen hipokotil eksplantından kahverengi ve yumuşak kallus gelişiminin olduğu gözlenmiştir. 2mg/l BAP eklenen MS besin ortamında inkübe edilen hipokotil eksplantından ise kallus gelişiminin meydana gelmediği belirtilmiştir.

Dakshayini ve ark. (2016), *Cichorium intybus* (Asteraceae) türünün yaprak eksplantlarının aktarıldığı 1.5mg/l NAA+ 0.25mg/l BAP eklenen MS besin ortamından en iyi kallus biyokütlesinin (27.65±0.850g) ve yeşilimsi kırılğan özellikte kallusun elde edildiğini belirtmiştir. 0.5mg/l NAA+ 0.25mg/l BAP eklenen MS besin ortamından ise, en az kallus biyokütlesinin (4.2±0.473g) ve yeşilimsi beyaz özellikte kallus elde edildiği saptanmıştır.

Dwivedi ve ark. (2016), *Stevia rebaudiana* türünün yaprak eksplantlarını farklı konsantrasyonlardaki oksin (NAA, 2,4-D) ve sitokin (BAP, Kin) kombinasyonlarının eklendiği MS besin ortamlarında kallus kültürüne almıştır. Denenen oksin:sitokin kombinasyonları arasında en iyi kallus gelişiminin (%94 0.061) ve koyu yeşil, kırılğan

özelliğinde kallusun 4mg/l NAA+3mg/l BAP eklenen MS besin ortamından elde edildiği belirtilmiştir. 2mg/l NAA+2mg/l BAP ve 3mg/l NAA+3mg/l BAP eklenen MS besin ortamlarından sırasıyla 35.6% oranla beyaz, kırılğan ve 77.8% koyu yeşil, kırılğan özelliğinde kallus gelişiminin meydana geldiği saptanmıştır. BAP ya da NAA, 2,4-D ya da Ki ile kombine edilerek eklenen MS besin ortamından kompakt özelliğinde kallus gelişiminin gözlemlendiği bildirilmiştir. 2,4-D:Kin kombinasyonunun minimum kallus uyarımını (22%-38%) sağladığı belirtilmiştir. Elde edilen kalluslar ile hücre süspansiyon kültürüne geçilmiştir. Hücre süspansiyon kültürü ikinci alt kültüründen sonra kültürün açık kahverengi (fenolik bileşiklerin salgılanması) olmuştur.

2.4. Asteraceae Familyasındaki Bitkiler İle İlgili Sekonder Metabolit Çalışmaları

Vidal-Ollivier ve ark. (1989), *C. officinalis* türünün çiçeklerinden yedi flavonol 3-O-glikoziti izole etmiştir. Isorhamnetin-3-O-glukozit, rutin, neohesperidosid, 2-G-ramnosilrutinosid, kuersetin glukozit, neohesperidosit ve 2-G-ramnosilrutinosit (rutin) bileşiklerinin yapısal tayinlerinin; kağıt ve ince tabaka kromatografisi; UV, ¹³C-NMR, kütle spektroskopileri yapılarak aydınlatıldığı belirtilmiştir. *C. officinalis* türünde; isorhamnetin 3-O-neohesperidosit, 2-G-ramnosilrutinosit, kuersetin-3-O-neohesperidosit arasındaki interglikozidik bağ ve kuersetin 2-G-ramnosilrutinosit bileşiğinin yapısal tayini ilk kez tespit edilmiştir.

Bakó ve ark. (2002), *C. officinalis* türünün köklerinin, yapraklarının, petallerinin ve polenlerinin karotenoid bileşiminin analizini HPLC ile yapmıştır. *C. officinalis* türünün petallerinde ve polenlerinde temel karotenoidlerin flavoksantin ve auroksantin; köklerinde ise çoğunlukla lutein ve β-karoten bileşiklerinin olduğu saptanmıştır. *C. officinalis* çiçeklerinden yapılan 5 farklı bitkisel çay ve 2 renk tentür incelenmiştir ve endüstriyel ürünlerin karotenoid bileşimi başlangıç materyaliyle karşılaştırılmıştır.

Grzelak ve Janiszowska (2002), *C. officinalis* yaprak eksplantlarından 0.4mg/l 2,4-D+0.4mg/l Kin ve 0.45mg/l 2,4-D+0.5mg/l 2iP kombinasyonlarının ilave edildiği MS besin ortamlarında gelişen kallus hücreleri ile aynı konsantrasyonlardaki oksin:sitin kombinasyonlarında hücre süspansiyon kültürleri başlatmıştır. Oleanolik asit varlığı karanlıkta inkübe edilen hücre süspansiyon kültürlerinde saptanmıştır. Oleanolik asit konsantrasyonunun; 0.45:0.5 mg/l 2,4-D: 2iP kombinasyonunda 0.4:0.4 mg/l 2,4-D: Kin kombinasyonundan daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

Szakiel ve ark. (2003), mevalonik asit ile inkübasyon süresince sterollerin ve oleanolik asitin *C. officinalis* süspansiyon kültürleri üzerindeki etkisi 0,4 mg/l 2,4-D + 1,85 mg/l Kinetin eklenerek ve ayrıca 0,1 mg/l 2,4-D+0,5 mg/l 6-pürin eklenerek ışıklı ve karanlık koşullar altında incelemiştir. Triterpenoitlere neden olan izoprenoid yolağının test edilen tüm kültürlerde etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca tüm oleanolik asit glikozitlerinin ve glukuronidlerin kadife çiçeği bitkisinin karakteristik yapraklarında [3-3H] oleanolik asit ilave edilen kültürlerden sonra sentez edildiği belirtilmiştir. Oleanolik asit glikozitlerinin biyosentezinin ve hücreler arası ortama salınımının, biyoteknolojik önemi olan kültürün hormonal koşullarına bağlı olduğu belirtilmiştir. Işığın monoglukuronit sentezlenmesini düzenlediğinin belirlenmesine rağmen, glukuronidlerin ışıkta ve karanlıkta bulunan kültürlerde daha çok sentezlendiği ve salındığı belirtilmiştir.

Stewart (2003), *C. officinalis* türünün çiçek dokuları ve bitki organlarında kuersetin, rutin, izohamnetin-3-O-glukozit ve izohamnetin-3-rutinosit olan dört önemli sekonder metabolitin miktarını belirlemiştir. Çalışmanın hedefi bitki doku ürününü, sekonder metabolitleri maksimum varyasyonu ise minimum edecek koşulları belirlemek olmuştur.

Kishimoto ve ark. (2005) tarafından, *C. officinalis* türünün sarı ve turuncu renkli kültürlerine ait petallerinin ekstraktlarında 19 karotenoid belirlenmiştir. Bunlardan 10 karotenoidin sarı çiçekli kültüralara özgü olduğu bildirilmiştir. Bu 10 karotenoidin maksimum UV gücü absorpsiyonunun, *C. officinalis* petallerinin temel karotenoid içeriğinden ve flavoksanininkinden daha uzun dalga boylarında olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bu karotenoidlerin petallerin turuncu renginden sorumlu olduğu belirlenmiştir.

Arya ve ark. (2008), *Pluchea lanceolata* (Asteraceae) yaprak eksplantlarından elde edilen farklı yaşlardaki kallus kültürlerinde HPLC ile kuersetin analizi yapmıştır. Maksimum kuersetin miktarının (0.23mg/g kuru ağırlık) 6 haftalık kallus hücrelerinden farkedilir düzeyde elde edildiği bildirilmiştir. Bunun durum ise stasyoner (sabit) kallus büyümesi fazında sekonder metabolit birikiminin olduğunu gösterdiğine dayandırılmaktadır. Daha sonra sırasıyla en çok kuersetin miktarının, 8 haftalık (0.20mg/g kuru ağırlık), 4 haftalık (0.17mg/g kuru ağırlık), 2 haftalık (0.12mg/g kuru ağırlık) kallus hücrelerinde saptandığı belirtilmiştir. Aynı şekilde, serbest ve bağlı kuersetinin 6 haftalık kallus hücrelerinde sırasıyla 0.08 ve 0.15mg/g kuru ağırlık olarak maksimum olarak elde edildiği belirtilmiştir. İzole edilen kuersetinin HPLC piki tutulma zamanı ($t_R \sim 2.9$ dk.) belirlenmiştir.

Gadzovska ve ark. (2008), bitki büyüme düzenleyicilerinin *C. officinalis* invitro kültürlerinde sekonder metabolit miktarını arttırıp arttırmayacağını araştırmıştır. Çalışmada birinci olarak bitki büyüme düzenleyicilerinin *in vitro* kültürlerin biyokütle üretimi; ikinci olarak ise flavonoid, antosiyanin üretimi üzerine etkileri arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Okoh (2008), *C. officinalis* türünün esansiyel yağın kimyasal profilini analiz etmiştir. Farklı büyüme ve mevsim aşamasında bulunan yaprak ve çiçeklerden esansiyel yağların izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Spektroskopik metotlar kullanılarak bu esansiyel yağların yapısı belirlenmiştir. *C. officinalis* bitkisinin esansiyel yağı verimi, tam olarak çiçeklendiği aşamada maksimum (0,97%), çiçeklenme öncesinde ise minimum (0,13%) olarak belirlenmiştir. Bileşiminin, vejetasyon döngüsünün farklı aşamalarında farklı örnekleri gösterdiği belirtilmiştir. Seskiterpenlerin ve monoterpenlerin, bitkinin yaşı ile yüksek korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Seskiterpenlerin taze yapraklarda (59,5%) ve çiçeklerde (26%); monoterpenlerin ise çoğunlukla kuru yapraklarda (70,3%) bulunduğu belirtilmiştir.

Leal ve rak. (2009), *C. arvensis* türünde bulunan çeşitli sekonder metabolitleri araştırmıştır. Kallus ve *in vitro* yetiştirilen bitki eksplantlarının kloroform ekstraktında GC-MS ile en çok beta-sitosterol bileşiğinin bulunduğunu belirtmiştir.

Chakraborty ve Ghorpade (2010), *C. officinalis* çiçeklerinden kuersetin analizini HPLC ile gerçekleştirmiştir. Kuersetin standardının tutulma değeri 0.43 dk. olarak belirlenmiştir. Doğrusal bağıntı 1.0-5.0µg aralığındaki konsantrasyon arasında gözlenmiştir. Kuersetin bileşiğinin en yüksek miktarı 280.3mg/100gm olarak saptanmıştır.

Chakraborty (2010), *C. officinalis* türünde bulunan primer ve sekonder metabolitlerin belirlenmesini gerçekleştirerek biyolojik olarak aktif olan kısmın varlığının belirlenmesini sağlamıştır. *C. officinalis* türünün yapraklarının; petrol eteri, kloroform, metanol ve su ekstraktlarının fitokimyasal analizi TLC araçları ile yapılmıştır. *C. officinalis* türünün petrol eteri ekstraktında, yağ asitlerinin; kloroform ekstraktında triterpenlerin ve sterollerin varlığı belirlenmiştir. *C. officinalis* türünün sulu ekstraktında flavonoidlerin, karbonhidratların, amino asitlerin ve saponinlerin varlığını belirlemiştir.

Wiktorowska ve ark. (2010), *C. officinalis* hücre süspansiyon kültürlerinde hücre büyümesi ve oleanolik asit birikimi üzerinde elisitörlerin etkisini araştırmıştır. Elisitörler, 5 günlük hücre kültürlerinde çeşitli konsantrasyonlarda tek tek eklenmiştir. Jasmonik asit, en etkili elisitör olarak belirlenmiştir. Ayrıca, mantar *Trichoderma viride* homojenat ile 48 saat elisitasyon sonucunda, oleanolik asit içeriğinin 1.8 kat arttığı belirlenmiştir. Elisitör

uygulamasının, oleanolik asit birikimi ve kültür ortamında oleanolik asitin salgılanmasının yanı sıra, hücre büyümesinin az olarak inhibisyonuna neden olduğu belirtilmiştir.

Bunghez ve Ion (2011), *C. officinalis* türünün yaprak ve çiçeklerinden UV-VIS ve FT-IR spektrofotometrik yöntemleri ile karotenoid ve klorofil analizini gerçekleştirmiştir. Likopen, klorofil II ve beta karoten bileşikleri saptanmıştır. *C. officinalis* türünde en çok beta karoten ve lutein pigmentlerinin bulunduğu belirlenmiştir.

Mritunjay ve ark. (2011), *C. officinalis* türünün çiçeklerinin etanolik ekstraktlarındaki kateşin ve likopen bileşiklerini standartlara karşı HPTLC yöntemiyle belirlemiştir. En yüksek kateşin ve likopen miktarlarının sırasıyla 6.88 mg/g and 13.54 mg/g ekstrakta bulunduğu belirlenmiştir.

Sujatha ve ark. (2011), *C. officinalis* türünün çiçeklerinden HPLC ile kuersetin analizini gerçekleştirmiştir. Çözücü olarak kloroform: glasiyal asetik asit: metanol: su (6.4: 3.2: 1.2: 0.8) kullanılmıştır ve 254nm absorbansta HPLC'de ölçüm yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisinin, 0.15-0.4µg aralığında doğrusal olduğu saptanmıştır. Kuersetin tutulma değerinin 0.6 dk. olduğu belirlenmiştir. *C. officinalis* çiçeklerinde kuersetin miktarını belirlemiştir. Önerilen metodun, *C. officinalis* türünde kuersetin bileşiğinin saptanması ve miktarının belirlenmesi için kullanılabilceği belirtilmiştir.

Anca ve ark. (2012), *C. officinalis* örneklerinin iki farklı çözücüde (etanol ve gliserin:su) ekstraksiyonunu gerçekleştirmiştir. Hplc ve spektrofotometre ile fenolik türevleri analiz edilmiştir. *C. officinalis* etanolik ekstrasının fenolik bileşikler bakımından daha zengin olduğu belirlenmiştir. Antioksidant aktivite belirlenmiştir ve ardından fenolik bileşim ile bağlantısı ortaya konulmuştur.

Legha ve ark. (2012), *C. officinalis* kallus kültürlerinde *in vitro* karotenoid pigment üretimini, iki temel ortam olarak, yarı katı ortama karşıt olarak sıvı ortam ve sükröz, amonyum, nitrat nitrojenin çeşitli konsantrasyonları kullanılarak incelemiştir. İki tip eksplant değerlendirilmiştir. Çiçek eksplantları için, karanlık koşullar altında 2 mg/l 2,4-D ilave edilen MS ortamı kullanılarak kallus uyarımı için en iyi olduğu belirlenmiştir. Kültür ortamında az miktarlarda kullanılan sükröz seviyelerinin, pigment uyarımının başlamasını geciktirdiği ve üretilen karotenoid pigmentlerinin tüm düzeylerini azaltmış olduğu belirlenmiştir. En yüksek karotenoid pigment miktarı ise kallus, amonyum nitrojen olmayan MS ortamında büyüdüğünde gözlenmiştir.

Nan ve ark. (2012), *Inula helenium* L. türünün yapraklarının, infloresanslarının ve çiçeklerinin karotenoid bileşimini HPLC ile belirlemeyi amaçlamıştır. Toplam karotenoid miktarının yapraklarda 4.87%'den ligulate çiçeklerde 47.7%'ye kadar değiştiği ortaya

konmuştur. Ligulate çiçeklerin temel bileşiminin lutein-5,6-epoksit olduğu; toplam karotenoidlerin 73.8%'ini kapsadığı ve β -karoten türevlerini içermediği belirtilmiştir. Tubular çiçeklerin, antheraksantin (36.9%) ve lutein (28.4%) bileşiklerinin yüksek miktarlarını içerdiği belirlenmiştir. Bitkinin tüm toprak üstü kısımlarının neoksantin ve violaksantin bileşiklerinin düşük miktarlarını içerdiği tespit edilmiştir.

Rahmani ve ark. (2012), çiçek başlarının bazı zirai özellikleri ve ürün üzerine farklı nitrojen oranlarının ve farklı sulama rejimlerinin etkisini belirlemiştir. Su eksikliği stresinin flavanoid içeriğini etkilememesine rağmen; petal ürününde, ekstrakt ürününde, petal/çiçek ağırlığı oranında ve çiçeğin niteliğinde azalmaya neden olduğunu belirlenmiştir.

Sedghi ve ark. (2012), yaptıkları iki sera denemesinde tuzluluk stresi altında *C. officinalis* petallerindeki antioksidant enzim ve karotenoidlerin değişimi üzerine fitohormonların etkisini ortaya koymuşlardır. Sonuçlar kontrol bitki ile kıyaslandığında su eksikliği durumunda petallerde SOD, CAT aktivitelerinin 47%, 73% arttığını gösterilmiştir. Giberellik asit, benzil amino pürin ile püskürtmenin kuraklık etkisini azalttığı, fakat absisik asit, jasmonik asit, salisilik asit uygulamasının bu enzimlerin aktivitesini teşvik ettiği belirtilmiştir. Karotenoid konsantrasyonunun, karotenoid ve hormon muamelesini etkilediği belirtilmiştir. Karotenoid konsantrasyonunun, su eksikliği altında arttığı; fakat giberellik asit, benzilaminopürin, jasmonik asit uygulamalarının ise likopen ve karoten sentezi üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğunu belirlenmiştir.

Arya ve Patni (2013), *Pluchea lanceolata* (Asteraceae) türünde maksimum kuersetin miktarının (0.23 mg/g kuru ağırlık) 6 haftalık kallus hücrelerinden elde edildiğini saptamıştır. Bitkinin kısımlarında ise maksimum kuersetin miktarı, yapraklarda (0.22 mg/g kuru ağırlık) bunu takiben kök ve sap kısmında tespit edilmiştir. Yaprak kısmında ve 6 haftalık kallus hücrelerinde saptanan kuersetin miktarındaki farklılığın az olduğu belirtilmiştir. Kuersetin miktarının, kallus hücrelerine kinnamik asit uygulanmasıyla kontrole göre 7-8 kat; fenilalanin uygulamasıyla ise 1-2 kat arttığı belirlenmiştir.

Bianca ve ark. (2013), *C. officinalis* çiçeklerinde spektrofotometrik yöntem ile karotenoidlerin, flavonoidlerin ve müsilajın önemli miktarda bulunduğunu ortaya koymuştur.

Dlugosz ve ark. (2013), tüylü kök kültürü başlatmak için *C. officinalis* kotiledonunu ve hipokotillerini *Agrobacterium rhizogenes* ırkları ile enfekte etmiştir. Tüylü kök uyarımının, kotiledonlar için 33,8% ve hipokotiller için 66,6%'ya kadar ulaştığı

belirlenmiştir. Tüylü kök kültürleri glikozitler olarak başlıca oleanolik asiti (97%) sentezleme yeteneğini gösterdiği belirlenmiştir.

Fernandes ve ark. (2013), kimyasal gübreleme, organik gübreleme ve saman örtüsü gibi farklı yetiştirme koşulları altında büyüyen *C. officinalis* türünün polar ekstraktlarının kimyasal profilini değerlendirmiştir. Ayrıca, ekimden sonraki 60. ve 120. günde toplanan bitkilerden sekonder metabolitleri karşılaştırarak bitki gelişimi süresince sekonder metabolit varyasyonu araştırılmıştır. Sekonder metabolitleri belirlemek için HPLC-DAD-MS/MS kullanılmıştır. Denetim altındaki toprak muameleleri altında yetişen bitkilerden sekonder metabolitlerin ekspresyonunda istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmadığı belirtilmiştir.

Rigane ve ark. (2013), *C. officinalis* türünün yaprak ve çiçek kısımlarında fenolik bileşiklerin varlığını araştırmışlardır. Çiçeklerde toplam fenol (109.27 ± 0.23 mg/g kuru ağırlık) ve toplam flavoidlerin (76.44 ± 0.01 mg/g kuru ağırlık) varlığını saptamıştır. Yapraklarda toplam fenol (58.68 ± 0.12) ve toplam flavanoidleri (44.91 ± 0.02) saptamıştır. Gallik asit ve kuersetin-3-O-glukozit bileşiklerini hem yaprak hem de çiçek kısımlarında varlığı tespit edilmiştir. Skopoletin-7-O-glukozit bileşiği sadece yapraklarda saptanırken; rutin ve izorhamnetin-3-O-glukozit bileşiklerinin ise sadece çiçek kısımlarında saptandığı belirtilmiştir.

Al-Oubaidi ve Ameen (2014), HPLC tekniğini kullanarak *C. officinalis* türünün *in vitro* sekonder bileşiklerinin nitel ve nicel analizlerini yapmışlar ve ana bitki ile karşılaştırmışlardır. Sekonder metabolit üretimini arttırmak için salisilik asit 0, 50, 100, 150, 200 mg/l konsantrasyonlarında kullanılmıştır. Sonuçların 200 mg/l salisilik asit konsantrasyonunun *C. officinalis* için birçok sekonder metabolitinde (esansiyel yağ) büyük öneme sahip olduğunu gösterdiği belirtilmiştir.

Ćurković-Perica ve ark. (2014), *Centaurea rupestris* türünde fenolik bileşiklerin varlığını araştırmıştır. Kuersetin 3'-metileter-7-O-β-D-glukopiranoside ve kuersetin bileşiklerinin en yüksek miktarının bu türünün çiçeklerinde saptandığı; luteolin ve *p*-kumarik asit bileşiklerinin en yüksek miktarının ise yapraklarda saptandığı belirtilmiştir. Kuersetin bileşiği en fazla miktarda, *in vivo* yetiştirilen çiçeklerde (6917.72 µg/g kuru ağırlık), bunu takiben *in vivo* yapraklarda (65.49 µg/g kuru ağırlık) ve MS besin ortamında yetiştirilen *in vitro* sürgünlerde (13.81 µg/g kuru ağırlık) saptanmıştır.

Islam ve Kumar (2014), *C. officinalis* türünün çiçeklerinden karotenoidlerin ekstraksiyonunu gerçekleştirmiştir. Toplam karotenoid ekstraksiyonu için hekzan-aseton-etanol-toluen olarak dört çözücünün kombinasyonu kullanılmıştır. Craft ve Soares (1992),

çözücülerin kombine olarak kullanılmasının herhangi birinin tek olarak kullanılmasıyla karşılaştırıldığında toplam karotenoid ürününü arttırdığını belirtmiştir. Polar çözücülerin (aseton, etanol) polar olmayan çözücüler (hekzan, tolüen) ile kombinasyonunun polar olmayan karotenoidlerin çözünürlüğünü arttırdığı belirtilmiştir.

Sanghavi ve ark. (2014), *Tridax procumbens* L. (Asteraceae) türünün çiçeklerinden kuerstin analizi HPLC ile gerçekleştirmiştir. HPLC analizi sonucunda standard kuersetin ve bitkiden izole edilen kuersein için tutulma zamanının sırasıyla 8.408'inci ve 8.442'inci dakikalarda pik elde edildiği belirtilmiştir. Eklenen standard kuersetinin ortalama geri kazanımının, izole edilen kuersetin için 99.80% olduğu saptanmıştır.

Casierra-Posada ve Ávila-León (2015), güneşte ve 35% gölgede yetiştirilen *C. officinalis* türünün yapraklarında klorofil III ve beta karoten içeriği karşılaştırılmıştır. Klorofil III a, klorofil III b ve toplam karotenoidler için önemli farklılıkların olmadığı tespit edilmiştir. Fakat gölgede yetiştirilen bitkilerde klorofil III a/klorofil III b oranı 8.41% artmasına karşın; karotenoidler/klorofil II oranının 5.45%'e kadar düştüğü belirlenmiştir.

Kurkin ve ark. (2015), *C. officinalis* türünün çiçeklerinde bulunan narsisin (3-O-rutinoside of isorhamnetin) flavonoidinin belirlenmesinde HPLC yöntemini kullanmıştır. *C. officinalis* çiçeklerinde narsisin varlığının $0,68 \pm 0,02\%$ 'den $0,97 \pm 0,03\%$ 'e kadar değişen konsantrasyonlarda bulunduğu saptanmıştır.

Dwivedi ve ark. (2016), *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) türünün hücre süspansiyon kültürlerinin 14. gününde en yüksek pellet hücre hacmi (PVC)'nin (0.192ml pellet/ml kültür) 4mg/l NAA+3mg/l BAP+1mg/l askorbik asit eklenen MS besin ortamından; en düşük pellet hücre hacmi (0.1073ml pellet/ml kültür) ise 1mg/l 2,4-D+1mg/l BAP kombinasyonunda saptanmıştır. Pellet hücre hacmindeki önemli artışın 21. güne kadar (0.266ml pelet/5ml kültür) devam ettiği belirlenmiştir. PVC'de hafif bir azalmanın (0.24 ml pelet/5ml kültür) kültürün 28. gününde olduğu bildirilmiştir. Hücreler 7. ve 14. günde yeşil iken, kültürün 21. gününde açık sarı ve az kısmında yeşil renkli olarak görülmüştür. Kültürün 7.gününe kadar hücrelerin logaritmik fazda olduğu tespit edilmiştir. Hücreler kültürün 14.gününde eksponansiyel faza geçmiştir. PVC'nin tekrar arttığı kültürün 21.gününde, hücrelerin stasyonel faza geçtiği belirtilmiştir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal

Araştırmamızda bitkisel materyal olarak setifikalı *Calendula officinalis* ve *C. arvensis* tohumları kullanılmıştır. Tohumlar Ceylan Tarım firmasından alınmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Tohum Yüzeysel Sterilizasyonu

C. officinalis ve *C. arvensis* tohum yüzeysel sterilizasyonu için farklı yüzdelerdeki sodium hipoklorit (NaOCl, 5% 'lik)'te bekletilerek çeşitli denemeler yapılmıştır.

C. officinalis ve *C. arvensis* tohumları 98% EtOH'da 1 dk. beklettikten sonra, a) 5% NaOCl'de 30 dk., b) 7% NaOCl'de 30 dk., c) 10% NaOCl'de 30 dk., d) 15%NaOCl'de 30 dk., e) 20% NaOCl'de 30 dk., f) 30% NaOCl'de 30 dk., g) 40% NaOCl'de 30 dk., f) 50% NaOCl'de 30 dk. bekletilmiştir. Ardından 3 defa steril saf su ile durulanmıştır.

In vitro embriyo aktarımı amacıyla, *C. officinalis* ve *C. arvensis* tohum yüzeysel sterilizasyonu için uygun olan yöntem olan 98% EtOH'da 1dk, 50% NaOCl'de 30dk. bekletilerek ardından 3 defa steril saf su ile durulanma olarak belirlenmiştir.

3.2.2. Bitkisel Materyalin *In vivo* Yetiştirilmesi

3.2.2.1. Tohum Yüzeysel Sterilizasyonu ve *In vivo* Embriyo Aktarımı

Torf bitki yetiştirme ortamını içeren 24 gözden oluşan viyollere *in vivo* *C. officinalis* ve *C. arvensis* embriyo aktarımı yapılmıştır. Bu amaçla, tohumların yüzeysel sterilizasyonu *in vitro* embriyo aktarımı için belirlenen en uygun yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ardından bistüri ve pens yardımıyla tohum kabuğu çıkarılan *C. officinalis* ve *C. arvensis* embriyoları, steril edilmiş torf, torf ve perlit (2:1), torf ve kum (2:1) olmak üzere üç farklı bitki yetiştirme ortamını içeren her biri 24 gözden oluşan viyollere her bir göze 2 embriyo, 3 cm derinlikte olacak şekilde aktarılmıştır. Viyollerin üzerine poşet geçirilerek ortamın nemli kalması sağlanmıştır.

C. officinalis ve *C. arvensis* türlerinin steril torf, torf ve perlit, torf ve kum bitki yetiştirme ortamlarına yapılan *in vivo* embriyo aktarımı sonrasında bitki yetiştirme odasında karanlıkta çimlenmeye bırakılan embriyoları içeren viyollerin fotoğrafları Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. *C. officinalis* ve *C. arvensis* tohumlarının torf, torf ve perlit, torf ve kum bitki yetiştirme ortamlarını içeren viyollere *in vivo* embriyo aktarımı

3.2.3. Bitkisel Materyalin *In vitro* Yetiştirilmesi

3.2.3.1. Tohum Yüzeysel Sterilizasyonu ve *In vitro* Embriyo Aktarımı

Tohum yüzeysel sterilizasyonu öncesinde tohumlara çeşitli ön uygulamalar yapılmıştır. Tüm ön uygulamaların hepsinde tohumlar ilk önce 1 hafta süreyle +4°C'de, ardından 24 saat saf suda bekletilmiştir. Daha sonra 4 farklı şekilde ön uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Hiçbir ön uygulama yapılmayan tohumlar kontrol olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.1). Ayrıca besin ortamına 1g aktif karbon eklenerek çimlenme yüzdesi değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.1 *C. officinalis* ve *C. arvensis* tohumlarına yapılan ön uygulamalar

Gruplar	Ön Uygulama				
	+4°C Derece	Steril Saf Su	KNO ₃	GA ₃	H ₂ SO ₄
Kontrol	-	-	-	-	-
1	1 hafta	24 saat	-	-	-
2	1 hafta	24 saat	2 g/l, 2h	-	-
3	1 hafta	24 saat	2 g/l, 2h	20mg/l,	-
4	1 hafta	24 saat	-	-	20%, 2dk.

Tohum yüzeysel sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. *C. officinalis* ve *C. arvensis* tohumlarında fiziksel dormansi (testa dormansisi) bulunduğundan dolayı tohum kabukları steril kabin içinde pens ve bistüri yardımıyla çıkarılmıştır. *C. officinalis* ve *C. arvensis* tohumları ve embriyoları Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. *C. officinalis* ve *C. arvensis* tohumları (solda) ve tohum kabuğu çıkarılan embriyoları (sağda)

Tohum kabuğu çıkarılan *C. officinalis* ve *C. arvensis* embriyolarının MS0 (¼ MS) besin ortamının döküldüğü petrilere *in vitro* aktarımı gerçekleştirilmiştir.

Petrilerin etrafı parafilm ile sarılmıştır. Bu şekilde hazırlanan petrilere 5'li gruplar halinde alüminyum folyo ile sarılarak tohum çimlenmesi için yaklaşık 1 hafta bitki yetiştirme odasında karanlık koşullarda bekletilmiştir. Tohum çimlenmesi meydana geldikten sonra petrilere alüminyum folyodan çıkarılarak bitki yetiştirme odasında ışıklı koşullarda yaklaşık 2 hafta bekletilmiştir.

3.2.4. Sterilizasyon

Kullanılacak her türlü malzemenin, hazırlanan besin ortamlarının ve her türlü bitkisel materyalin belirlenen sterilizasyon yöntemlerinden biri ile steril edilmesi gerekmektedir. Denemelerde kullanılan laboratuvar malzemeleri, besin ortamı ve eksplant sterilizasyonu için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Belirlenen miktarlarda hazırlanan besin ortamları ve laboratuvarda kullanılacak malzemelerin sterilizasyonu otoklavda 121°C'de, 1 atmosfer basınçta ve 15 dakika süresince yapılmıştır.

3.2.5. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin ve Besin Ortamlarının Hazırlanması

Denemelerde MS besin ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyicileri stok çözelti halinde hazırlanmıştır ve her bir bitki büyüme düzenleyicisi için uygun olan çözücüler kullanılmıştır. NAA (Naftalaen Asetik Asit), IAA (Indol Asetik Asit), 2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetikasit), BAP (6-Benzilaminopürin) için 1N NaOH; 4-CPA (4-Klorofenoksiasetik Asit) için EtOH (99%'luk) çözücü olarak kullanılmıştır.

C. officinalis ve *C. arvensis* eksplant aktarımı için MS besin ortamı hazırlanışına uygun olarak 1,1 gram/litre MS (Murashige&Skoog) (Sigma-S5519) (*C. officinalis* ve *C. arvensis* türleri için ¼ MS), 15gram/litre sükröz (%3) (Sigma-S-5391) eklenmiş ve belirlenen farklı konsantrasyonlardaki çeşitli oksin ve sitokinin kombinasyonu eklenmiştir. 1N HCl ve 1N NaOH ile pH 5,80'e ayarlanmıştır. Ardından 8 g/l agar (0,8%) (Merck-1.01613.0500) ilave edilmiştir.

3.2.6. Kallus Kültürü

In vitro olarak yetiştirilen 10-12 haftalık *C. officinalis* ve *C. arvensis* yaprakları kallus kültürünü başlatmak için eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.2.6.1. Eksplanttan Kallus Eldesi

Eksplanttan kallus eldesi için kullanılan farklı konsantrasyonlardaki çeşitli oksin ve sitokinin kombinasyonlarının eklendiği ve MS0 besin ortamı ve 12 farklı MS besin ortamı Çizelge 2’de belirtilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicilerinden oksin olarak NAA (α -Naftalen Asetik Asit, Duchefa Biochemie), IAA (Indol-3-Asetik Asit, Merck), 2,4-D (2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit, Duchefa Biochemie), 4-CPA (4-Klorofenoksi Asetik Asit, Sigma); sitokinin olarak BAP (6-Benzilaminopürin, Sigma)’ın farklı kombinasyonlarının eklendiği 12 farklı MS besin ortamı hazırlanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Yaprak eksplant yerleştirilmesinin ve kallus biyokütle alt kültürlerinin yapıldığı MS besin ortamları (MS0-MS12 arası)

Besin Ortamı	Oksin (mg/l)	Sitokinin (mg/l)
	NAA (mg/l)	BAP (mg/l)
MS0	–	–
MS1	1	1
MS2	1	2
MS3	0,5	5
	IAA (mg/l)	BAP (mg/l)
MS4	1	1
MS5	1	2
MS6	0,5	5
	2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)
MS7	1	1
MS8	1	2
MS9	0,5	5
	4-CPA (mg/l)	BAP (mg/l)
MS10	1	1
MS11	1	2
MS12	0,5	5

3.2.6.2. Kallus Alt Kültürleri

Eksplant yerleştirilmesinden 30 gün sonra eksplanttan oluşan kallus biyokütlesi steril kabin içinde bistüri ve pens yardımıyla kesilerek hassas tartıda ölçülmüştür. Ardından eksplanttan ayrılan yaş kallus biyokütlesi, yeni hazırlanan MS0 besin ortamına ve 12 farklı MS besin ortamına aktararak birinci kallus alt kültürü başlatılmıştır. Dört defa kallus alt kültürü yapılarak kallus alt kültürleri 120 günde tamamlanmıştır. Kallus alt kültürleri süresince kallus aktarımları her 30 günde bir defa yapılmıştır. Dördüncü kallus alt kültürü başlatıldıktan 30 gün sonra kallus biyokütlesi steril kabin içinde hassas tartıda tartılmıştır.

Kallus kültürleri süresince 0 günden itibaren her kallus alt kültürü sonunda (0., 30., 60., 90., 120. gün) kallus biyokütlesi tartılarak sekonder metabolit analizi amacıyla -20°C’de saklanmıştır.

3.2.6.3. Kallus Biyokütle Değişimi İle İlgili İstatistiksel Analizler

C. officinalis ve *C. arvensis* yaprak eksplantlarından elde edilen kallus biyokütlesi, birinci kallus alt kültürüne başlanan gün (0.gün) ve her üç kallus alt kültürü sonunda (her 30 gün sonra) steril kabin içinde hassas tartıda tartılarak artan kallus biyokütlesi saptanmıştır. En fazla kallus biyokütle artışı MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamlarından elde edildiği; diğer besin ortamlarından elde edilen kallus biyokütlesi az olduğu için en fazla kallus biyokütlesinin elde edildiği besin ortamlarıyla kallus alt kültürlerine devam edilmiştir. Kültür başlangıcından (0.kültür) 30 gün sonra yapılan 4 farklı kallus alt kültürü süresince değişen kallus biyokütlesi karşılaştırılmıştır. Kallus alt kültürleri her tekrarda 20 petri olacak şekilde birbirinden bağımsız 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. Bitki Hücre Süspansiyon Kültürleri

C. officinalis ve *C. arvensis* türlerine ait dördüncü kallus alt kültürü tamamlandıktan (120 gün) sonra hücre süspansiyon kültürlerine geçiş yapılmıştır.

3.2.7.1. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Kurulması

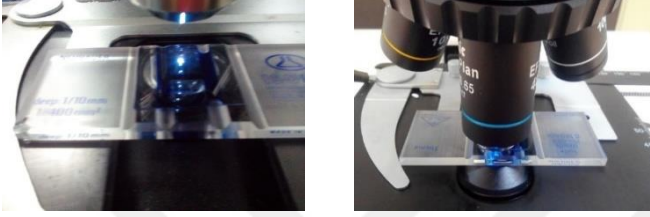
Hücre süspansiyonları kültürlerinde kullanılacak erlenlere beşte bir oranında MS besin ortamı eklenmiştir. 100 ml’lik erlene 20 ml, 250 ml’lik erlene 50 ml MS besin ortamı eklenmiştir. Hücre süspansiyonları 0.kültürüne başlarken 100 ml’lik erlenlere 1’er gram olacak şekilde kallus aktarımı yapılmıştır. *C. officinalis* ve *C. arvensis* türlerine ait olan hücre süspansiyon kültürleri 110 rpm’e ayarlanmış çalkalayıcıya yerleştirilmiştir.

3.2.7.2. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Büyüme Parametreleri

Hücre süspansiyonlarının 0. kültüründe en fazla hücre canlılığı, taze ve kuru ağırlığa ulaştığı kültür süresi belirlenmiştir. Bu amaçla hücre sayımı, taze ve kuru ağırlık ölçümü yapılmıştır. Böylece, hücre süspansiyon kültürlerinde hücre ölümleri başlamadan önce kültürler alt kültüre alınarak 1. kültür başlatılmıştır.

3.2.7.3.1. Hücre Canlılık Testi

C. officinalis ve *C. arvensis* hücre süspansiyonları, 0. günden itibaren her 5 günde bir 40 gün süresince hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla hücre sayımı yapılmıştır. Hücre süspansiyon kültürleri MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamlarının her birinden alınan 1ml örnek, 1ml metilen mavisi ile boyanarak örnek hacmi 2ml'ye tamamlanmıştır. Thoma lamında köşelerdeki dört büyük karede hücre sayımı yapılmıştır (Şekil 3.3). Hücre sayımları 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Toplam hücre sayısı (n/ml) ve hücre canlılığı (%) belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Her 5 günde bir Thoma lamı ile mikroskopta yapılan hücre sayımları

3.2.7.3.2. Hücre Büyümesinin Belirlenmesi

Hücre süspansiyon kültürlerinde büyümenin belirlenmesi için taze ve kuru ağırlık ölçümü yapılmıştır. Bu amaçla filtrasyon pompası (Lab 312, DrVAC-300), filtrasyon erleni ve 100 µm por çapına sahip elekten (sartorius) oluşan filtrasyon sistemi kullanılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Filtrasyon sistemi ve 100 µm por çapına sahip elek

C. officinalis ve *C. arvensis* türlerinin 0.kültür-1.kültür arasındaki 40 gün süresince 0.günden başlanarak her 5 günde bir hücre süspansiyon kültürlerinden 5ml örnek alınarak vakumlu filtrasyon cihazı ile 100 µm por çapındaki milipor filtreden süzülerek taze ağırlık ile sıvı besin ortamının birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Filtrenin üzerindeki kalluslar, hassas tartıda tartılarak taze ağırlık (g/l) ölçümü yapılmıştır. Hücre süspansiyon

kültüründen izole edilerek taze ağırlığı ölçülen kallus hücreleri, sabit bir kallus biyokütlesi elde edilinceye kadar (2 gün) oda sıcaklığında, bekletilerek kurutulmuştur. Kuruyan kalluslar hassas tartıda tartılarak ölçüm sonuçları kaydedilmiştir. Taze ve kuru ağırlık ölçümleri 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.2.7.3. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Devamlılığı

C. officinalis ve *C. arvensis* hücre süspansiyonları, 0. kültürün 30. gününden sonra ölüm fazına girdiğinden dolayı bir kültür periyodu 30 gün süre ile devam ettirilmiştir. Bu şekilde devam ettirilen hücre süspansiyonları 4. kültürün sonunda (120 gün) tamamlanmıştır.

Kültüre içine 20 ml besin ortamı ilave edilen 100 ml'lik erlenler ile başlanmıştır. Birinci kültürden itibaren 100 ml'lik erlendeki hücre süspansiyonlarına, uygun oksin:sitokin kombinasyonunun eklendiği yeni hazırlanan MS besin ortamı final kültür hacmi 50 ml olacak şekilde ilave edilerek 250 ml'lik erlenlere geçiş yapılmıştır. Her bir deneme serisinde 4 erlen bulunmaktadır.

Bir alt kültür süresi sona erdikten sonra, bir sonraki alt kültürü başlatılan hücre süspansiyon kültürlerinde aynı oksin:sitokin kombinasyonuna sahip besin ortamlarının bulunduğu kültürlerden dört erlenden bir tanesi alınarak 100 µm por çapındaki elek ile vakumlu filtrasyon sistemi kullanılarak süzülmüştür. Filtrenin üzerinde kalan taze ağırlık, spatül ile toplanarak tartılmıştır. Daha sonra ependorf içerisine aktararak sekonder metabolit analizi amacıyla -20°C'de saklanmıştır.

3.2.8. Sekonder Metabolit Miktarının Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi

Sekonder metabolit analizi amacıyla *in vitro* ve *in vivo* olarak yetiştirilen *C. officinalis* ve *C. arvensis* türlerinin yapraklarında; kallus kültürlerinde ve hücre süspansiyon kültürlerinde kuersetin, kaemferol, kafeik asit, beta karoten miktarı HPLC ile araştırılmıştır. Bu amaçla, öncelikle bu sekonder metabolitlere ait standartların uygun konsantrasyonlardaki solüsyonlarının hazırlandığı çözücülerle paralel olarak örneklerden ekstratlar hazırlanmıştır.

3.2.8.1. Sekonder Metabolit Standardlarının Hazırlanışı

Kullanılan sekonder metabolit standardlarının her birinin stok solüsyonları ayrı ayrı hazırlanmıştır. Bu amaçla, öncelikle kuersetin, kaemferol, kafeik asit standartları metanol (CH₃OH); beta karoten standardı n-hegzan (C₆H₁₄), aseton (C₃H₆O), etanol (C₂H₆O) ile çözülerek her bir standardın ayrı stok solüsyonu hazırlanmıştır. Daha sonra kuersetin standardı aseton ve etanol içinde çözülmüştür. Standartlar için en iyi pikleri; örnekler için en iyi pikleri ve sekonder metabolit miktarını veren çözücüler seçilerek çalışmaya devam edilmiştir.

Kuersetin standardının hazırlanışı

Kuersetin standardından (Roth, Kuersetin dihidrat, >95%, Art.-Nr. 2629.2, HPLC, 50g), metanol (Carlo Erba Reagents, UN 1230, HPLC-GOLD-Ultragradiant) ile 10ppm (mg/l) konsantrasyonunda 100ml'lik şişede kuersetin standardı stok solüsyonu hazırlanmıştır (www.glsciences.com/technical/technicalnote/064/, Haziran, 2016). Bu stok solüsyondan 8, 6, 4, 2, ppm konsantrasyonlarına metanol ile seyreltme yapılmıştır.

Kaemferol standardının hazırlanışı

Kaemferol standardından (Roth, Rotichrom HPLC, Art. Nr. 7503.1, 10mg) metanol ile 10 ppm konsantrasyonunda 100 ml'lik şişede kaemferol standardı stok solüsyonu hazırlanmıştır (www.glsciences.com/technical/technicalnote/064/, Haziran, 2016). Bu stok solüsyondan 8, 6, 4, 2, ppm konsantrasyonlarına metanol ile seyreltme yapılmıştır.

Kafeik asit standardının hazırlanışı

Standard kafeik asit (Roth, >98%, Art.-Nr. 5869.3, 5g) stok solüsyonu, metanol ile 10ppm konsantrasyonunda 100ml'lik şişede hazırlanmıştır (www.glsciences.com/technical/technicalnote/064/, Haziran, 2016). Bu stok solüsyondan 8, 6, 4, 2, ppm konsantrasyonlarına metanol ile seyreltme yapılmıştır.

Beta karoten standardının hazırlanışı

Beta karoten standardı (97%, AB 139265, 1g) stok solüsyonu, HPLC için kullanılan aseton (LiChrosolv, for HPLC) ile 50 ppm konsantrasyonunda 100 ml'lik şişede hazırlanmıştır. Standart hazırlanması esnasında Chen ve Yang (1992)'ın ve Bhatnagar-Panwar (2015)'in kullandığı yöntem değiştirilerek uygulanmıştır. Bu stok solüsyondan 25, 15, 5, 1 ppm konsantrasyonlarına aseton ile seyreltme yapılmıştır.

3.2.8.2. Yapraktan, Kallus Kültüründen ve Hücre Süspansiyon Kültüründen Sekonder Metabolitlerin Ekstraksiyonu

In vivo ve *in vitro* koşullarda yetiştirilen 15, 30, 45, 60 günlük *C. officinalis* ve *C. arvensis* fide yapraklarından; MS0, MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamlarının bulunduğu kallus kültürlerinden ve MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamlarının bulunduğu hücre süspansiyon kültürlerinden sekonder metabolit analizi amacıyla ekstraksiyon yapılmıştır.

Fenolik bileşiklerin flavonol grubundaki kuersetin ve kaemferol; fenolik asitler grubundaki kafeik asit bileşikleri Rigane ve arkadaşlarının (2013) ve Riedel ve arkadaşları (2010) uyguladıkları yöntem değiştirilerek uygulanmıştır.

1. Her örnekten 0.5 g tartılmıştır. Üzerine 2 ml metanol ilave edilerek soğuk havanda havan tokmağı ile ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.
2. Ekstrakte edilen örnek, ependorfa aktarılarak 5dk, 4500rpm'de, +4°C'de santrifüj edilmiştir.
3. Üstte toplanan süpernatant alınarak yeni ependorfa aktarılmıştır.
4. Süpernatantlar, su banyosunda 55°C sıcaklıkta konsantre edilerek MeOH'ın uçması sağlanmıştır. Ardından kalan tortu metanolde çözülmüştür.

Terpenlerin karotenoidler grubundaki beta karoten bileşimini belirlemek için Bhatnagar-Panwar ve arkadaşlarının (2015) uyguladıkları yöntem değiştirilerek uygulanmıştır. Temel olarak fenolik bileşiklerin belirlenmesinde kullanılan metot kullanılmıştır. Sadece örneklerin ekstraksiyonunda ve su banyosundan sonra kalan tortuyu çözmek için aseton kullanılmıştır.

Sekonder metabolit standard solüsyonları ve ekstraksiyonu yapılarak hazırlanan örnekler 0.20 µm çapında membrane filtreden (non-pirojenik, sartorius stedium biotech) geçirilerek viyallere aktarılmıştır ve HPLC'ye 20µl hacimde enjekte edilmiştir. C18 kolonu (GL Sciences Inc., Intertsil ODS-3, 5µl molekül çapı, 4.6x150mm ebatı, S/N. 1A5151685, C/N. 5020-01731) kullanılmıştır.

3.2.8.3. HPLC Koşulları

Standardların tümü metanol (CH₃OH): asetonitril (CH₃CN) (Sigma Aldrich 34851, for hplc, gradient grade): 5% asetik asit (CH₃COOH) (Sigma Aldrich 27225) (ultra pure saf su ile hazırlanmıştır) [20: 20: 60] mobil fazında (ph: 2,75), 1ml/dk. akış hızında HPLC cihazında (Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000) okutulmuştur. Örnekler 10 dk. süresince okutulmuştur. Fenolik bileşiklerin analizi için bu yöntem uygun bulunmuştur. HPLC kolonu'nun sıcaklığı 40°C'ye ayarlanmıştır (www.glsciences.com/technical/

technicalnote/064/, Haziran, 2016). Her bir örnek 280 nm (www.glsiences.com/technical/technicalnote/064/, Haziran, 2016), 330 nm (Rigane ve ark., 2013), 370 nm (Palacio ve ark., 2012) ve 450 nm (Dumbrava ve ark., 2013), 475 nm (Radu ve ark., 2012; Linga Rao ve Savithramma, 2014) dalga boylarında 10 dk. süre ile HPLC'de okutulmuştur. Bu HPLC koşullarında, 280 nm ve 330 nm'de aseton ile hazırlanan beta karoten standardının stok solüsyonu pik vermiştir. Fakat literatürde böyle bir bilgi olmadığı için beta karoten için farklı bir metot kullanılmıştır.

HPLC ile beta karoten analizi amacıyla metanol: asetonitril: kloroform (LiChrosolv, for liquid chromatography) (50: 40: 10) olarak solvent A ve metanol: asetonitril: kloroform (35: 35: 30) olarak solvent B mobil faz (ph: 10,26) olarak kullanılmıştır. İlk 2 dk. solvent A, sonraki 6 dk. solvent B ve ardından 4 dk. solvent A olarak ayarlanarak mobil faz, multistep gradient şeklinde 1,2 ml/dk. akış hızında HPLC cihazına verilmiştir. Örnekler 20 µl hacimde HPLC'ye enjekte edilerek her bir örnek 12 dk. süresince HPLC'de okutulmuştur. HPLC kolonunun sıcaklığı 30°C'ye ayarlanmıştır (Bhatnagar-Panwar ve ark., 2015). Beta karoten analizi amacıyla HPLC cihazı 450 nm (Dumbrava ve ark., 2013), 455 nm (Strati ve ark., 2012; El-Qudah, 2014), 461 nm (Varzakas ve Kiokias, 2016), 475 nm (Olives Barba ve ark., 2006; Radu ve ark., 2012) dalga boyuna ayarlanmıştır.

Belirtilen mobil fazlar, öncelikle 15 dk. süreyle sonikatör (Bandelin Sonorex) ile sonike edilerek homojenizasyonu tamamlandıktan sonra HPLC'ye verilmiştir.

Bitki örneklerinden HPLC'de 2 tekrarlı olarak okuma yapılmıştır. Standardların her birinin enjeksiyonları HPLC'de ayrı ayrı yapılmıştır. Ayrıca kuersetin, kaemferol, kafeik asit standardlarının (MeOH'da çözünen) her birinin 10 ppm konsantrasyonda eklenmesiyle oluşturulan ana standard solüsyonu HPLC'ye enjekte edilmiştir.

BÖLÜM 4

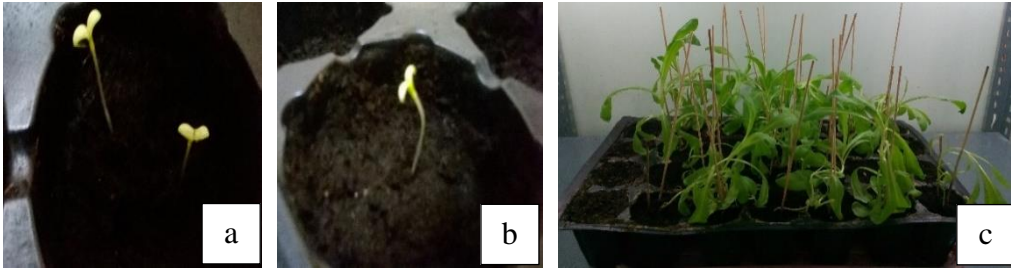
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Tohum Yüzeysel Sterilizasyonu

C. officinalis ve *C. arvensis* tohum yüzeysel sterilizasyonu için farklı sürelerde farklı yüzdelerdeki sodium hipoklorit (NaOCl, 5%)’te tohumların bekletilmesiyle yapılan çeşitli sterilizasyon denemeleri sonucunda, 98% EtOH’da 1dk, 50% NaOCl’de 30 dk bekletilerek 3 defa steril saf su ile durulama en uygun yöntem olarak belirlenmiştir.

4.2. Bitkisel Materyalin *In vivo* Yetiştirilmesi ile İlgili Bulgular

C. officinalis ve *C. arvensis* tohumları 24 saat süreyle saf suda bekletilmiştir. Ardından, *C. officinalis* ve *C. arvensis* tohum yüzeysel sterilizasyonu için belirlenen en uygun yöntem kullanılarak sterilizasyon tamamlanmıştır. Üç farklı bitki yetiştirme ortamından en fazla çimlenme yüzdesi torfa yapılan embriyo aktarımı sonucu elde edilmiştir. *C. officinalis* ve *C. arvensis* *in vivo* embriyo aktarımından 1 hafta sonra torf bitki yetiştirme ortamında gelişen *C. officinalis* ve *C. arvensis* fideleri ve saksılara aktarım öncesinde 67 günlük fidelerin viyoldeki fotoğrafı Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. 5 günlük *C. officinalis* (a); *C. arvensis* (b) fideleri ve saksılara aktarım öncesinde viyoldeki 67 günlük fideler (c)

Viyollere tohum aktarımı sonucu çimlenen 67 günlük fideler, saksılara aktarılmıştır. Saksılara aktarılan beşinci ayındaki *C. officinalis* ve *C. arvensis* fideleri gösterilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Saksılardaki Torf (2:1) bitki yetiştirme ortamında aktarılan embriyolardan gelişen beş aylık *C. officinalis* (a) ve *C. arvensis* (b) fideleri

In vivo aktarımı yapılan *C. officinalis* ve *C. arvensis* embriyolarından gelişen dokuz aylık *C. officinalis* (sarı çiçekli) ve *C. arvensis* (turuncu çiçekli) bitkileri Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. *C. officinalis* (solda) ve *C. arvensis* (sağda) fideleri 9. ayında

4.3. Bitkisel Materyalin *In vitro* Yetiştirilmesi ile İlgili Bulgular

Embriyo çimlenme yüzdesini belirlemek amacıyla, tohumlara yapılan ön uygulamalara (priming) göre çimlenme yüzdeleri belirlenmiştir (Çizelge 3).

Çizelge 4.1. *C. officinalis* ve *C. arvensis* tohumlarına yapılan ön uygulamalar ve çimlenme yüzdeleri (%)

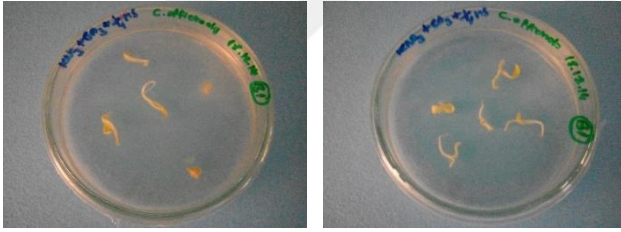
Gruplar	Ön Uygulama					Çimlenme Yüzdesi	
	+4°C Derece	Steril Saf Su	KNO ₃	GA ₃	H ₂ SO ₄	<i>C. officinalis</i>	<i>C. arvensis</i>
Kontrol		-	-	-	-	26,666 %	33,333 %
1	1 hafta	24 saat	-	-	-	53,333 %	40,000 %
2	1 hafta	24 saat	2 g/l, 2h	-	-	86,67 %	93,333 %
3	1 hafta	24 saat	2 g/l, 2h	20mg/l,	-	53,333 %	40,000 %
4	1 hafta	24 saat	-	-	20%, 2dk.	-	-

Çimlenme yüzdesine göre, *in vitro* embriyo aktarımı öncesinde tohumlar MS0 besin ortamına aktarılmadan önce +4°C’de 1 hafta, ardından steril saf suda 24 saat bekletilmiştir. Devamında 2g/l KNO₃ 2 hafta süresince tohumlara uygulanmıştır. Ardından, *C. officinalis* ve *C. arvensis* tohum yüzeysel sterilizasyonu için belirlenen en uygun yöntem kullanılarak sterilizasyon gerçekleştirilmiştir.

C. officinalis ve *C. arvensis* embriyolarının ¼MS eklenen MS0 besin ortamına aktarımının 0. gününde protoklorofil aşamasındaki *C. officinalis* ve *C. arvensis* fidelerinin fotoğrafları Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’de gösterilmiştir.

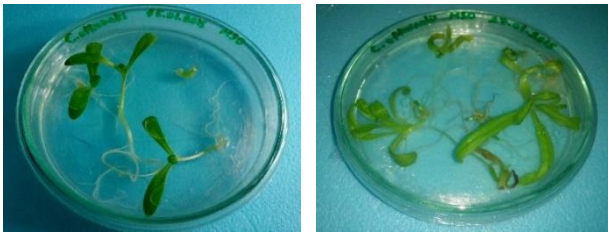


Şekil 4.4. MS0 besin ortamında gelişen protoklorofil aşamasındaki *C. officinalis* (solda) ve *C. arvensis* (sağda) fidelerinin 0. günü

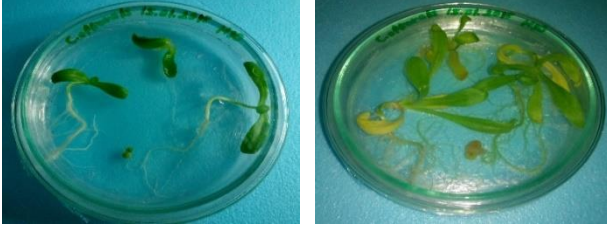


Şekil 4.5. MS0 besin ortamında gelişen protoklorofil aşamasındaki *C. officinalis* (solda) ve *C. arvensis* (sağda) fidelerinin 0. günü

In vitro aktarımı yapılan embriyolardan gelişen petrilerdeki *C. officinalis* fidelerinin fotoğrafları Şekil 4.6’da; *C. arvensis* fidelerinin fotoğrafları ise Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.6. *In vitro* aktarımı yapılan embriyolardan gelişen on günlük (solda), yirmi günlük (sağda) *C. officinalis* fideleri

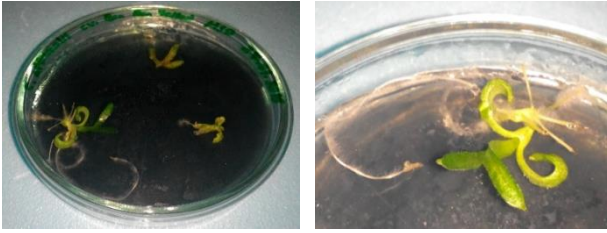


Şekil 4.7. *In vitro* aktarımı yapılan embriyolardan gelişen on günlük (solda), yirmi günlük (sağda) *C. arvensis* fideleri

In vitro ortamda köklenmeyi sağlamak için aktif karbon eklendiğinde, 1. grup ön uygulama sonucunda elde edilen çimlenme yüzdesi elde edildiği ve daha fazla emici tüy oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Aktif karbon eklenen MS0 besin ortamında 20 günlük *C. officinalis* fideleri



Şekil 4.9. Aktif karbon eklenen MS0 besin ortamında 20 günlük *C. arvensis* fideleri

In vitro aktarımı yapılan embriyolardan gelişen ve kavanozlara aktarımı yapılan 40 günlük *C. officinalis* ve *C. arvensis* fideleri Şekil 4.10'de gösterilmiştir.

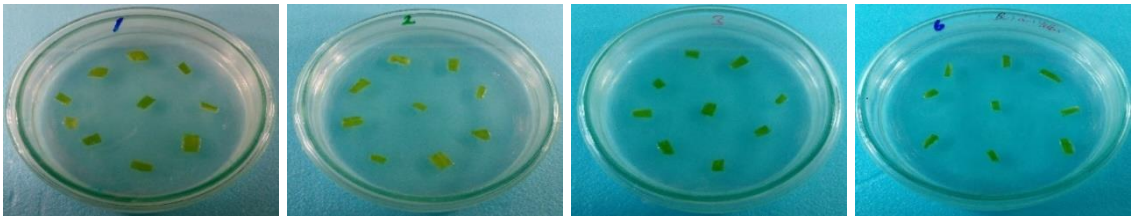


Şekil 4.10. *In vitro* aktarımı yapılan embriyolardan gelişen 40 günlük *C. officinalis* ve *C. arvensis* fideleri

4.4. Kallus Kültürü

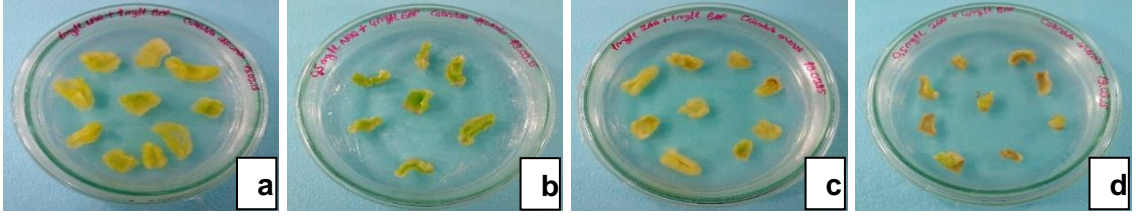
4.4.1. Eksplanttan Kallus Eldesi ile İlgili Bulgular

Eksplantlar MS0 besin ortamı ve farklı konsantrasyonlardaki çeşitli oksin ve sitokinin kombinasyonunun eklendiği 12 farklı MS besin ortamının eklendiği petrilere yerleştirildikten (Şekil 4.11) sonra, petrilere bitki yetiştirme odasına yerleştirilmiştir.



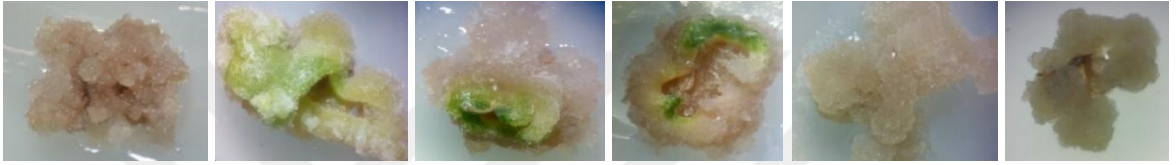
Şekil 4.11. *C. officinalis* ve *C. arvensis* türünün yaprak eksplantının yerleştirildiği gün

MS0, MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamına yapılan *C. officinalis* ve *C. arvensis* yaprak ekplant aktarımından sonra ekplantların yaralı yüzeylerinde kallus oluştuğu gözlenmiştir. Yaprak eksplantlarının yerleştirilmesinden 30 gün sonraki fotoğraflar Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. MS1 (a), MS3 (b), MS4 (c), MS6 (d) besin ortamında yaprak eksplantları

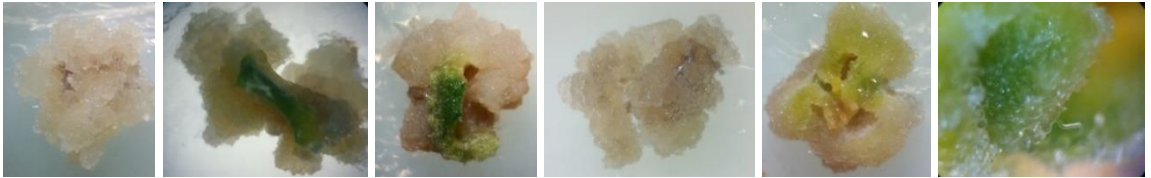
C. officinalis ve *C. arvensis* yaprak eksplantlarının MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamlarına aktarımından sonra gelişen kallusların stereo mikroskop fotoğrafları verilmiştir (Şekil 4.13-4.16).



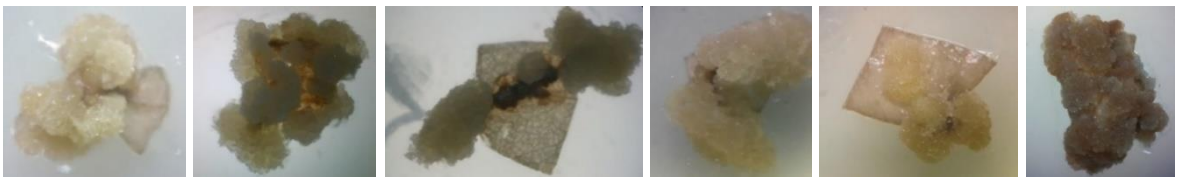
Şekil 4.13. MS1 besin ortamına yaprak eksplantı yerleştirilmesinden 30 gün sonra kallus stereo mikroskop fotoğrafları



Şekil 4.14. MS3 besin ortamına yaprak eksplantı yerleştirilmesinden 30 gün sonra kallus stereo mikroskop fotoğrafları



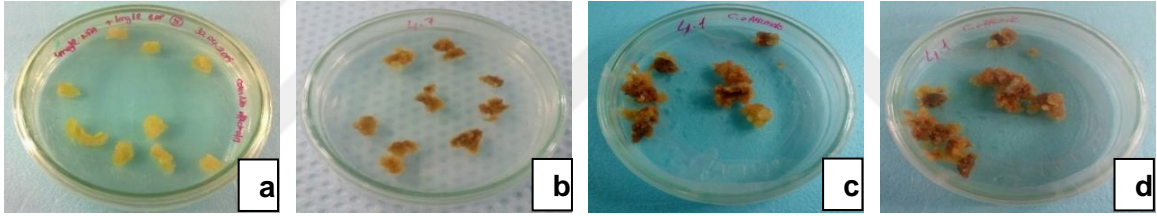
Şekil 4.15. MS4 besin ortamına yaprak eksplantı yerleştirilmesinden 30 gün sonra kallus stereo mikroskop fotoğrafları



Şekil 4.16. MS6 besin ortamına yaprak eksplantı yerleştirilmesinden 30 gün sonra kallus stereo mikroskop fotoğrafları

4.4.2. Kallus Alt Kùltürleri ile İlgili Bulgular

Kallusu alt kùltürleri, dört alt kùltür boyunca devam ettirilmiştir. MS0, MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamlarına kallus alt kùltürü yapılmıştır. Diğer besin ortamlarından yeterli kallus biyokütlesi elde edilmediği için bu besin ortamlarına kallus alt kùltürü yapılmamıştır. Her kallus alt kùltürü 30 gün süresince devam ettirilmiştir. Kallus kùltürü, yaprak eksplant aktarımını (0. kùltür) takiben yapılan dört kallus alt kùltürü sonunda (120 gün) tamamlanmıştır. Besin ortamlarına aktarılan yaprak eksplantının yaralı yüzeyinden gelişen kallus biyokütlesi 30 gün sonunda bistüri ile yaprak kısmından ayrılmıştır. Kallus biyokütlesi steril kabin içinde hassas tartıda tartılarak yeni hazırlanan MS besin ortamlarına aktararak 1. kallus alt kùltürü başlatılmıştır. 1. kallus alt kùltürü sonundan itibaren her kallus alt kùltüründe gelişen kalluslar, steril kabin içinde hassas tartıda tartılarak yeni hazırlanan MS besin ortamlarına aktarılmıştır. 1. kallus alt kùltürü sonundan itibaren her kallus alt kùltürü sonunda kallusların petriyelerdeki fotoğrafları Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. MS1 besin ortamında 1. kallus alt kùltürü (a), 2. kallus alt kùltürü (b), 3. kallus alt kùltürü (c), 4. kallus alt kùltürü (d) sonunda gelişen kalluslar

4.4.3. Kallus Biyokütle Değişimi ile İlgili İstatistiksel Analizlere Dair Bulgular

C. officinalis ve *C. arvensis* yaprak eksplantlarından elde edilen yaş kallus biyokütlesi birinci kallus alt kùltürüne başlanan gün (0.gün) ve her dört kallus alt kùltürü sonunda steril kabin içinde hassas tartıda tartılarak artan kallus biyokütlesi saptanmıştır. Bitki türü, alt kùltür ve uygulamaların biyokütle (g) üzerine etkisinin araştırılmasında tekrarlanan ölçümlü varyans analizi (repeated measurements ANOVA) tekniğinden yararlanılmıştır. Bitki türleri, alt kùltürler ve uygulamalar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde ise Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılmıştır. İstatistik analizler Statistica for Windows (Ver. 10) istatistik paket programı kullanılarak yapılmıştır. Yapılan varyans analizi sonucunda bitki türü, alt kùltür ve uygulamaların biyokütle miktarı üzerine birlikte etkisi (bitki türü X alt kùltür X uygulama) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur

($p<0,005$). Alt kùltùrler ve bitki tùrleri ne olursa olsun MS1 besin ortamında geliŖen kallus (1mg/l NAA+1mg/l BAP) en yùksek biyokùtle değerine ulaŖmıŖtır. Bitki tùrù ve uygulama grubu ne olursa olsun en yùksek biyokùtle miktarı 4. alt kùltùrde elde edilmiŖtir. En uygun alt kùltùrùn 4. alt kùltùr olduğu belirlenmiŖtir. Her iki bitki tùründe ve her uygulama grubunda, alt kùltùrler arttıkça biyokùtle artıŖının olduğu belirlenmiŖtir. Uygulama grubu ve alt kùltùr ne olursa olsun *C. officinalis*, *C. arvensis* tùründen daima en yùksek biyokùtleyle sahip olduğu saptanmıŖtır.

Biyokùtle bakımından bitki tùrù, alt kùltùr ve uygulamalar gore tanıtıcı istatistikler ve Tukey Çoklu KarŖılaŖtırma Testi bulguları Çizelge 4.2'de belirtilmiŖtir.



Çizelge 4.2. Biyokütle bakımından bitki türü, alt kültür ve uygulamalara göre tanıtıcı istatistikler ve Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

		Uygulama	<i>Calendula officinalis</i>			<i>Calendula arvensis</i>		
			$\bar{X} \pm S_x$	Min.	Mak.	$\bar{X} \pm S_x$	Min.	Mak.
Alt Kültür	0.gün (Başlangıç)	MS0	0.447 ± 0.001 D-e-I	0.445	0.448	0.318 ± 0.005 D-e-II	0.312	0.329
		MS1	1.351 ± 0.006 A-e-I	1.341	1.363	0.972 ± 0.001 A-e-II	0.971	0.973
		MS4	1.196 ± 0.020 B-e-I	1.161	1.230	0.838 ± 0.006 B-e-II	0.830	0.849
		MS3	1.089 ± 0.002 C-e-I	1.086	1.093	0.665 ± 0.002 C-e-II	0.661	0.669
		MS6	1.020 ± 0.003 C-e-I	1.016	1.026	0.611 ± 0.003 C-e-II	0.606	0.616
	I. Alt Kültür	MS0	0.556 ± 0.001 E-d-I	0.553	0.557	0.394 ± 0.007 E-d-II	0.383	0.406
		MS1	2.550 ± 0.006 A-d-I	2.540	2.562	1.401 ± 0.001 A-d-II	1.400	1.402
		MS4	2.189 ± 0.019 B-d-I	2.158	2.224	1.188 ± 0.006 B-d-II	1.181	1.201
		MS3	1.908 ± 0.002 C-d-I	1.903	1.911	0.937 ± 0.002 C-d-II	0.933	0.942
		MS6	1.631 ± 0.004 D-d-I	1.625	1.637	0.830 ± 0.003 D-d-II	0.825	0.835
	II. Alt Kültür	MS0	0.665 ± 0.001 E-c-I	0.663	0.667	0.464 ± 0.007 E-c-II	0.453	0.477
		MS1	3.828 ± 0.013 A-c-I	3.804	3.849	1.950 ± 0.001 A-c-II	1.949	1.953
		MS4	3.250 ± 0.019 B-c-I	3.218	3.285	1.609 ± 0.005 B-c-II	1.602	1.619
		MS3	2.801 ± 0.006 C-c-I	2.788	2.810	1.264 ± 0.003 C-c-II	1.259	1.267
		MS6	2.331 ± 0.004 D-c-I	2.326	2.339	1.100 ± 0.002 D-c-II	1.097	1.103
	III. Alt Kültür	MS0	0.776 ± 0.002 E-b-I	0.772	0.779	0.528 ± 0.007 E-b-II	0.517	0.541
		MS1	5.477 ± 0.044 A-b-I	5.419	5.563	2.670 ± 0.001 A-b-II	2.669	2.673
		MS4	4.559 ± 0.018 B-b-I	4.529	4.590	2.130 ± 0.011 B-b-II	2.110	2.149
		MS3	3.791 ± 0.006 C-b-I	3.780	3.800	1.644 ± 0.001 C-b-II	1.642	1.645
		MS6	3.049 ± 0.002 D-b-I	3.047	3.053	1.422 ± 0.002 D-b-II	1.420	1.425
IV Alt Kültür	MS0	0.868 ± 0.003 E-a-I	0.862	0.874	0.576 ± 0.009 E-a-II	0.559	0.586	
	MS1	7.673 ± 0.043 A-a-I	7.609	7.755	3.535 ± 0.005 A-a-II	3.527	3.544	
	MS4	6.171 ± 0.015 B-a-I	6.144	6.195	2.732 ± 0.012 B-a-II	2.711	2.752	
	MS3	5.013 ± 0.007 C-a-I	5.000	5.025	2.089 ± 0.002 C-a-II	2.086	2.093	
	MS6	3.897 ± 0.001 D-a-I	3.895	3.900	1.794 ± 0.001 D-a-II	1.793	1.795	

Not 1: Aynı bitki türü ve alt kültürde farklı büyük harflerle gösterilen uygulama ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($P \leq 0.05$).

Not 2: Aynı bitki türü ve uygulamada farklı küçük harflerle gösterilen alt kültür ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($P \leq 0.05$).

Not 3: Aynı Alt kültür ve uygulamada farklı roma rakamlarıyla gösterilen bitki türü ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($P \leq 0.05$).

Sadece alt kültürler arasında kallus biyokütle artışına dair istatistik analiz Çizelge 4.3’de, sadece bitki türüne göre istatistiksel analiz Çizelge 4.4’de, genel tanıtıcı istatistikler Çizelge 4.5’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.3. Alt Kültürlere Göre Tanıtıcı İstatistikler

Kültür	$\bar{X} \pm S_x$	Min.	Mak.
0.gün	0.8505 ± 0.0188	0.249	3.534
1. Alt Kültür	1.3583 ± 0.0307	0.314	4.7301
2. Alt Kültür	1.9261 ± 0.0454	0.374	6.033
3. Alt Kültür	2.6047 ± 0.0645	0.438	7.753
4. Alt Kültür	3.4347 ± 0.0904	0.481	9.933

Çizelge 4.4. Bitki Türüne Göre Tanıtıcı İstatistikler

Bitki Türü	$\bar{X} \pm S_x$	Min.	Mak.
<i>C. officinalis</i>	2.7233 ± 0.0504	0.3581	9.933
<i>C. arvensis</i>	1.3464 ± 0.0211	0.249	4.102

Çizelge 4.5. Genel Tanıtıcı İstatistikler

$\bar{X} \pm S_x$	Min.	Mak.
2.0349 ± 0.0301	0.249	9.933

Çalışmamızda *C. officinalis* yaprak eksplantlarından en fazla kallus biyokütle artışının olduğu farklı oksin ve sitokinin konsantrasyon ve kombinasyonlarının eklendiği MS besin ortamlarının belirlenerek böylece hücre süspansiyon kültürlerini başlatmak için yeterli kallus biyokütlesinin ve kırılğan özellikte, açık kahverengi, beyaz, açık yeşil renkte kallusun elde edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızın sonucunda eşit oksin ve sitokinin konsantrasyonlarının kombine olarak (1:1 mg/l NAA:BAP ve 1:1 mg/l IAA:BAP) eklendiği MS besin ortamına aktarılan *C. officinalis* yaprak eksplantlarından farklılaşmamış, kırılğan, açık yeşil ve beyaz renkli kırılğan özellikte kallus edilmiştir. Ayrıca bu besin ortamlarından denenen diğer oksin ve sitokinin kombinasyonlarına nazaran istatistiksel olarak daha fazla kallus biyokütlesinin elde edildiği saptanmıştır. Çalışmamızla uyumlu olarak, Grzelak ve Janiszowska (2002) eşit oksin ve sitokinin konsantrasyonunun kombine olarak (0.4mg/l 2,4-D+0.4mg/l KIN) eklendiği MS besin ortamına aktarılan *C. officinalis* yaprak eksplantlarından en iyi kallus biyokütlesinin (168.5mg) ve yeşil renkli kallusun elde edildiğini belirtmiştir.

Çalışmamızda oksin (NAA, IAA)'in sitokinin (BAP)'e göre daha düşük konsantrasyondaki kombinasyonlarının (0.5mg/l NAA+5mg/l BAP ve 0.5mg/l IAA+5mg/l BAP) eklendiği MS besin ortamına aktarılan yaprak eksplantlarından farklılaşmamış, beyaz, açık yeşil, açık kahverengi kallusun geliştiği; ayrıca bu besin ortamından da, denenen diğer MS besin ortamlarından daha az olsa da, verimli kallus biyokütle eldesinin sağlandığı saptanmıştır. Çalışmamızla uyumlu olarak, Nikam ve Khan (2014) tarafından sitokinine oranla daha düşük konsantrasyonda oksin kombinasyonunun 44(0.5mg/l NAA+5mg/l BAP) eklendiği MS besin ortamından 100% kallus gelişiminin gözlemlendiği ve farklılaşmamış, açık yeşil renli kallus elde edildiği belirtilmiştir.

Çalışmamızda 1mg/l NAA+1mg/l BAP kombinasyonunun 1mg/l IAA+1mg/l BAP kombinasyonundan; 0.5mg/l NAA+5mg/l BAP kombinasyonunun 0.5mg/l NAA+5mg/l BAP kombinasyonundan daha iyi kallus biyokütle gelişimini sağladığı belirlenmiştir. Yani her iki NAA konsantrasyonunun (1mg/l ve 0.5mg/l) her iki IAA konsantrasyonunun eklendiği besin ortamına nazaran daha etkili kallus gelişiminin elde edildiği saptanmıştır. Çalışmamızla uyumlu olarak, Nikam ve Khan (2014) tarafından *C. officinalis* yaprak eksplantlarından kallus uyarımı üzerinde NAA konsantrasyonunun önemli etkisi olduğu belirtilmiştir. 2mg/l NAA+5mg/l Kin, 4mg/l NAA+5mg/l Kin ve 0.5mg/l NAA+5mg/l Kin kombinasyonlarının eklendiği MS besin ortamlarında kompakt, açık yeşil renkli, 100% kallus uyarımının olduğu belirtilmiştir.

Nikam ve Khan (2014) oksinlerden IAA ve sitokininlerden Kin kombinasyonunun eklendiği MS besin ortamında kompakt, açık renkli ve 75% kallus uyarımının sağlandığı belirtilmiştir. NAA:BAP kombinasyonunun eklendiği MS besin ortamından ise 100% kallus uyarımının sağlandığı belirtilmiştir. Çalışmamızda da bununla uyumlu olarak IAA:BAP kombinasyonunda kallus biyokütle eldesinin, NAA:BAP kombinasyonuna nazaran daha az olduğu; fakat açık yeşil renkli kallus elde edilmesinin yanı sıra kırılğan ve gevşek yapıda ve açık kahverengi kallus elde edildiği de belirlenmiştir.

Nikam ve Khan (2014) *C. officinalis* yaprak eksplantlarından IAA'nın yüksek konsantrasyonlarının Kin ile kombinasyonlarında (2mg/l IAA+5mg/l Kin; 4mg/l IAA+5mg/l Kin), IAA'nın daha düşük konsantrasyonu ile Kin kombinasyonuna (0.5mg/l IAA+5mg/l Kin) nazaran kallus gelişiminin daha önce olduğu belirlenmiştir. Ayrıca üç farklı oksin sitokinin kombinasyonu arasında en iyi kallus gelişiminin IAA'nın en yüksek konsantrasyonda (4mg/l IAA+5mg/l Kin) eklendiği MS besin ortamında gözlemlendiği belirtilmiştir. Çalışmamızda da bununla uyumlu olarak IAA konsantrasyonunun yüksek olduğu BAP kombinasyonunda (1mg/l IAA+1mg/l BAP), IAA'in düşük olduğu BAP

kombinasyonuna (0.5mg/l IAA+5mg/l BAP) nazaran daha iyi kallus gelişiminin elde edildiği saptanmıştır.

Mehrabi ve ark. (2013) tarafından *C. officinalis* türünün farklı eksplantları (meristem, kotiledon, hipokotil) 0.5mg/l NAA+2mg/l Kin, 1mg/l NAA+4mg/l Kin, 2mg/l NAA+6mg/l Kin içeren MS besin ortamlarında ko-kültüre alındığında bu besin ortamlarında kallus yüzdesinin sırasıyla 85.5%, 73.58%, 77.5% olduğu ve bu değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirtilmiştir. Çalışmamızın aksine belirtilen çalışmada NAA konsantrasyonunun az olduğu durumda (0.5mg/l) en yüksek kallus biyokütlesinin elde edildiği saptanmıştır. Çalışmamızda ise NAA:BAP kombinasyonunda NAA yüksek konsantrasyonda (1mg/l) kullanıldığında denenen kombinasyonlar arasında en yüksek kallus biyokütlesinin elde edildiği besin ortamı olarak saptanmıştır.

Verma ve Jain (2011), *Pluchea lanceolata* (Asteraceae) türünün yaprak eksplantlarının aktarıldığı 2mg/l NAA+2mg/l BA eklenen MS besin ortamından fluoresan yeşil, hızlı büyüyen ve kırılğan özellikte kallus elde etmiştir. Ayrıca yaş ve kuru kallus biyokütlesi bakımından en iyi sonuçların elde edildiği belirtilmiştir. Bu araştırma sonuçları yaş kallus biyokütlesi bakımından araştırma sonuçlarımız ile paralellik göstermektedir.

Dangash ve ark. (2015), *Artemisia annua* L. (Asteraceae) türünün yaprak ve sap eksplantlarının MS0 ve oksin:sitokininin kombinasyonun eklendiği MS besin ortamından kallus gelişiminin olduğunu saptamıştır. MS0 besin ortamında yaprak eksplantından ve sap eksplantından sırasıyla 90% ve 73% kallus eldesinin sağlandığı belirtilmiştir. 0.5mg/l NAA+0.5mg/l BAP, 1mg/l NAA+0.5mg/l BAP, 1.5mg/l NAA+0.5mg/l BAP eklenen MS besin ortamlarına aktarılan yaprak ve sap eksplantlarının her ikisinden de 100% kallus gelişiminin elde edildiği belirtilmiştir. Yaprak ve sap eksplantlarının aktarıldığı 1.5mg/l NAA+0.5mg/l BAP, 1.5mg/l NAA+0.5mg/l BAP eklenen MS besin ortamlarından yeşil, yumuşak ve kırılğan kallus elde edildiği belirtilmiştir. Çalışmamızla uyumlu olarak, NAA:BAP kombinasyonlarından en iyi kallus biyokütlesi elde edilmiştir. Yaprak ve sap eksplantlarının aktarıldığı BAP ve Kin, NAA, 2,4-D, IBA'nın her birinin kombinasyonunun eklendiği MS besin ortamlarından 100% kallus uyarımının sağlandığı belirtilmiştir. Araştırmamızda *Calendula* türlerinin BAP ve 2,4-D, kombinasyonunun eklendiği ortamlarda bu tür bir sonuca rastlanmamıştır.

Çalışmamızla uyumlu olarak, Amudha ve Shanthi (2011) *Acmella calva* (DC.) R.K.Jansen. (Asteraceae) türünün yaprak eksplantlarının aktarıldığı NAA:BAP

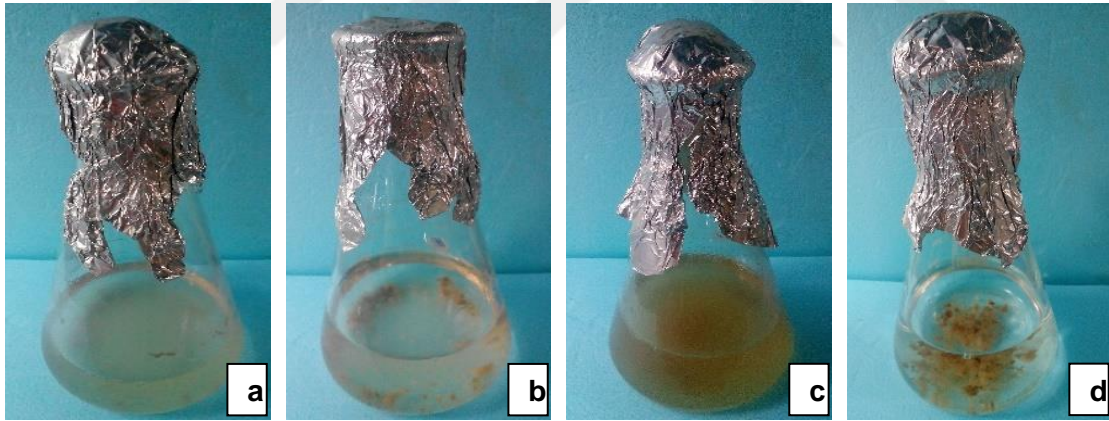
kombinasyonlarının eklendiği MS besin ortamlarında IAA:BAP kombinasyonlarınıninkine nazaran kallus oluşumu bakımından daha etkili olduğu saptamıştır.

Çalışmamızla uyumlu olarak, Arya ve ark. (2008) 2,4-D tek olarak ya da NAA, IAA ile kombine olarak MS besin ortamına eklendiğinde 2,4-D'nin kallus uyarımı üzerine önemli etkisinin olmadığı gözlenmiştir

4.5. Bitki Hücre Süspansiyon Kültürleri ile İlgili Bulgular

4.5.1. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Kurulması

Hücre süspansiyonları 0. kültürünün 0. gününde besin ortamının berrak olduğu ve kallusların henüz birbirinden ayrılmadığı gözlenmiştir. On beşinci gününde, besin ortamının renginin bulanıklaştığı ve kallus hücrelerinin kısmen birbirinden ayrılmış durumda olduğu gözlenmiştir. Otuzuncu gününde, besin ortamının daha fazla bulanıklaşarak renginin değiştiği ve kahverengiye döndüğü; kallus hücrelerinin ise neredeyse tamamen birbirinden ayrıldığı gözlenmiştir. Hücre süspansiyonları 4. kültürü sonunda (120. gün) kallus hücrelerinin MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamlarındaki fotoğrafları Şekil 4.18'de belirtilmiştir.



Şekil 4.18. Hücre süspansiyonları 4. kültür sonunda (120. gün). a) MS1, b)MS3, c) MS4, d) MS6 besin ortamları

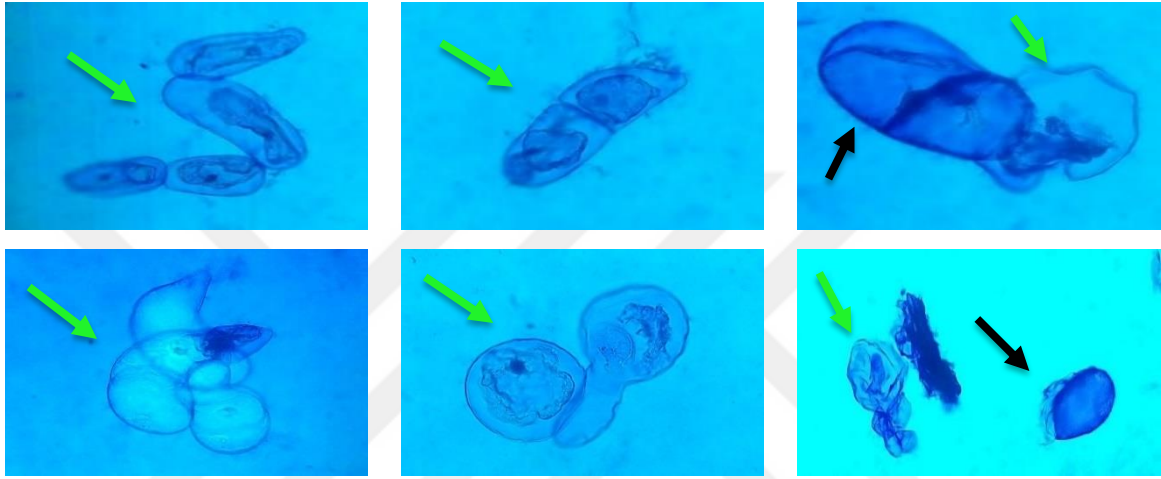
4.5.2. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Büyüme Parametreleri ile İlgili Bulgular

C. officinalis ve *C. arvensis* türünün hücre süspansiyonları 0. kültür süresince (40 gün), MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamlarından 0. günden itibaren her 5 günde bir alınan örneklerde hücre (canlı ve ölü) sayımı, taze ve kuru ağırlık ölçümleri yapılmıştır. değişen

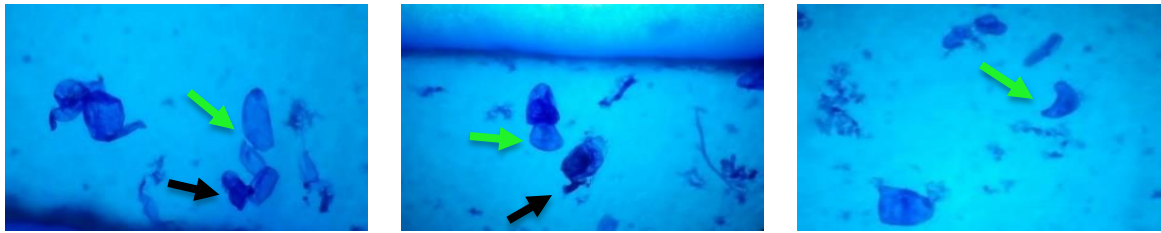
ortalama toplam hücre sayısı (n/ml), ortalama hücre canlılığı (%), ortalama taze ve kuru ağırlık (g/l) belirlenmiştir.

4.5.2.1. Hücre Canlılık Testi ile İlgili Bulgular

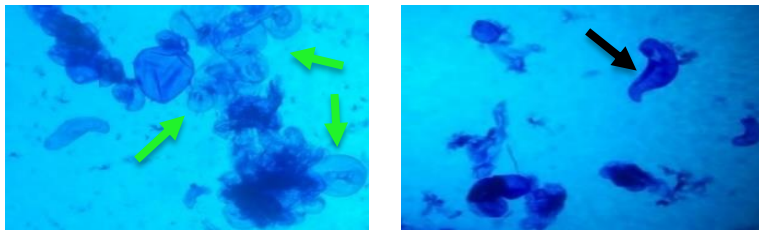
Thoma lamında yapılan hücre sayılarına göre hücre süspansiyon kültüründeki hücre agregatlarının 10., 20. ve 30. gününe ait fotoğraflarda canlı hücreler yeşil ok, ölü hücreler ise siyah ok ile gösterilmiştir (Şekil 4.19-4.21).



Şekil 4.19. Hücre süspansiyonları 0. kültürün 10. gününde stereo mikroskop görüntüleri (X40 objektif)



Şekil 4.20. Hücre süspansiyonları 0. kültürün 20. gününde stereo mikroskop görüntüleri (X10 objektif)



Şekil 4.21. Hücre süspansiyonları 0. kültürün 30. gününde stereo mikroskop görüntüleri (X10 objektif)

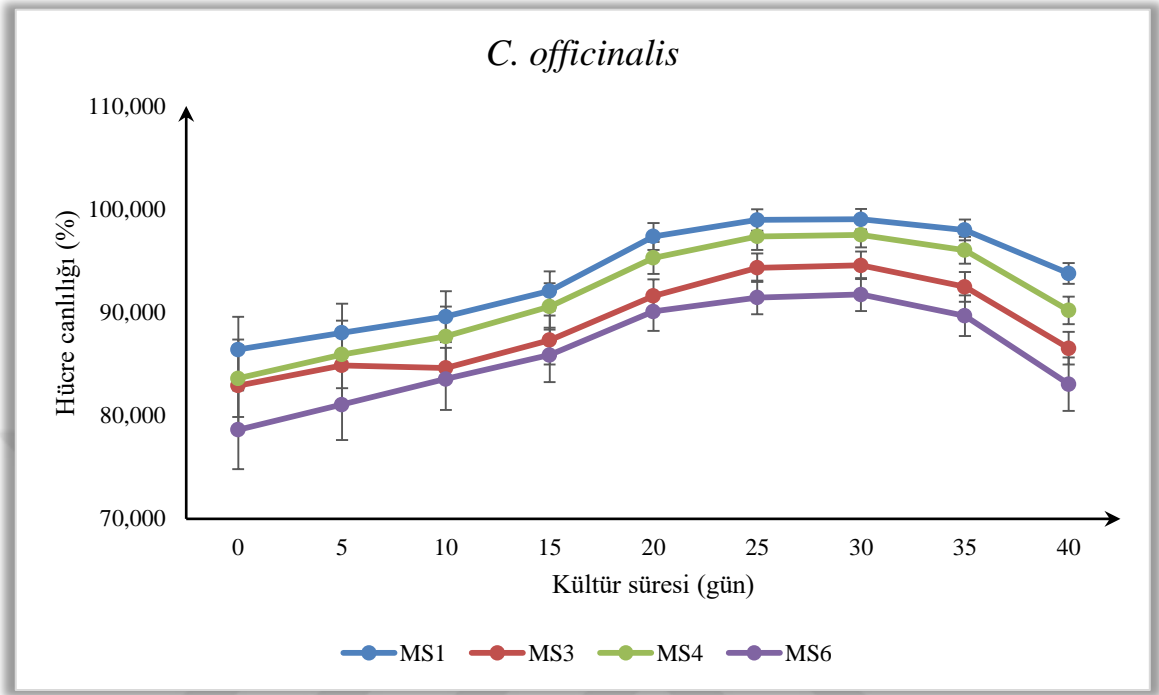
Metilen mavisi bazik boya olduğu için hücrenin asidik yapıları olan hücrenin çekirdeğindeki nükleik asiti ve hücrenin organellerini boyamaktadır. Bu nedenle ortama göre daha açık mavi renkte boyanan hücreler canlı; daha koyu mavi boyanan hücreler ise ölü olarak sayılmıştır. Yapılan hücre sayımlarında, *C. officinalis* ve *C. arvensis* hücre süspansiyon kültürlerinde hücre sayısının 25. güne kadar arttığı, 25.-30. günler arasında sabit bir değere ulaştığı ve 30. günden sonra azalmaya başladığı belirlenmiştir. Hem *C. officinalis* ve hem de *C. arvensis* hücre süspansiyon kültürlerinde en fazla ortalama toplam hücre sayısının ve ortalama yüzde hücre canlılığının 30. günde ve sırasıyla MS1, MS4, MS3, MS6 besin ortamlarından elde edildiği ortaya konmuştur. *C. officinalis* ve *C. arvensis* hücre süspansiyon kültürlerinde en fazla ortalama toplam hücre sayısı MS1 besin ortamından en fazla olarak 30. günde her iki bitki türünde de 101,333 hücre/ml kültür olarak elde edilmiştir. Ortalama hücre canlılığı MS1 besin ortamında 30. günde *C. officinalis* ve *C. arvensis* için sırasıyla 99.016% ve 98.356% olarak saptanmıştır. Her iki bitki türünde de tüm besin ortamlarında 35. günde ortalama hücre sayısının azaldığı tespit edilmiştir. Her iki bitki türü için de, MS1 besin ortamında 35. gündeki ortalama hücre sayısının 98.333 hücre /ml kültür olduğu belirlenmiştir. MS1 besin ortamında 35. günde *C. officinalis* ve *C. arvensis* ortalama hücre canlılığı sırasıyla 97.969% ve 97.289% olarak belirlenmiştir.

C. officinalis ve *C. arvensis* hücre süspansiyonları 0. kültüründe, MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamlarında değişen ortalama toplam hücre sayısı (n/ml), ortalama hücre canlılığı (%) ve bu değerlere ait standard sapmalar hesaplanmıştır (Çizelge 4.6).

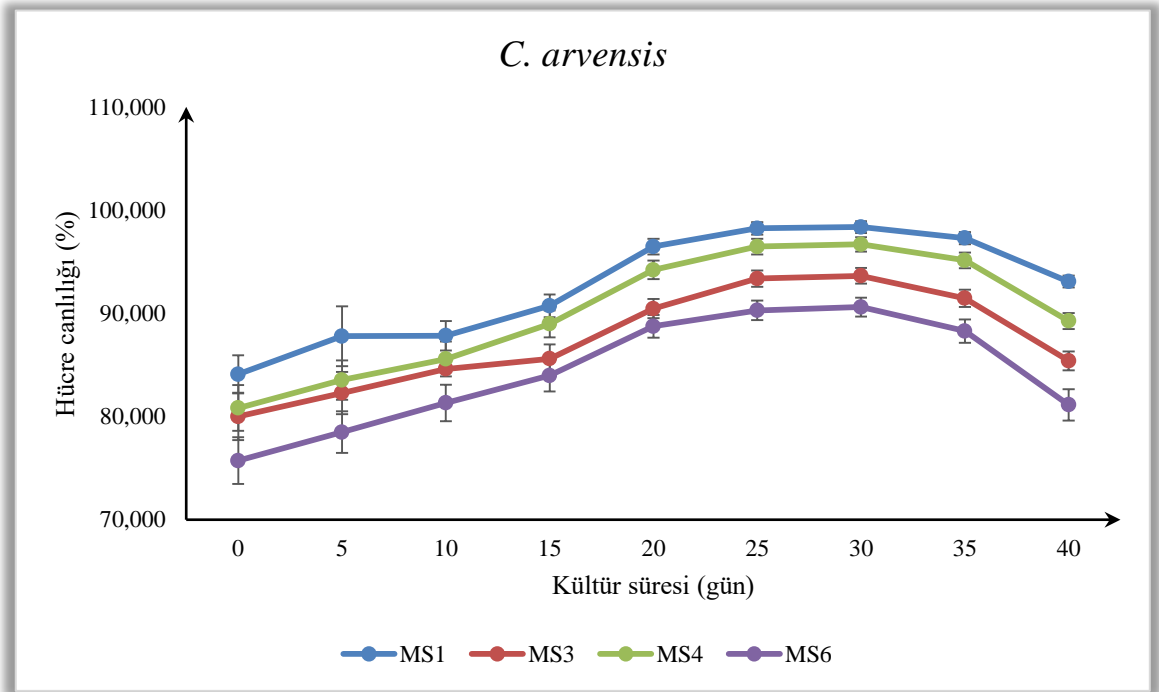
Çizelge 4.6. *C. officinalis* ve *C. arvensis* hücre süspansiyon kültürleri toplam hücre sayısı (n/ml) ve hücre canlılığı (%)

	Gün	<i>C. officinalis</i>						<i>C. arvensis</i>					
		MS1	MS3	MS4	MS6	MS1	MS3	MS4	MS6				
Toplam Hücre Sayısı (n/ml)	0	29,333±0,577	23,333±0,577	24,333±0,577	23,333±0,577	29,333±0,577	23,333±0,577	24,333±0,577	23,333±0,577	29,333±0,577	23,333±0,577	24,333±0,577	23,333±0,577
	5	33,333±0,577	26,333±0,577	28,333±0,577	26,333±0,577	32,667±0,577	26,333±0,577	28,333±0,577	26,333±0,577	32,667±0,577	26,333±0,577	28,333±0,577	26,333±0,577
	10	38,333±0,577	30,333±0,577	32,333±0,577	30,333±0,577	38,333±0,577	30,333±0,577	32,333±0,577	30,333±0,577	38,333±0,577	30,333±0,577	32,333±0,577	30,333±0,577
	15	38,333±0,577	39,333±0,577	42,333±0,577	35,333±0,577	50,333±0,577	39,333±0,577	42,333±0,577	39,333±0,577	50,333±0,577	39,333±0,577	42,333±0,577	35,333±0,577
	20	75,333±0,577	59,333±0,577	63,333±0,577	50,333±0,577	75,333±0,577	59,333±0,577	63,333±0,577	59,333±0,577	75,333±0,577	59,333±0,577	63,333±0,577	50,333±0,577
	25	94,333±0,577	70,333±0,577	75,333±0,577	58,333±0,577	94,333±0,577	70,333±0,577	75,333±0,577	70,333±0,577	94,333±0,577	70,333±0,577	75,333±0,577	58,333±0,577
	30	101,333±0,577	73,333±0,577	80,333±0,577	60,333±0,577	101,333±0,577	73,333±0,577	80,333±0,577	73,333±0,577	101,333±0,577	73,333±0,577	80,333±0,577	60,333±0,577
	35	98,333±0,577	66,333±0,577	75,333±0,577	48,333±0,577	98,333±0,577	66,333±0,577	75,333±0,577	66,333±0,577	98,333±0,577	66,333±0,577	75,333±0,577	48,333±0,577
	40	96,333±0,577	59,333±0,577	71,333±0,577	35,333±0,577	96,333±0,577	59,333±0,577	71,333±0,577	59,333±0,577	96,333±0,577	59,333±0,577	71,333±0,577	35,333±0,577
	0	86,398±3,165	82,911±3,904	83,611±3,758	78,623±3,817	84,1±1,847	80,012±2,294	80,833±2,205	80,012±2,294	84,1±1,847	80,012±2,294	80,833±2,205	75,725±2,263
5	88,027±2,81	84,853±3,496	85,92±3,268	81,054±3,428	87,784±2,889	82,289±2,046	83,539±1,909	82,289±2,046	87,784±2,889	82,289±2,046	83,539±1,909	78,49±2,02	
10	89,586±2,465	84,615±0	87,658±2,891	83,548±3,017	87,832±1,432	84,615±0	85,574±1,684	84,615±0	87,832±1,432	84,615±0	85,574±1,684	81,326±1,768	
15	92,065±1,903	87,308±2,374	90,568±2,244	85,873±2,623	90,732±1,102	85,598±1,383	88,981±1,302	85,598±1,383	90,732±1,102	85,598±1,383	88,981±1,302	83,968±1,531	
20	97,351±1,307	91,582±1,611	95,271±1,538	90,078±1,884	96,462±0,755	90,452±0,933	94,213±0,889	90,452±0,933	96,462±0,755	90,452±0,933	94,213±0,889	88,745±1,093	
25	98,944±1,053	94,319±1,379	97,351±1,307	91,438±1,637	98,234±0,608	93,367±0,797	96,462±0,755	93,367±0,797	98,234±0,608	93,367±0,797	96,462±0,755	90,288±0,949	
30	99,016±0,98	94,551±1,324	97,515±1,227	91,721±1,585	98,356±0,566	93,638±0,766	96,682±0,709	93,638±0,766	98,356±0,566	93,638±0,766	96,682±0,709	90,61±0,919	
35	97,969±1,005	92,469±1,448	96,023±1,298	89,668±1,957	97,289±0,58	91,459±0,838	95,135±0,75	91,459±0,838	97,289±0,58	91,459±0,838	95,135±0,75	88,279±1,136	
40	93,775±1,004	86,525±1,57	90,193±1,331	83,042±2,584	93,081±0,581	85,395±0,914	89,254±0,772	85,395±0,914	93,081±0,581	85,395±0,914	89,254±0,772	81,138±1,515	
Hücre Canlılığı (%)													

Hücre süspansiyon kültürleri hücre sayılarına göre belirlenen hücre canlılığı (%) grafikleri *C. officinalis* (Şekil 4.22) ve *C. arvensis* (Şekil 4.23) türü için verilmiştir.



Şekil 4.22. *C. officinalis* hücre süspansiyon kültürü hücre canlılığı (%)



Şekil 4.23. *C. arvensis* hücre süspansiyon kültürü hücre canlılığı (%)

4.5.2.2. Hücre Büyümesinin Belirlenmesi ile İlgili Bulgular

C. officinalis ve *C. arvensis* türünün hücre süspansiyonları 0. kültür süresince (40 gün), MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamlarından 0. günden itibaren her 5 günde bir alınan örneklerde değişen taze ve kuru ağırlık (g/l) miktarı belirlenmiştir.

C. arvensis ve *C. officinalis* hücre süspansiyon kültürleri süresince taze ve kuru ağırlığın; 0. günden itibaren 30. güne kadar arttığı, 30. günde maksimum taze ve kuru ağırlığa ulaştığı bu noktadan itibaren ise 35. günden itibaren 40. güne kadar azaldığı belirlenmiştir. Hücre süspansiyon kültürleri süresince, taze ve kuru ağırlık sırasıyla MS1, MS4, MS3, MS6 besin ortamlarından en fazla olarak elde edilmiştir.

C. officinalis MS1 besin ortamındaki taze ve kuru ağırlığın 30. günde sırasıyla 115.072 g/l ve 56.176 g/l'den 35. günde sırasıyla 109.056 g/l ve 49.349 g/l ağırlığa düştüğü belirlenmiştir *C. arvensis* MS1 besin ortamındaki taze ve kuru ağırlığın 30. günde sırasıyla 112.069 g/l ve 56.286 g/l olduğu; 35. günde sırasıyla 107.208 g/l ve 54.244 g/l miktarına düştüğü belirlenmiştir.

C. officinalis ve *C. arvensis* hücre süspansiyon kültürleri MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamlarında taze ve kuru ağırlığa göre: 0-5. günler arasında lag (uyum) fazında; 5-25. günler arasında log (eksponansiyel) fazda; 25-30.günler arasında, hücre ağırlığında az bir artış olmuştur, kısmen stasyoner (durağan) fazda bulunmaktadır. Hücre süspansiyon kültürlerinin 30. günden sonra ölüm fazına girdiği tespit edilmiştir.

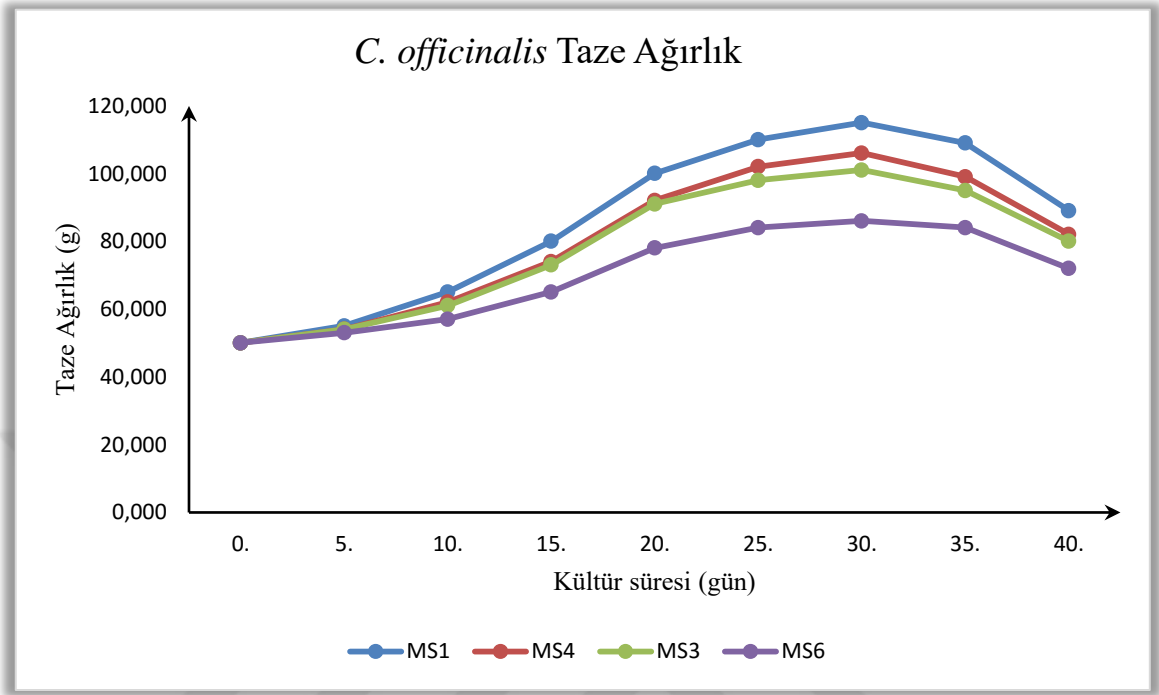
Toplam ve canlı hücre sayımı, taze ve kuru ağırlık ölçümlerine göre; 30. günden sonra hücre sayısında ve kallus ağırlığında azalma olduğunun belirlenmesi sonucunda hücre süspansiyon kültürlerinin 30 günde bir alt kültüre alınmasına karar verilmiştir.

Hücre süspansiyon kültürü süresince *C. officinalis* ve *C. arvensis* türünün MS1, MS3, MS4 ve MS6 besin ortamlarında değişen ortalama taze ve kuru ağırlık (g/l) ile ortalama standard sapmaları Çizelge 4.7'da gösterilmiştir.

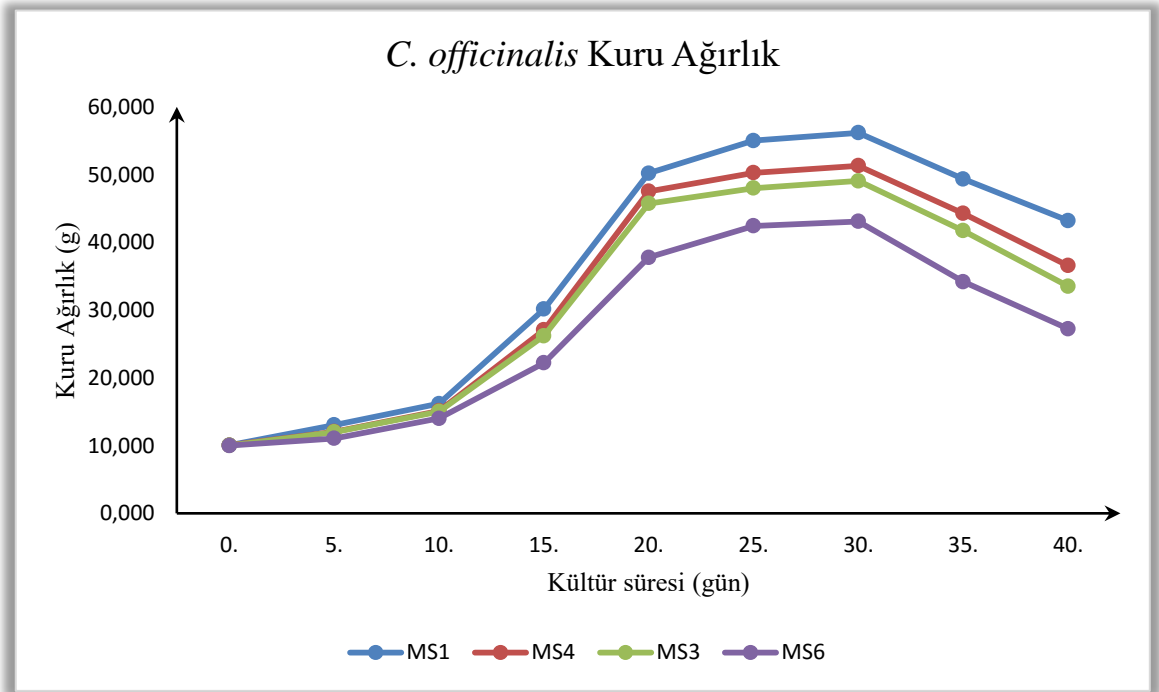
Çizelge 4.7. *C. officinalis* ve *C. arvensis* hücre süspansiyon kültürleri MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamlarında taze ve kuru ağırlık değişimi (g/l)

	<i>C. officinalis</i>						<i>C. arvensis</i>					
	Gün	MS1	MS3	MS4	MS6		MS1	MS3	MS4	MS6		
Taze Ağırlık (g/l)	0	50,054±0,002	50,04±0,008	50,04±0,008	50,051±0,002		50,068±0,019	50,052±0,011	50,064±0,025	50,048±0,005		
	5	55,057±0,006	54,046±0,004	54,046±0,004	53,051±0,003		55,102±0,006	54,207±0,279	54,063±0,005	53,056±0,005		
	10	65,055±0,009	61,055±0,011	61,055±0,011	57,064±0,01		65,168±0,005	61,058±0,006	62,048±0,004	57,094±0,013		
	15	80,052±0,004	73,055±0,013	73,055±0,013	65,065±0,01		79,099±0,007	73,09±0,005	75,167±0,01	64,058±0,005		
	20	100,06±0,002	91,054±0,006	91,054±0,006	78,05±0,002		100,059±0,011	90,034±0,003	91,054±0,003	80,073±0,004		
	25	110,063±0,012	98,053±0,011	98,053±0,011	84,063±0,009		110,53±0,003	97,024±0,005	101,062±0,003	88,059±0,006		
	30	115,072±0,01	101,046±0,009	101,046±0,009	86,064±0,006		112,069±0,005	99,056±0,007	104,04±0,008	90,034±0,005		
	35	109,056±0,008	95,043±0,005	95,043±0,005	84,044±0,007		107,208±0,005	94,216±0,003	99,108±0,004	85,272±0,058		
	40	89,07±0,009	80,04±0,006	80,04±0,006	72,039±0,01		87,108±0,004	79,206±0,004	82,098±0,005	72,416±0,003		
		0	10,052±0,005	10,021±0,007	10,052±0,005	10,009±0,005		10,327±0,006	10,108±0,008	10,108±0,006	10,119±0,005	
Kuru Ağırlık (g/l)	5	13,04±0,005	12,021±0,004	13,04±0,005	11,079±0,003		13,269±0,004	12,052±0,004	12,175±0,003	11,111±0,008		
	10	16,189±0,004	15,024±0,005	16,189±0,004	14,01±0,004		16,093±0,005	15,011±0,005	15,057±0,004	14,008±0,004		
	15	30,159±0,003	26,199±0,004	30,159±0,003	22,22±0,003		29,84±0,01	26,287±0,005	28,178±0,006	21,06±0,003		
	20	50,193±0,004	45,727±0,006	50,193±0,004	37,791±0,008		51,091±0,007	45,033±0,004	45,928±0,007	39,029±0,006		
	25	55,018±0,006	48,007±0,005	55,018±0,006	42,428±0,007		56,208±0,003	49,218±0,003	51,053±0,044	43,4±0,005		
	30	56,176±0,003	49,068±0,004	56,176±0,003	43,085±0,004		56,286±0,078	50,102±0,071	52,101±0,02	43,785±0,144		
	35	49,349±0,007	41,734±0,005	49,349±0,007	34,182±0,003		54,244±0,062	49,197±0,03	50,328±0,367	41,237±2,307		
	40	43,21±0,005	33,528±0,008	43,21±0,005	27,256±0,028		39,235±0,025	32,968±0,007	33,427±0,007	27,837±0,008		

C. officinalis türünün değişen taze ağırlık miktarı Şekil 4.24’de ve değişen kuru ağırlık miktarı Şekil 4.25’de gösterilmiştir.

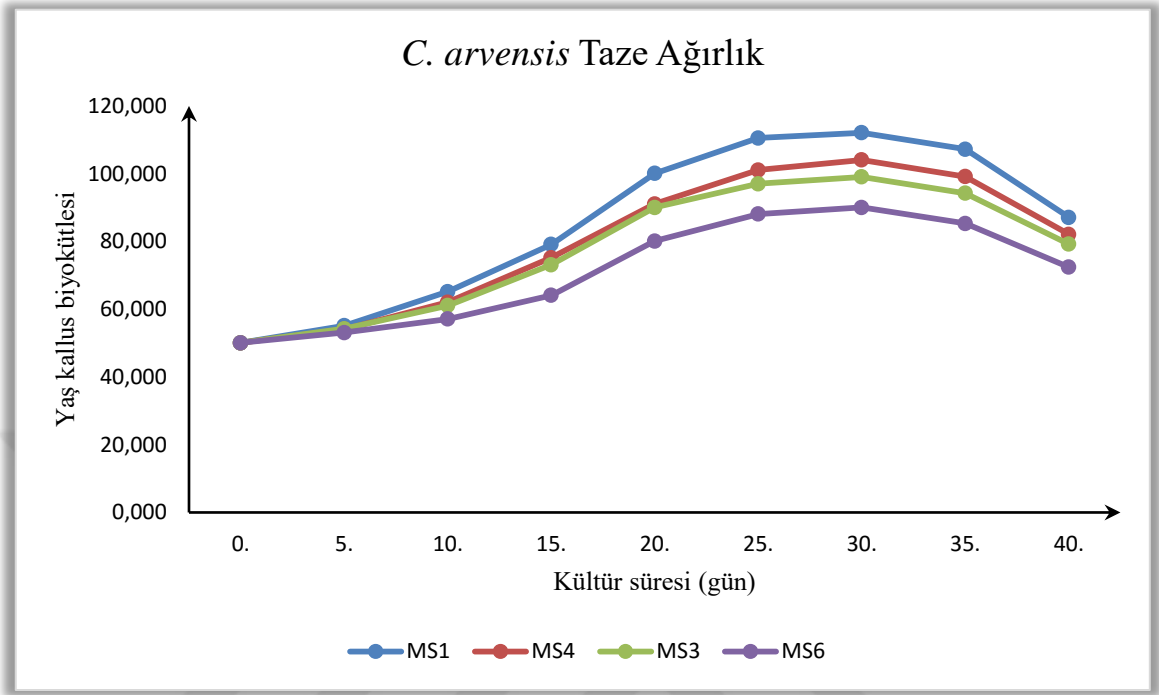


Şekil 4.24. *C. officinalis* hücre süspansiyon kültürü taze ağırlık (g/l)

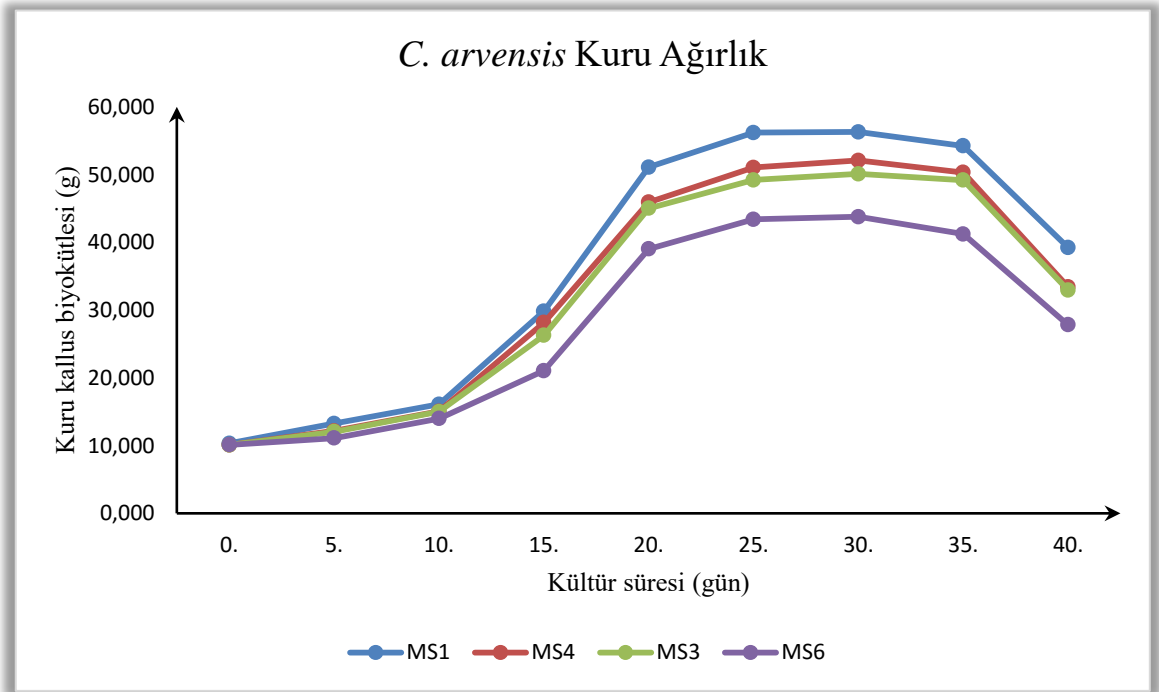


Şekil 4.25. *C. officinalis* hücre süspansiyon kültürü kuru ağırlık (g/l)

C. arvensis türünün değişen taze ağırlık miktarı Şekil 4.26’da ve kuru ağırlık miktarı Şekil 4.27’de gösterilmiştir.



Şekil 4.26. *C. arvensis* hücre süspansiyon kültürü taze ağırlık (g/l)



Şekil 4.27. *C. arvensis* hücre süspansiyon kültürü kuru ağırlık (g/l)

Dlugosz ve ark. (2013), kotiledon ve hipokotilleri *Agrobacterium rhizogenes* ile enfekte edilen *C. officinalis* kotiledon ve hipokotillerini antibiyotikleri içermeyen, kanamisin eklenen MS besin ortamında hücre süspansiyon kültürüne geçiş yapmıştır. Kültürün ilk 20. güne kadar logaritmik faza girdiği, taze ve kuru ağırlığın arttığı ortaya konmuştur. Taze ağırlık artışının 30. güne kadar oldukça yavaşladığı fakat denemenin sonuna kadar (45 gün) devam ettiği bildirilmiştir. Kuru ağırlığın ise, hızlıca artmaya devam ettiği ve ardından yavaşça düştüğü belirlenmiştir. Çalışmamızda ise, bunun aksine taze ve kuru ağırlığın birbirine paralel olarak arttığı ve azaldığı saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızda kültürün sonuna kadar taze ve kuru ağırlığın arttığı belirlenmemiştir. Belli bir günden sonra azalmaya başladığı ortaya konmuştur. Hücrelerin kültürün 30. gününden sonra ölmeye başladığı tespit edilmiştir. Çalışmamızla uyumlu olarak, Dlugosz ve ark. (2013) kırk gün sonra, hücre süspansiyonlarında hücrelerinin öldüğü belirlemiştir.

Çalışmamızda hücre süspansiyon kültürlerinin renginin kültürün günlerine göre farklılık gösterdiğinin saptanması bakımından Dwivedi ve ark. (2016) çalışması ile paralellik göstermektedir.

4.6. Sekonder Metabolit Miktarının Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizine Dair Bulgular

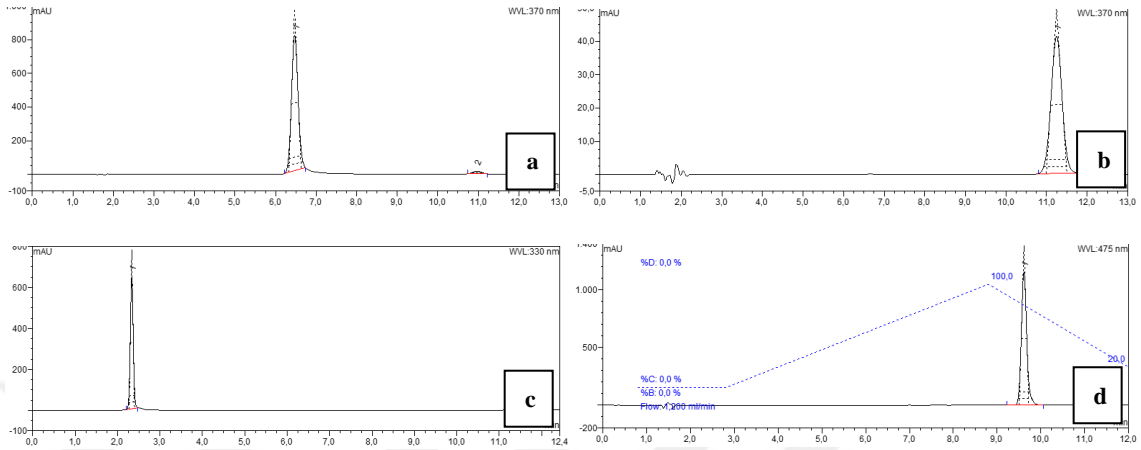
C. officinalis ve *C. arvensis* türlerinin *in vivo* ve *in vitro* şartlarda yetiştirilen yapraklarından, kallus kültürlerinde 0. kültür, 1., 2., 3., 4. kallus alt kültürü sonunda, hücre süspansiyon kültürlerinde 0., 1., 2., 3., 4. kültür sonunda sekonder metabolit analizi yapılmıştır. Hazırlanan standartlara ve örneklere ait miktar ($\mu\text{g/g}$), pik alanı kullanılarak hesaplanmıştır.

4.6.1. Sekonder Metabolit Standard Solüsyonlarının Hazırlanmasına Dair Bulgular

HPLC’de standartların okutulması sonucu her bir sekonder metabolit standardına ait pikin tutulma zamanı ve pik alanı belirlenmiştir.

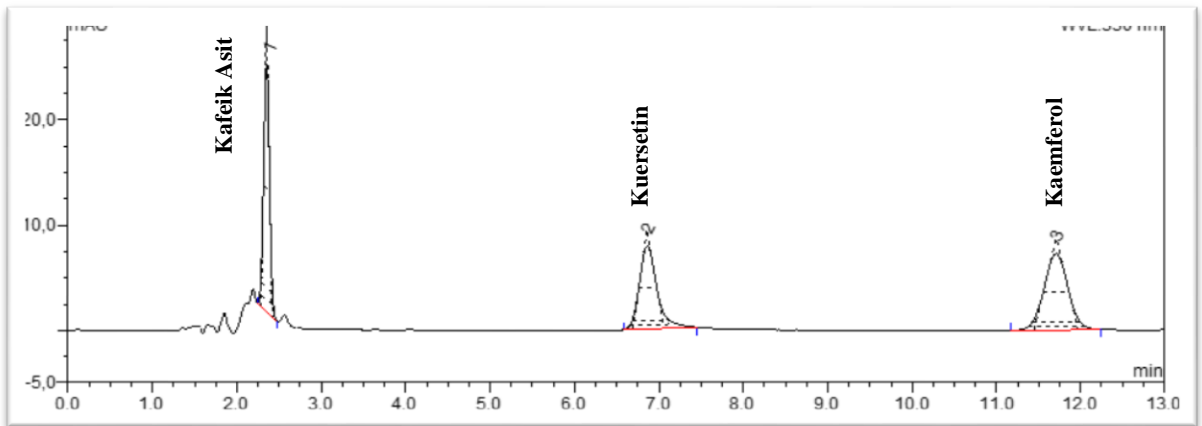
Kuersetin ve kaemferol standartları 370 nm’de; kaemferol standardı 330 nm’de; beta karoten standardı 450, 455, 461 ve 475 nm’de pik vermiştir. Fakat beta karoten standard solüsyonu en iyi piki ve tutulma zamanını 475 nm’de vermiştir.

Kuersetin (10 ppm), kaemferol (10 ppm), kafeik asit (10 ppm) ve beta karoten (50 ppm) standardlarının her birinin ayrı ayrı HPLC’de okutulması sonucu elde edilen kromatogramlar Şekil 4.28’de verilmiştir.



Şekil 4.28. Kuersetin (a), kaemferol (b), kafeik asit (c), beta karoten (d) standardlarına ait kromatogramlar

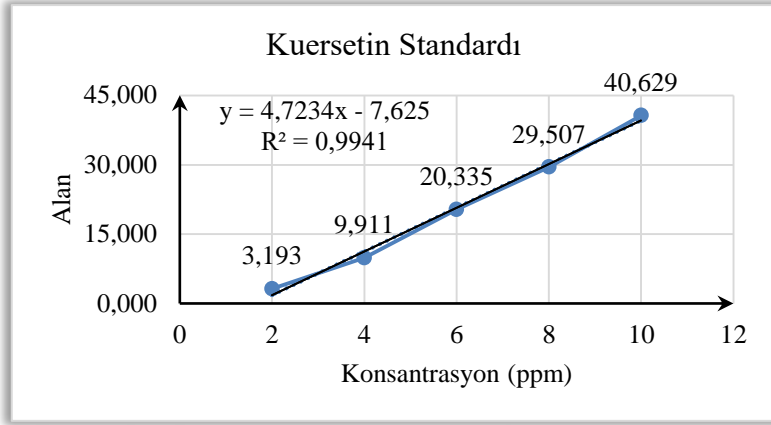
Metanol ile hazırlanan kuersetin (10 ppm), kaemferol (10 ppm) ve kafeik asit (10 ppm) satandardlarının üçünü birden ihtiva eden numune HPLC’de okutulduğunda, her üç standardın 330 nm’de pik verdiği belirlenmiştir (Şekil 4.29).



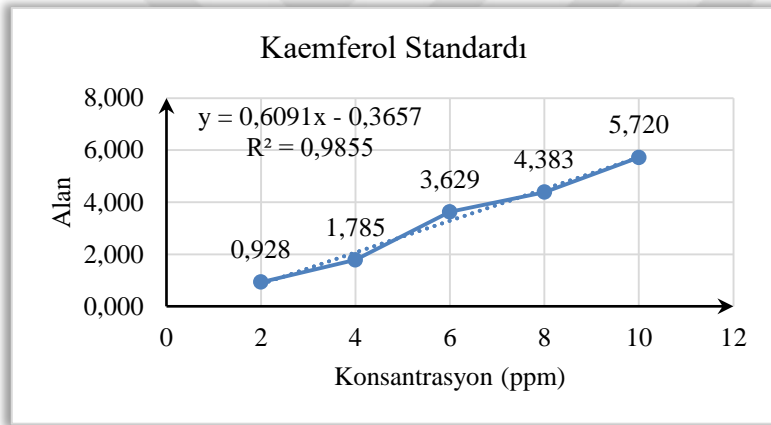
Şekil 4.29. Kafeik asit (1), Kuersetin (2) ve kaemferol (3) standardlarının 330 nm’deki kromatogramı

Kuersetin, kaemferol, kafeik asit (10 ppm) ve beta karoten (50 ppm) standard stok solüsyonlarından seyreltilerek hazırlanan ve 3 tekrarlı olarak HPLC’de okutulan standard solüsyonlarından ppm’e karşılık gelen alan verileri ile oluşturulan doğrusal kalibrasyon eğrileri

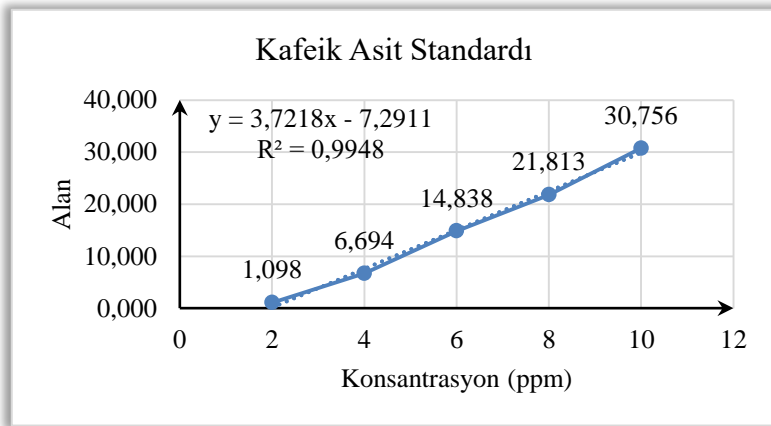
ve elde edilen denklemler (yordama eşitliği ve yordama katsayısı) Şekil 4.30-4.33’de gösterilmiştir.



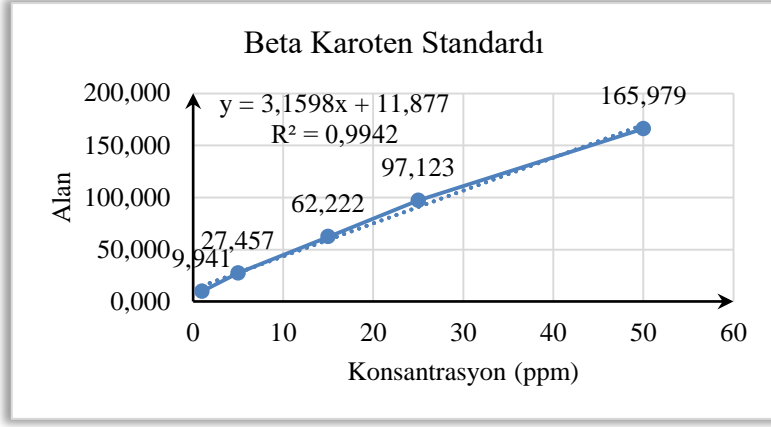
Şekil 4.30. Kuersetin standardı



Şekil 4.31. Kaemferol standardı



Şekil 4.32. Kafeik asit standardı



Şekil 4.33. Beta karoten standardı

Metanol ile çözülen kuersetin (10 ppm), kaemferol (10 ppm), kafeik asit (10 ppm) standardına ve aseton ile çözülen beta karoten (50 ppm) standardına ait pikin tutulma zamanı, pik alanı ve miktarı Çizelge 4.8’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.8. Kuersetin, kaemferol, kafeik asit, beta karoten standartlarının HPLC sonuçları

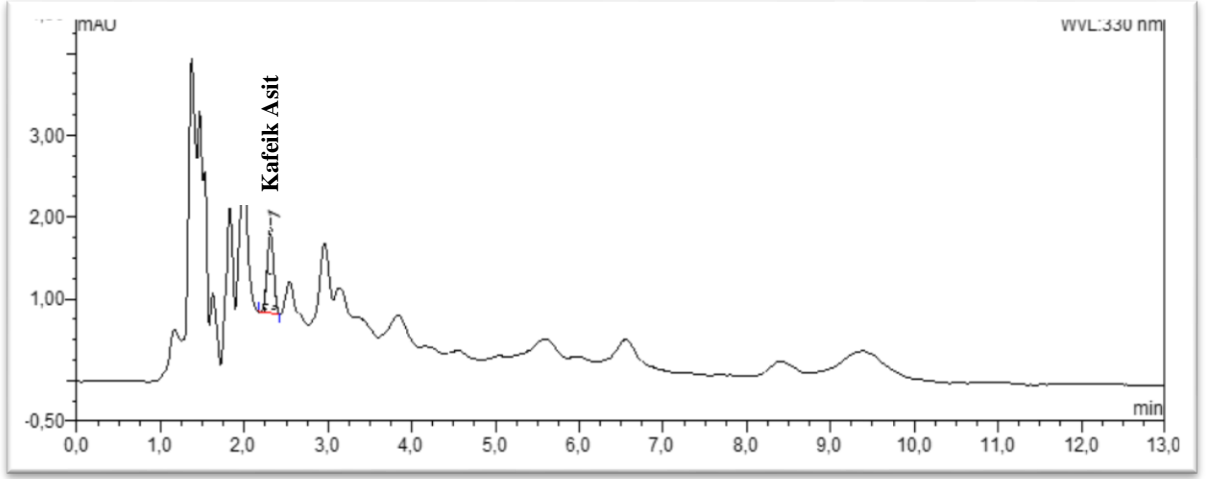
Standard	Tutulma Zamanı (dk.)	Pik Alanı	Miktar (µg/g)
Kuersetin	6.445	151.629	3,056
Kaemferol	11.246	5.72	0,704
Kafeik Asit	2.333	30.756	0,62
Beta Karoten	9.614	165.979	3,94

4.6.2. Yapraktan, Kallus Kültüründen ve Hücre Süspansiyon Kültüründen Sekonder Metabolit Miktarlarına Dair İlgili Bulgular

HPLC’de en iyi piki ve tutulma zamanını veren dalga boyları (kuersetin ve kaemferol 370 nm; kafeik asit 330 nm; beta karoten 475 nm) ile örnekler incelenmiştir.

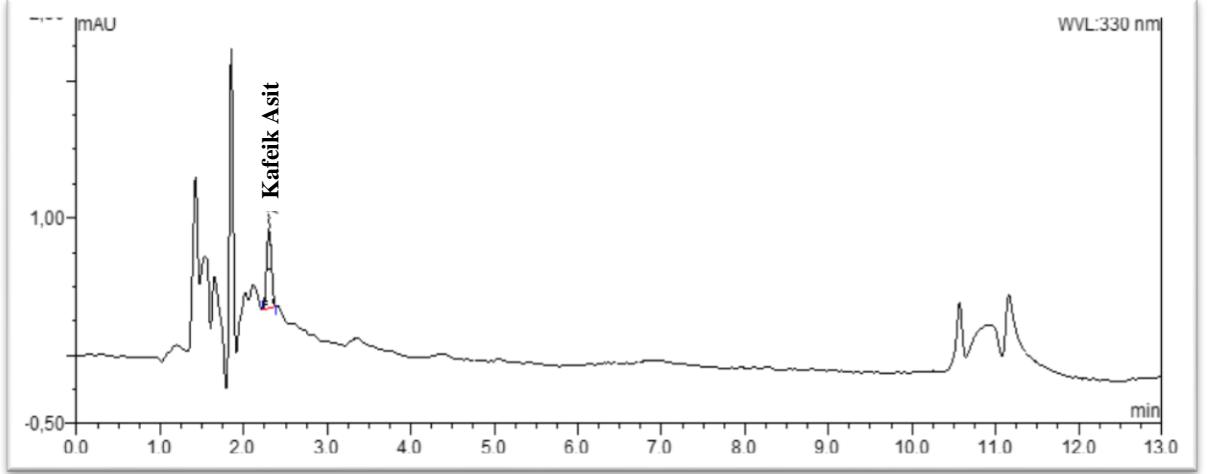
Bitki örneklerinden yapılan kafeik asit ve beta karoten pik alanlarına göre, en fazla miktarların *C. officinalis* hücre süspansiyon kültürleri MS1 besin ortamından elde edildiği belirlenmiştir.

C. officinalis türüne ait MS1 besin ortamındaki hücre süspansiyonlarının 4. kültür sonunda en yüksek kafeik asit miktarı 268.585 µg/g kuru ağırlık olarak belirlenmiştir. HPLC kromatogramında tutulma zamanının 2,328 dk olduğu saptanmıştır (Şekil 4.34).



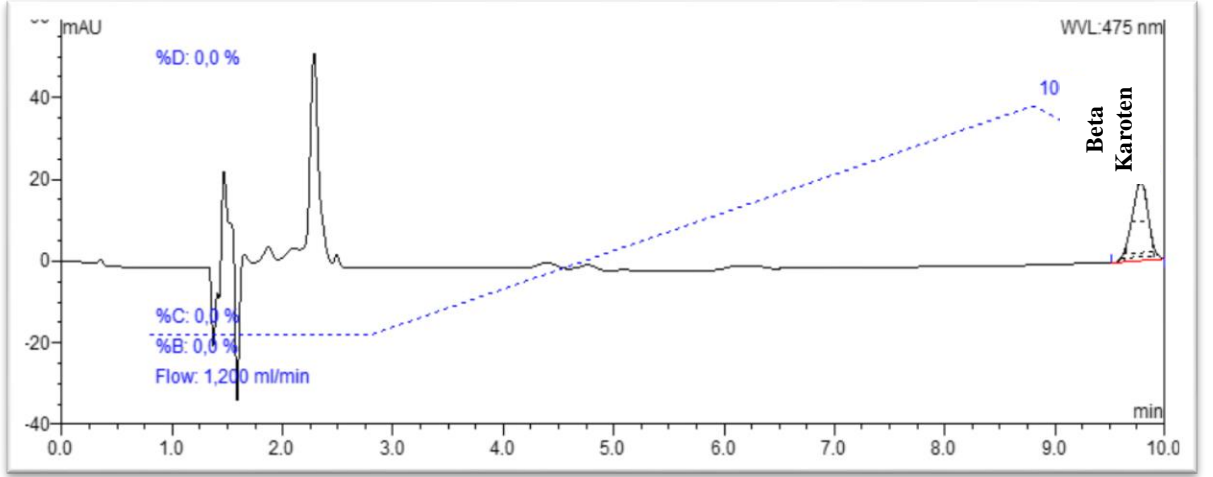
Şekil 4.34. *C. officinalis* MS1 besin ortamı hücre süspansiyonları 4. kültür sonunda kafeik asit piki kromatogramı

C. arvensis türüne ait MS1 besin ortamındaki hücre süspansiyonlarının 4. kültür sonunda en yüksek kafeik asit miktarı 235.868 $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık olarak belirlenmiştir. HPLC kromatogramında tutulma zamanının 2,332 dk olduğu saptanmıştır (Şekil 4.35).



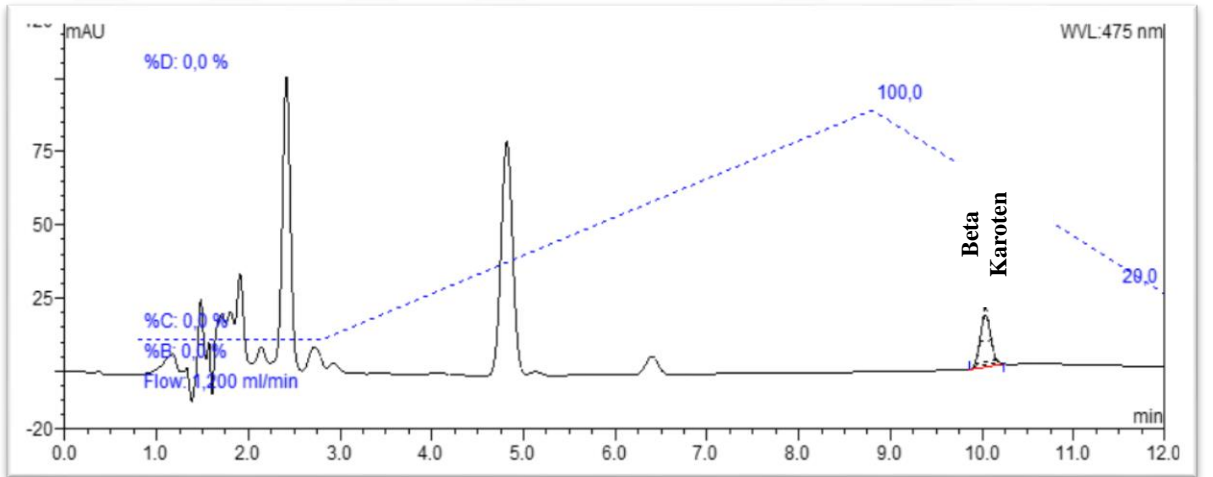
Şekil 4.35. *C. arvensis* MS1 besin ortamı hücre süspansiyonları 4. kültür sonunda kafeik asit piki kromatogramı

C. officinalis türüne ait MS1 besin ortamındaki hücre süspansiyonlarının 4. kültür sonunda en yüksek beta karoten miktarı 523.685 $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık olarak belirlenmiştir. HPLC kromatogramında tutulma zamanının 9,619 dk olduğu saptanmıştır (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. *C. officinalis* MS1 besin ortamı hücre süspansiyonları 4. kültür sonunda beta karoten piki kromatogramı

C. arvensis türüne ait MS1 besin ortamındaki hücre süspansiyonlarının 4. kültür sonunda en yüksek beta karoten miktarı 385.115 $\mu\text{g/g}$ $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık olarak belirlenmiştir. HPLC kromatogramında tutulma zamanının 9.817 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. *C. arvensis* MS1 besin ortamı hücre süspansiyonları 4. kültür sonunda beta karoten piki kromatogramı

C. officinalis ve *C. arvensis* kafeik asit miktarları karşılaştırıldığında; en fazla kafeik asit miktarının *C. officinalis* hücre süspansiyon kültürününün 120. gününde sırasıyla MS1 besin ortamından (268.585 $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık) ve bunu takiben *C. arvensis* MS1 besin

ortamından (235.865 µg/g kuru ağırlık) elde edildiği belirlenmiştir. *C. officinalis* kafeik asit miktarının; *in vivo* olarak yetiştirilen 60. günündeki bitki yapraklarında (0.425µg/g kuru ağırlık), kallus kültüründe en fazla miktarın elde edildiği MS1 besin ortamında gelişen 120. günündeki kalluslara (0.406 µg/g kuru ağırlık) nazaran daha fazla olduğu tespit edilmiştir. *In vitro* olarak yetiştirilen *C. officinalis* yapraklarında (0,383 µg/g kuru ağırlık) ve *C. arvensis* yapraklarında (0.140 µg/g kuru ağırlık), sırasıyla *C. officinalis* ve *C. arvensis* kallus kültürleri MS3, MS4, MS6 besin ortamlarına göre daha fazla kafeik asit miktarına sahip olduğu saptanmıştır.

C. arvensis türünde en fazla kafeik asit miktarı; hücre süspansiyon kültürü 120. gününde sırasıyla MS1 (235,865 µg/g kuru ağırlık) ve MS4 besin ortamında (203.435 µg/g kuru ağırlık) belirlenmiştir. *C.arvensis* 120. günündeki kallus kültürlerinde en fazla kafeik asit miktarının; sırasıyla MS1 (0.267 µg/g kuru ağırlık) ve MS4 (0.161 µg/g kuru ağırlık) besin ortamından elde edildiği tespit edilmiştir.

C. officinalis ve *C. arvensis* türlerinin MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamlarında geliştirilen hücre süspansiyon kültürlerinde saptanan kafeik asit ve beta karoten miktarının, kallus kültürlerinde saptananlara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. *In vivo* yetiştirilen 60. günündeki *C. officinalis* ve *C. arvensis* yapraklarında saptanan kafeik asit ve beta karoten miktarları, *in vitro* yetiştirilen 60. günündeki *C. officinalis* ve *C. arvensis* yapraklarında saptanan miktarlara göre daha fazla olduğu ortaya konmuştur.

Kafeik asit miktarı; *in vivo* yetiştirilen 60. günündeki *C. officinalis* yapraklarında (0.425 µg/g kuru ağırlık) kallus kültüründen en fazla elde edilen miktara (0.406 µg/g kuru ağırlık) göre daha fazla saptanırken, *in vivo* yetiştirilen 60. günündeki *C. arvensis* yapraklarında (0.243 µg/g kuru ağırlık) kallus kültüründen en fazla elde edilen miktara (0.267 µg/g kuru ağırlık) göre daha az olduğu saptanmıştır.

In vitro yetiştirilen 60. gününde *C. officinalis* ve *C. arvensis* yapraklarından elde edilen kafeik asit miktarları (sırasıyla 0.383; 0.140 µg/g kuru ağırlık); 120. gününde kallus kültürüne (MS3, MS4, MS6) göre daha fazla miktarda belirlenirken, *in vivo* yetiştirilen 60. günündeki *C. officinalis* ve *C. arvensis* yapraklarındakine göre (sırasıyla 0.425; 0.243 µg/g kuru ağırlık) daha az miktarda olduğu belirlenmiştir.

C. officinalis ve *C. arvensis* türlerinin MS1 besin ortamındaki hücre süspansiyon kültürünün 120. gününde beta karoten miktarları sırasıyla 523,685 µg/g ve 385.115 µg/g kuru ağırlık olarak belirlenmiştir.

In vivo ve *in vitro* olarak yetiştirilen 0, 15, 30, 45, 60 günlük *C. officinalis* ve *C. arvensis* yapraklarından (Çizelge 4.9); MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamlarının

bulunduğu kallus kùltüründe 0. günden itibaren her kallus alt kùltürü sonunda ve MS1, MS3, MS4, MS6 besin ortamlarının bulunduğu hücre süspansiyon kùltüründe 0. günden itibaren her kùltürün stasyonel fazında (Çizelge 4.10) elde edilen kafeik asit ve beta karoten HPLC analiz sonuçlarına ait ortalama miktarlar ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık) ve ortalama standard sapmalar belirlenmiştir.

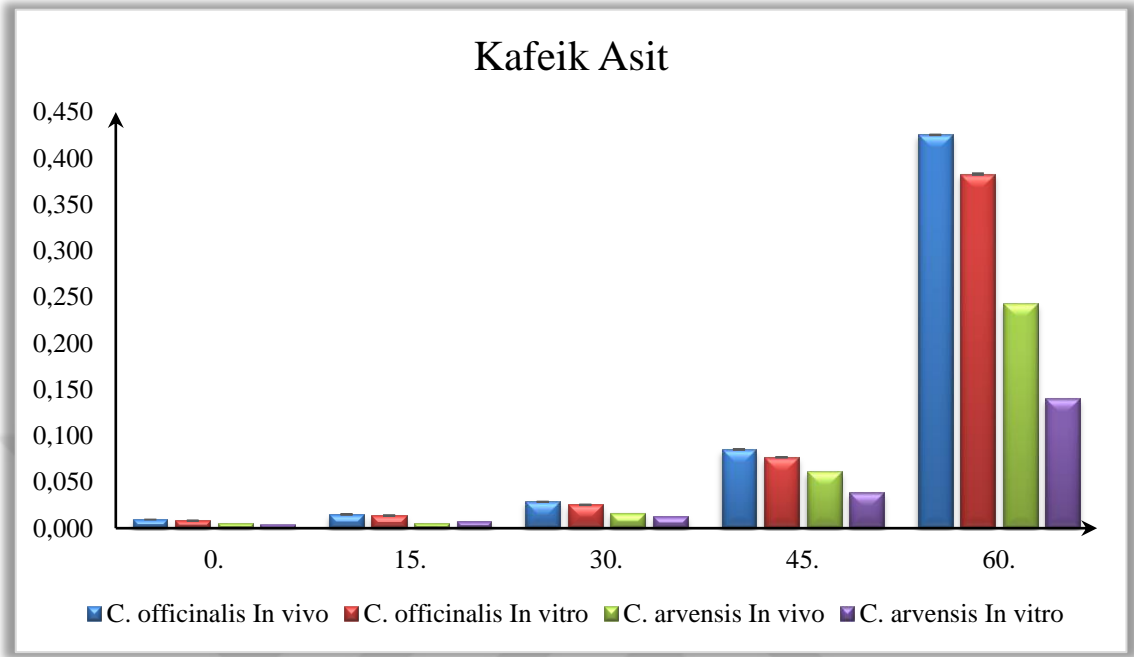
Çizelge 4.9. *In vivo* ve *in vitro* olarak yetiştirilen *C. officinalis* ve *C. arvensis* türlerinde kafeik asit ve beta karoten miktarı ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)

Kùltür	Besin Ortamı	Gün	Kafeik Asit ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)		Beta Karoten ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)	
			<i>C. officinalis</i>	<i>C. arvensis</i>	<i>C. officinalis</i>	<i>C. arvensis</i>
<i>In vivo</i>	Torf	0	0,009±0	0,006±0	0,023±0,009	0,016±0
		15	0,015±0	0,005±0,006	0,028±0,009	0,021±0
		30	0,029±0	0,016±0	0,057±0,017	0,043±0
		45	0,085±0	0,061±0	0,17±0,051	0,133±0
		60	0,425±0	0,243±0	0,887±0,164	0,672±0
<i>In vitro</i>	MS0	0	0,008±0	0,004±0	0,021±0,008	0,014±0
		15	0,014±0	0,007±0,002	0,026±0,008	0,019±0
		30	0,025±0	0,013±0,002	0,051±0,015	0,039±0
		45	0,077±0	0,039±0,023	0,153±0,046	0,12±0
		60	0,383±0,001	0,14±0,111	0,817±0,16	0,606±0,003

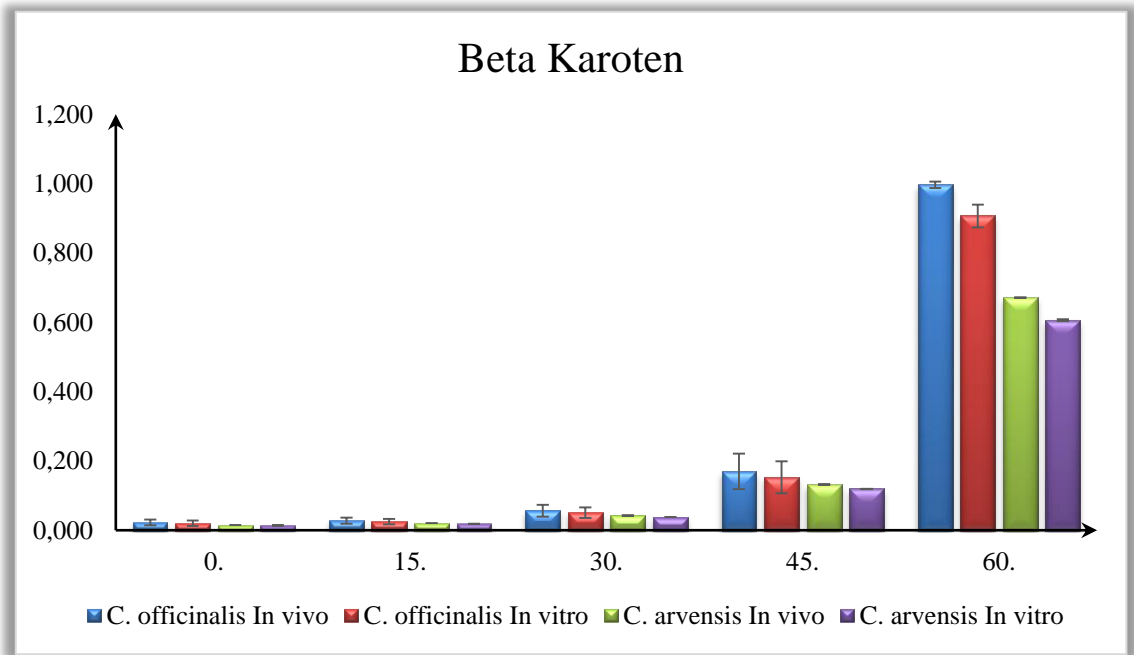
Çizelge 4.10. *C. officinalis* ve *C. arvensis* kallus kültüründe ve hücre süspansiyon kültürlerinde kafeik asit ve beta karoten miktarı ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)

Kültür	Besin Ortamı	Gün	Kafeik Asit ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)		Beta Karoten ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)		
			<i>C. officinalis</i>	<i>C. arvensis</i>	<i>C. officinalis</i>	<i>C. arvensis</i>	
Kallus Kültürü	MS1	0	0,009±0,001	0,006±0,001	0,022±0,008	0,013±0,002	
		30	0,014±0,001	0,01±0,002	0,027±0,008	0,018±0,002	
		60	0,027±0,001	0,016±0,003	0,054±0,016	0,037±0,005	
		90	0,081±0	0,066±0,004	0,162±0,049	0,115±0,016	
		120	0,406±0,001	0,267±0,004	0,812±0,244	0,581±0,08	
	MS3	0	0,017±0,014	0,003±0,001	0,019±0,009	0,01±0,001	
		30	0,022±0,016	0,005±0,002	0,022±0,009	0,013±0,001	
		60	0,023±0,015	0,01±0,003	0,028±0,011	0,018±0,001	
		90	0,038±0,017	0,023±0,001	0,056±0,022	0,037±0,002	
		120	0,117±0,02	0,064±0,004	0,225±0,089	0,154±0,009	
	MS4	0	0,017±0,014	0,005±0,001	0,02±0,009	0,011±0,002	
		30	0,021±0,014	0,007±0,002	0,024±0,009	0,015±0,002	
		60	0,027±0,014	0,012±0,003	0,036±0,013	0,023±0,003	
		90	0,052±0,014	0,032±0,004	0,089±0,033	0,059±0,007	
		120	0,202±0,014	0,161±0,004	0,4±0,148	0,271±0,033	
	MS6	0	0,019±0,02	0,003±0,001	0,017±0,008	0,009±0,001	
		30	0,017±0,014	0,004±0,002	0,019±0,008	0,011±0,001	
		60	0,018±0,014	0,005±0,003	0,021±0,009	0,013±0,001	
		90	0,021±0,013	0,007±0,004	0,032±0,014	0,02±0,001	
		120	0,045±0,013	0,026±0,004	0,117±0,01	0,063±0,002	
	Hücre Süspansiyon Kültürü	MS1	0	4,055±0,007	1,36±1,853	8,115±2,44	5,81±0,806
			30	13,15±0,141	8,685±0,021	17,115±2,44	14,81±0,806
			60	27,25±0,141	20,68±0,028	51,345±7,319	44,445±2,425
			90	93,525±0,318	78,535±0,587	184,545±0,7	177,965±9,482
120			268,585±1,633	235,865±0,021	523,685±0,049	385,115±0,134	
MS3		0	1,17±0,198	0,645±0,049	2,25±0,891	1,545±0,092	
		30	6,485±0,163	2,685±0,021	4,56±0,283	5,205±0,163	
		60	14,125±0,163	9,43±0,028	13,58±0,198	15,675±2,454	
		90	49,14±0,141	47,225±0,035	35,465±0,205	54,885±8,62	
		120	191,65±0,283	169,99±0,071	225,84±0,141	236,33±6,93	
MS4		0	2,02±0,141	1,61±0,042	4±1,485	2,705±0,332	
		30	9,03±0,156	5,625±0,021	11±1,485	9,15±1,117	
		60	20,64±0,156	12,82±0,028	25,295±3,401	21,05±2,588	
		90	73,99±0,156	50,815±0,035	93,57±8,712	75,215±10,161	
		120	213,36±0,141	203,435±0,064	325,48±0,141	309,87±0,057	
MS6		0	0,445±0,134	0,26±0,042	1,17±0,099	0,625±0,021	
		30	5,35±0,141	3,775±0,021	3,465±0,148	2,195±0,078	
		60	10,605±0,148	8,67±0,028	11,45±0,283	8,78±0,311	
		90	34,76±0,141	23,165±0,035	35,865±0,078	39,505±1,421	
		120	121,66±0,283	102,54±0,057	152,545±0,148	131,62±3,536	

In vivo ve *in vitro* olarak yetiştirilen *C. officinalis* ve *C. arvensis* yapraklarında saptanan kafeik asit miktarlarına ait bulgular Şekil 4.38’de ve Şekil 4.39’da verilmiştir.

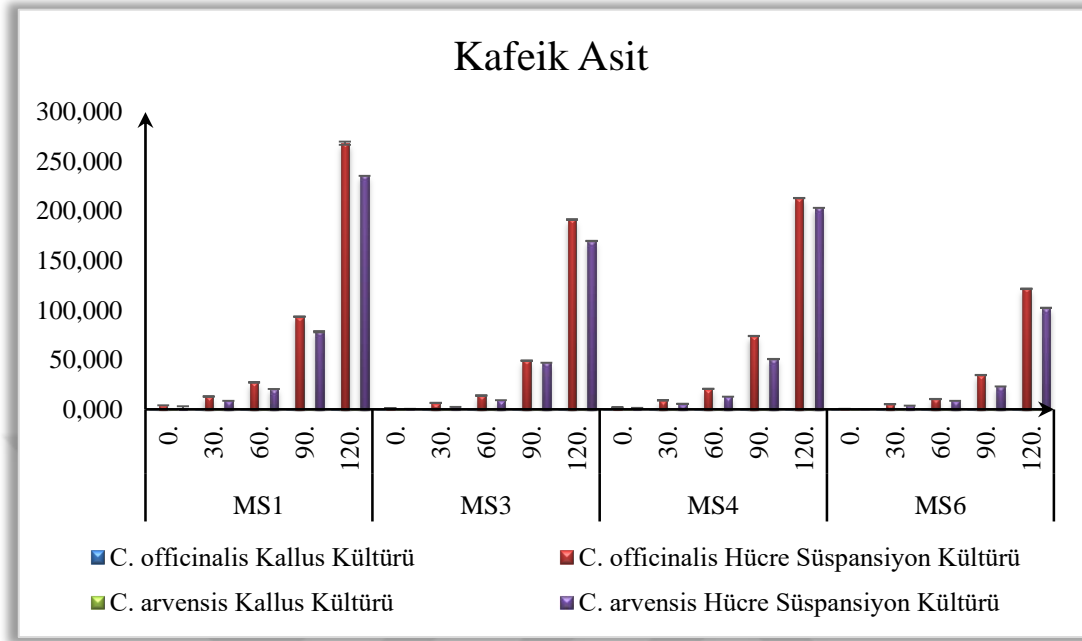


Şekil 4.38. *In vivo* ve *in vitro* olarak yetiştirilen *C. officinalis* ve *C. arvensis* yapraklarında saptanan kafeik asit miktarları ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)

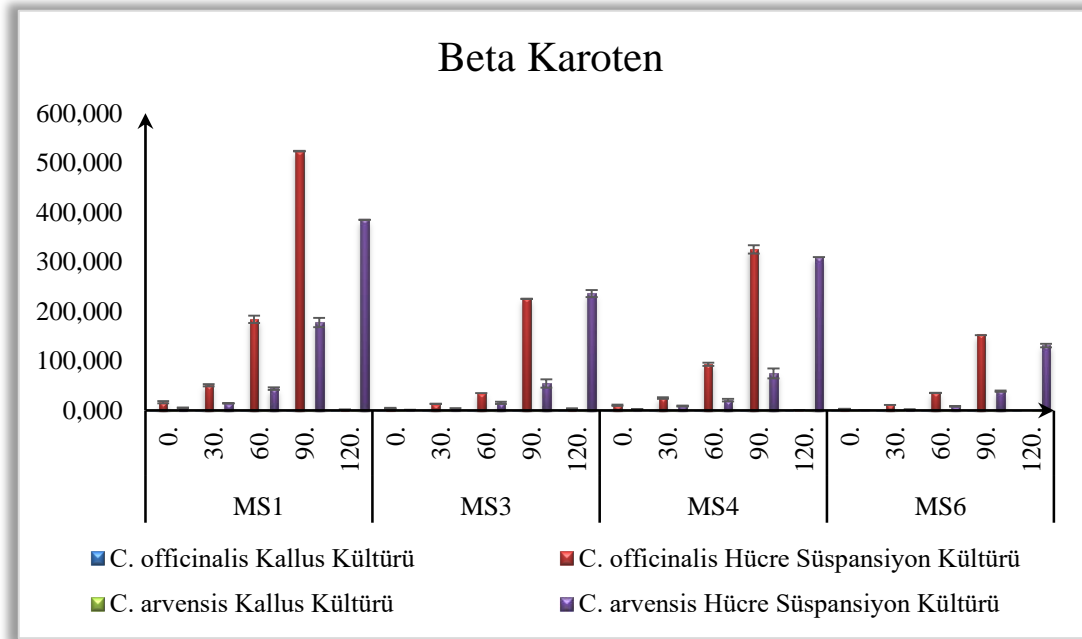


Şekil 4.39. *In vivo* ve *in vitro* olarak yetiştirilen *C. officinalis* ve *C. arvensis* yapraklarında saptanan beta karoten miktarları ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)

C. officinalis ve *C. arvensis* kallus kültüründe ve hücre süspansiyon kültüründe saptanan kafeik asit miktarlarına dair bulgular Şekil 4.40'da ve Şekil 4.41'de verilmiştir.



Şekil 4.40. *C. officinalis* ve *C. arvensis* kallus kültüründe ve hücre süspansiyon kültüründe saptanan kafeik asit miktarları (µg/g kuru ağırlık)



Şekil 4.41. *C. officinalis* ve *C. arvensis* kallus kültüründe ve hücre süspansiyon kültüründe saptanan beta karoten miktarları (µg/g kuru ağırlık)

Anca ve ark. (2012), *C. officinalis* türü ile ilgili yaptıkları bir araştırmada HPLC analizlerine göre kafeik asit miktarını 148.3 µg/g ve toplam fenolik türevlerinin konsantrasyonunu 2195.0 µg/g olarak saptamışlardır. Araştırmamızda *in vivo* olarak yetiştirilen *C. officinalis* ve *C. arvensis* yapraklarında 60. günde saptanan kafeik asit miktarları sırası ile 0,425 ve 0,243 µg/g kuru ağırlık olarak belirlenmiştir.

Ćurković-Perica ve ark. (2014), Asteraceae familyasından *C. rupestris* türü ile ilgili yaptıkları araştırmada, en yüksek kafeik asit miktarının *in vivo* olarak yetiştirilen yapraklarda 789.84 µg/g, bunu takiben çiçeklerde 109.18 µg/g ve köklerde 99.34 µg/g kuru ağırlık olarak belirlemişlerdir. Kallus ve *in vivo* sürgünlerde kafeik asit miktarı 33.77 µg/g kuru olarak saptanmıştır.

Bunghez ve Ion (2011), *C. officinalis* türünün yaprak ve çiçek kısımlarından UV-VIS ve FT-IR spektrofotometrik yöntemleri ile beta karoten pigmentinin çok miktarda bulunduğunu ortaya koymuştur. Bakó ve ark. (2002), *C. officinalis* türünün köklerinin, yapraklarının, petallerinin ve polenlerinin karotenoid bileşiminin analizini HPLC ile yapmışlardır. Yapraklarda çoğunlukla β-karoten bileşiklerinin olduğu saptanmıştır. Britton ve ark. (1995), tipik yeşil dokuların bileşimi arasında çeşitli karotenoidlerin yanı sıra β-karoten bileşiğini de içerdiğini tespit etmiştir. Nan ve ark. (2012), *Inula helenium* L. (Asteraceae) türünün yapraklarında, temel olarak 38.7% β-karoten olduğunu ve 18.84 µg/g miktarda bulunduğunu saptamıştır. Yapraklardaki toplam karotenoid miktarı (48.7 µg/g taze ağırlık) olarak belirlenmiştir. İnfloresanslarında ise beta karoten miktarı 1.33 µg/g olarak saptanmıştır. Tamamlanan araştırmamızda *C. officinalis* ve *C. arvensis* türlerinin yaprak eksplantlarında beta karoten varlığı saptanmıştır. *C. officinalis* türündeki beta karoten miktarının fazlalığı dikkati çekmektedir.

Dumbrava ve ark. (2013), *C. officinalis* türünün çiçeklerinden petroleum eter: etanol 96% (8:2, v/v) olarak hazırlanan çözücü kullanılarak ekstrakt hazırlanmıştır. Toplam karotenoidler ve β-karoten RP-HPLC ile belirlenmiştir. *C. officinalis* çiçeklerinden hazırlanan karotenoid ekstreğinde en yüksek toplam karotenoid miktarı (1667.42 µg/g) ve β-karoten miktarı (145.45 µg/g) saptanmıştır.

Nan ve ark. (2012), *Inula helenium* L. (Asteraceae) türünde infloresanslarda, β-karoten miktarını (1.33 µg/g) belirlemiştir.

Legha ve ark. (2012), *C. officinalis* kallus kültürlerindeki karotenoid miktarının, sıvı ortamda büyüyenlere göre yarı katı ortamda büyüyen kültürlerde çok az artmış olduğunu belirtmiştir. Tamamlanan araştırmamızda da *C. officinalis* ve *C. arvensis* hücre

süspansiyon kültürlerindeki kafeik asit ve beta karoten miktarlarının, kallus kültüründe saptananlara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Chakraborty ve ark. (2010), *C. officinalis* türünün doğadan topladıkları çiçeklerini kurularak metanol ekstraktlarını hazırlamışlardır. Bu ekstrakt içinde bulunan kuersetin miktarını HPTLC analizi ile belirlemişlerdir. Bu yöntemin rutin olarak kullanılan diğer kuersetin belirleme yöntemlerine göre daha hızlı ve ucuz olduğunu saptamışlardır. Sujatha ve ark. (2011), *C. officinalis* türünün çiçeklerinde yaptıkları HPLC analizinde kuersetin bileşimini 8.72% olarak belirlemişlerdir. Araştırmamızda, *C. officinalis* çiçeklerinden kuersetin analizi yapılmamıştır. Fakat yaprak, kallus kültüründe ve hücre süspansiyon kültüründe yapılan HPLC analizlerinde kuersetin bileşimine rastlanmamıştır.

Ćurković-Perica ve ark. (2014), *Centaurea rupestris* (Asteraceae) türünün kültüründe kuersetin bileşiminin tespit edilmediğini belirtmiştir. Araştırmamızda da, kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde kuersetin saptanmamıştır.

Dlugosz ve ark. (2013), *C. officinalis* hücre süspansiyon kültürleri üzerine yaptıkları bir araştırmada, üretilen sekonder metabolit konsantrasyonu ile kültürlerdeki hücrelerin taze ve kuru ağırlıkları arasında pozitif ilişki olduğunu saptamıştır. Çalışmamızda da taze ve kuru ağırlığın en fazla olduğu (her kültürün 30. gününde) zaman kafeik asit ve beta karoten miktarlarının maksimum miktarda olduğu saptanmıştır.

Heng ve ark. (2013), *Artemisia annua* L. (Asteraceae) hücre süspansiyon kültüründe en yüksek ağırlığın kültürün 16. gününde elde edildiğini ve kültürün bu periyodunda araştırılan artemisinin sekonder metabolit miktarının 60.5 µg/g kuru ağırlık olduğu saptamıştır. Maksimum sekonder metabolit miktarının ise, *A. annua* hücre süspansiyon kültürleri 12. gününde (64.1±2.7 µg/g kuru ağırlıkta) saptandığı belirtilmiştir. Dwivedi ve ark. (2016) *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) türü ile yaptıkları araştırmada, steviosid sekonder metabolitinin hücre süspansiyon kültürünün log fazında bol miktarda oluştuğunu belirtmişlerdir. Bunun aksine çalışmamızda kafeik asit ve beta karoten miktarlarının hücre süspansiyon kültürlerinin 25-30. günlerindeki durağan fazda daha fazla üretildiği belirlenmiştir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tamamlanan doktora tezimizde tıbbi ve ekonomik öneme sahip olan *C. officinalis* ve *C. arvensis* bitki türleri farklı koşullarda yetiştirilerek sekonder metabolitlerinin analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan literatür araştırması göz önünde bulundurularak *C. officinalis* ve *C. arvensis* türünde fazla miktarlarda bulunduğu saptanan ve *in vitro* kültürlerdeki miktarları araştırılmayan tıbbi öneme sahip olan kuersetin, kaemferol, kafeik asit ve beta karoten bileşikleri seçilmiştir.

In vivo ve *in vitro* şartlarda yetiştirilen *C. officinalis* ve *C. arvensis* yapraklarında; kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde belirtilen sekonder metabolitlerin değişen miktarları HPLC ile analiz edilmiştir. Bu nedenle öncelikle tohum çimlendirilmesi aşaması yapılmıştır. *C. officinalis* ve *C. arvensis* türlerinin tohumlarında (aken tipi) fiziksel dormansi çeşidi olan testa dormansisi olduğundan dolayı, tohumdan bitki yetiştirilmesinde tohum kabukları çıkarılarak *in vitro* kültürde embriyo ekimi yapılmıştır. Ayrıca çalışmamızda tohum kabukları çıkarılmadan önce tohumlara hidropriming (H₂O), halopriming (KNO₃), bazı bitki büyüme düzenleyicileri (GA₃) ile muamele ve prechilling (+4°C) gibi bazı ön uygulamaların (priming) yapılmasının tohum çimlenme yüzdesini arttırdığı belirlenmiştir. MS besin ortamına aktif karbon eklendiğinde köklerde daha fazla emici tüy oluştuğu gözlenmiştir. *In vivo* bitki yetiştirilmesi için, *in vitro* kültürde optimizasyonu sağlanan yöntem ile muamele edilen tohumlar belirlenen en iyi yetiştirme ortamı olan torfa aktarılmıştır. Bu nedenle çalışılacak bitkinin tohum yapısı göz önünde bulundurularak tohum çimlendirilmesi gerçekleştirilmelidir. Tohum dormansisini aşarak çimlenmeyi sağlamak veya çimlenme yüzdesini arttırmak amacıyla tohumlara araştırmamızda yaptığımız ön uygulamalar dışında ozmotik basıncın oluşturulması amacıyla PEG gibi moleküler ağırlığı yüksek tuzlar ya da bileşikler kullanılarak osmopriming; termopriming; skarifikasyon (asit, sıcak su vb. ile mekanik aşındırma); strafikasyon ve biopriming gibi ön uygulamalar yapılabilmektedir (Desai, 2004; Dalil, 2014). Ayrıca çimlenme yüzdesini arttırmak amacıyla KNO₃, GA₃ vb. besin ortamına da uygun konsantrasyonlarda eklenebilir.

Kallus elde etmek için, *in vitro* olarak yetiştirilen *C. officinalis* ve *C. arvensis* yaprak eksplantları 12 farklı MS besin ortamına yerleştirilmiştir. Kallus alt kültürleri süresince 4 farklı MS besin ortamından, hücre süspansiyon kültürlerine geçiş yapmak için gerekli olan kallus özellikleri (beyaz, açık yeşil ve açık kahverengi) ve en fazla kallus biyokütlesi elde

edilmiştir. Böylece kallus kültürü optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra hücre süspansiyon kültürüne geçiş yapılmıştır. Hücre süspansiyon kültüründe, kallus kültüründe optimizasyonu sağlanan MS besin ortamları kullanıldığında kültürlerin dinamik olduğu gözlemler ve yapılan ölçümlerle doğrulanmıştır. Hücre süspansiyon kültürlerinde kültür süresinin ve çalkalama hızının önemi büyüktür bu nedenle hücre yaşam döngüsünün iyi şekilde belirlenmesi önem arz etmektedir. Bu nedenle çalışma süresince bitkisel materyalin durumu nitel ve nicel olarak gözlenmelidir. Planlanan araştırmalarda fazla sayıda bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarını içeren farklı MS ortamları ile optimizasyon çalışmalarına başlamak her zaman avantajlıdır.

HPLC analizinde, araştırılan sekonder metabolitler için uygun olan standard hazırlanışı, ekstraksiyon yöntemi ve HPLC koşulları optimize edilmiştir. Fenolik bileşiklerin (flavonoid, fenolik asit) ve karotenoidlerin (beta karoten) HPLC analizi amacıyla farklı ekstraksiyon yöntemi, kullanılmıştır. Fenolik bileşikler suda; karotenoidler ise yağda çözünen bileşiklerdir. Karotenoidler polar ve apolar çözücülerde çözünmektedir. Araştırmamızda bu durum dikkate alınarak standard hazırlanmıştır ve ekstraksiyon yapılmıştır. Bu nedenle çalışılacak olan sekonder metabolitlerin hangi çözücüde çözüldüğü bilinerek uygun olan ekstraksiyon yöntemi seçmek önemlidir.

Bitki büyüme düzenleyicilerinin *in vitro* kültürlerle eklenmesinin artemisinin (McCoy, 2013); esansiyal yağlar, menthon, mentol, pulegon ve mentafuran (Santoro ve ark., 2013); furanokumarinler ve fenolik asitler (Szopa ve Ekiert, 2015) gibi sekonder metabolitlerin fazla miktarda eldesi üzerinde önemli olmaktadır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin hücre süspansiyon kültürlerine eklenmesi sayesinde taksol (Ashrafi ve ark., 2010); flavonoidler (Tan ve ark., 2010; Bota ve Deliu, 2015); artemisinin (Mohammad et al., 2014) gibi çeşitli sekonder metabolitlerin fazla miktarlarının elde edildiği bilinmektedir. Çalışmamızda da NAA:BAP (1:1 mg/l; 0.5:5 mg/l) ve IAA:BAP (1:1 mg/l; 0.5:5 mg/l) eklenen hücre süspansiyon kültürlerinin 120. gününde yapılan HPLC analizleri sonucunda, kafeik asit ve beta karoten miktarları fazla saptanmıştır. Her iki *Calendula* türünde de, hücre süspansiyon kültüründe biriken kafeik asit ve beta karoten miktarlarının *in vivo* ve *in vitro* koşullarda yetiştirilen bitki yapraklarındaki ve kallus kültüründe biriken miktarlara kıyasla daha fazla olduğu saptanmıştır. Kafeik asit'in antioksidan (Veira ve ark., 1998), antitümör (Tanaka ve ark.,1993), antienflamatuvar (Fernandez ve ark., 1998) aktivitesine ve HIV replikasyonunu inhibe etme özelliğine (Fesen ve ark., 1993; Kashiwada ve ark., 1995) sahip olduğu bilinmektedir. Beta karoten'in ise vitamin A'nın etkili bir kaynağı olduğu gibi, yaşa bağımlı makular dejenerasyon riskini;

menapoz öncesi kadınlarda göğüs kanseri riskini azaltmada kullanıldığı (Thomsen ve ark., 1979; Seddon ve ark., 1994; Gandini ve ark., 2000), antioksidan (Sies and Stahl, 1995; Wang ve ark., 1999), antitümör (Edes ve ark., 1989; Acevedo and Bertram, 1995; Gregus ve Klaassen, 1996) özelliği, kalp ve kanser hastalıklarına karşı korunmada ve bu hastalıkların tedavisinde (Tavani ve La Vecchia, 1999) etkili olduğu kanıtlanmıştır. Çalışmamızda *C. officinalis* ve *C. arvensis* hücre süspansiyon kültüründe oluşan kafeik asit ve beta karoten miktarlarının, literatürde *C. officinalis* yapraklarından elde edilen kafeik asit miktarına (Anca ve ark., 2012) ve *C. officinalis* çiçeklerinden elde edilen beta karoten miktarına (Dumbrava ve ark., 2013) göre fazla olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda bitki büyüme düzenleyicilerinin hücre süspansiyon kültüründe tıbbi ve ekonomik önemi olan kafeik asit ve beta karoten bileşiklerinin daha fazla miktarlarda eldesinin sağlanması sayesinde literatürde eksik olan kısım tamamlanmıştır. Bundan sonra hücre süspansiyon kültüründen sonraki aşamada daha büyük ölçekli kültürler olan biyoreaktörlerde kafeik asit ve beta karoten bileşiklerinin çalışılabilmesi için avantaj sağlayacaktır. Günümüzde sekonder metabolitlerin biyoreaktörler yolu ile ticari olarak elde edilebilmesi için yapılan çalışmalarda artemisinin (Patra ve Srivastava, 2016; Patra ve Srivastava, 2014; Patra ve Srivastava, 2015), azadirakhin (Srivastava ve Srivastava, 2012) sekonder metabolitlerinin elde edildiği belirtilmiştir.

Kuersetin ve kaemferol bileşikleri *C. officinalis* ve *C. arvensis* türlerine ait yapraklardan, yaprak eksplantları ile başlatılan kallus kültüründen ve devamındaki hücre süspansiyon kültüründen alınan örneklerin ekstraksiyonunun çeşitli çözücülerde yapılmasına rağmen belirlenememiştir. Yapılan farklı araştırmalarda sekonder metabolitlerin belirlenebilmesi için bitkilere ait olan farklı kısımlar (çiçek) kullanılmıştır (Cetkovic ve ark., 2003; Chakraborty ve Ghorpade, 2010; Sujatha ve ark., 2011; Rigane ve ark., 2013). Bu kısımların analizleri için HPLC dışında HPLC-PDA (Bhatnagar-Panwar ve ark., 2015), HPTLC (Chakraborty ve Ghorpade, 2010; Sujatha ve ark., 2011), TLC (Vidal-Ollivier ve ark., 1989; Cetkovic ve ark., 2003), RP-HPLC (Rigane ve ark., 2013), LC-MS (Rigane ve ark., 2013) ve spektrofotometri gibi farklı cihazlar kullanılmıştır. Bundan sonra *C. officinalis* ve *C. arvensis* türlerinde yapılması planlanan bilimsel araştırma ve projeler kapsamında kuersetin ve kaemferolün de bulunduğu diğer sekonder metabolitlerin analizinin yapılabilmesi için yaprak dışındaki diğer bitki kısımlarının (çiçek, meyve vb.) ve farklı analiz yöntemlerinin kullanılması sonucunda daha çeşitli sekonder metabolit içeriklerinin ve miktarlarının saptanabileceği düşünülmektedir.

Günümüze kadar çok farklı araştırma grupları tarafından bitki doku kültürleri yolu ile sekonder metabolitlerin eldesi ve veriminin arttırılmasına yönelik yapılan çalışmaları. kimi araştırmacılar toplu halde değerlendirerek sekonder metabolit eldesinde hücre süspansiyon kültürlerinin önemini ve klasik yaklaşımlarla ekonomik yönden kıyaslamasını tartışmıştır (Akçam Oluk E, 2006). Tamamlanan doktora tez projemiz ile bu konudaki verilere yeni bilgilerin eklenmesi sağlanmıştır.



KAYNAKLAR

- Acevedo P., Bertram J.S., 1995. Liarozole Potentiates The Cancer Chemopreventive Activity of and The Up-Regulation of Gap Junction Communication and Connexin 43 Expression by Retinoic Acid and Beta-Carotene in 10T1/2 Cells. *Carcinogenesis*, 16: 2215–2222.
- Ahmad S., Qureshi S., Atig-Ur R., Zakir-Ur R., Badar Y., 2000. Antipyretic and Analgesic Activity in Crude Ethanolic Extract of *Calendula officinalis* Linn. *PCSIR.*, 43 (1): 50-54.
- Akçam Oluk E. ve Demiray H., 2000. Habitüe Edilmiş *Catharanthus roseus* Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Alkaloid Miktarları Değişiminin Araştırılması (Proje TBAG-1506 (196T034), Bornova, İzmir.
- Akçam Oluk E., Yürekli K.K., 1995. Effect of Different Nutrient Media and Explant Sources on Callus Induction of *Catharanthus roseus* L. *Tr. J. Bot.*, 19: 569-572.
- Akı C., 1997. *Capsicum Annuum* L.'un Bazı Varyeteleri Üzerinde Doku Kültürü Çalışmaları. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi, İzmir.
- Al-oubaidi H.K.M., Ameen A.S.M, 2014. Increasing Secondary Metabolites of *Calendula officinalis* L. Using Salicylic Acid *In vitro*. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 3 (5): 1146-1155.
- Amirghofran Z., Azadbakht M., Karimi M.H., 2000. Evaluation of The Immunomodulatory Effects of Five Herbal Plants. *J. Ethnopharmacol.*, 72 (1/2): 167-172.
- Amoros M.; Simoes C.M., Girre L., Sauvager F.; Cormier M., 1992. Synergistic Effect of Flavones and Flavonols Against Herpes simplex Virus Type 1 in Cell Culture. Comparison with The Antiviral Activity of Propolis. *J. Nat. Prod.*, 55 (12): 1732-40.
- Amudha P., Shanthi P., 2011. Indirect Organogenesis and *In vitro* Layering of *Acmella calva* (DC.) R.K. Jansen. From Various Explants. *Journal of Agricultural Technology*, 7 (3): 637-648.

- Anca B., Ranga F., Fetea F., Zăgrean F., Socaciu C., 2012. Fingerprint and Quantification of Phenolic Derivatives in *Melissa off.* and *Calendula off.* Extracts in Relation to Their Antioxidant Potential. *Hop and Medicinal Plants*, 20 (1-2): 80-86 pp.
- Anonim, 2005. Medicinal and Aromatic Plants Working Group-ECP/GR.
- Aoyagi, H., M. Okada, C. Akimoto. H. Katsuyana and S. Yoshida et al., 1996. Promotion Effect of Alginate on Chitinase Production by *Wasabia japonica*. *Biotechnol. Tech.*, 10: 69-654.
- Arnum S.D.V., Vitamin A Wiley Online Library, 2000.
- Aro A.A., Perez M.O., Vieira C.P., Esquisatto M.A., Rodriques R.A., Gomes L., Pimentel E.R., 2015. Effect of *Calendula officinalis* Cream on Achilles Tendon Healing. *Anat. Rec.*, 298 (2): 428-35.
- Arya D., Patni A., 2013. Comparative Analysis of Total Flavonoids and Quercetin Content *In vivo* and *In vitro* and Enhancement of Quercetin via Precursor Feeding in *Pluchea lanceolata* Oliver & Hiern. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 5 (3): 617-621.
- Arya D., Patni V., Kant U., 2008. *In vitro* Propagation and Quercetin Quantification in Callus Cultures of Rasna (*Pluchea lanceolata* Oliver & Hiern.). *Indian J. Biotechnol.*, 7 (3): 383-387.
- Ashour T.H., 2014. Preventative Effects of Caffeic Acid Phenyl Ester on Cadmium Intoxication Induced Hematological and Blood Coagulation Disturbances and Hepatorenal Damage in Rats. *ISRN Hematology*, vol. 2014, 7 pages.
- Ashrafi S., Mofid M.R., Otroshi M., Ebrahimi M., Khosroshahl M., 2010. Effects of Plant Growth Regulators on the Callogenesis and Taxol Production in Cell Suspension of *Taxus baccata* L. *Trakia Journal of Sciences*, 8 (2): 36-43. 36.
- Azırac S., 2007. Thymol ve Carvacrol'un *In vivo* Genotoksik Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye.
- Babaoğlu M., Yorgancılar M. ve Akbulak A. M. 2002. Doku Kültürü: Temel Laboratuar Teknikleri. Bitki Biyoteknolojisi (Vol 1), Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.

- Bachmetov L., Gal-Tanamy M., Shapira A., Vorobeychik M., Giterman-Galam T., Sathiyamoorthy P., Golan Goldhirsh A., Benhar I., Tur-Kaspa R., Zemel R., 2012. Suppression of Hepatitis C Virus by The Flavonoid Quercetin is Mediated by Inhibition of NS3 Protease Activity. *J Viral Hepat.*, 19: e81-e88.
- Baciu A.D., Mihalte L., Sestras A., Sestras R., 2010. Variability of Decorative Traits, Response to the Aphis Fabae attack and RAPD Diversity in Different Genotypes of Calendula. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38 (3): 265-270.
- Bakó E., Deli J., Toht G., 2002. HPLC Study on The Carotenoid Composition of Calendula Products. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 53 (1–3): 241–250.
- Barbosa, E.; Calzada, F.; Campos, R., 2007. *In vivo* Antigiardial Activity of Three Flavonoids Isolated of Some Medicinal Plants Used in Mexican Traditional Medicine for The Treatment of Diarrhea. *J. Ethnopharmacol.*, 109 (3): 552-4.
- Baron J.A., Cole B.F., Mott L., 2003. Neoplastic and Antineoplastic Effects of Beta Carotene on Colorectal Adenoma Recurrence: Results of A Randomized Trial. *J. Natl. Cancer Inst.*, 95 (10): 717-22.
- Bashir S, Janbaz KH, Jabeen Q, Gilani AH., 2006. Studies on Spasmogenic and Spasmolytic Activities of *Calendula officinalis* Flowers. *Phytother. Res.*, 20 (10): 906-10.
- Behbahani M., 2014. Evaluation of *In vitro* Anticancer Activity of *Ocimum Basilicum*, *Alhagi Maurorum*, *Calendula officinalis* and Their Parasite *Cuscuta campestris*. *Plos One*, 9 (12): e116049.
- Bertoni B.W., C.F. Damiano Filho, J.R. Moro, S.C. França and A.M.S. Pereira. 2006. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 8: 48-54.
- Bhatnagar-Panwar M., Bhatnagar-Mathur P., Bhaaskarla V.V., Dumbala S.R., Sharma K.K., 2015. Rapid, accurate and routine HPLC method for large-scale screening of pro-vitamin A carotenoids in oilseeds. *Plant Biochem. Biotechnol.*, 24 (1): 84–92.

- Bianca P.M., Annamaria P., Daniela G., 2011. The quantitative determination of active principles from *Calendula officinalis* L. inflorescences. *Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie și Tehnologii de Industrie Alimentară*, 12/B: 317-320.
- Boots A.W., Haenen G.R., Bast A., 2008. Health Effects of Quercetin: From Antioxidant to Nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.*, 585: 325-337.
- Bota C., Deliu C., 2015. Effect of Plant Growth Regulators on the Production of Flavonoids by Cell Suspension Cultures of *Digitalis lanata*. *Farmacia*, 63 (5): 716-719.
- Braun L., 2005. *Calendula*, *JCM*, 4 (6): 78-80.
- Britton G., 1995. Structure and Properties of Carotenoids in Relation to Functions. *The FASEB Journal*, 9: 1551–1558.
- Britton G., Khachik F., 2009. Carotenoids in food. In: Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H.P. (Eds.) Carotenoids. *Nutrition and Health*, 5: 45–66.
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds), 1995 – Carotenoids. Isolation and Analysis, Vol. 1A, Birkhäuser Verlag, Basel–Boston–Berlin, 20–236.
- Bunghez I.R., Ion R.M., 2011. Complex Spectral Characterization of Active Principles From Marigold (*Calendula officinalis*). *Journal of Science and Arts*, 1 (14): 59-64.
- Butcher D.N. ve Ingram D.S., 1976. *Plant Tissue Culture*. London, Arnold.
- Calderón-Montaña J.M., Burgos-Morón E., Pérez-Guerrero C., López-Lázaro M., 2011. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11 (4): 298-344.
- Callebaut A., Terahara N., De Haan M., Declaire M., 1997. Stability of Anthocyanin Composition in *Ajuga reptans* Callus and Cell Suspension Cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*; 50: 195-201.
- Calzada F., 2005. Additional Antiprotozoal Constituents From *Cuphea pinetorum*, A Plant Used in Mayan Traditional Medicine to Treat Diarrhoea. *Phytother. Res.*, 19: 725-7.
- Calzada, F.; Meckes, M.; Cedillo-Rivera, R., 1999. Antiamoebic and Antigiardial Activity of Plant Flavonoids. *Planta Med.*, 65: 78- 80.

- Campos L., Michielin E., Danielski L., Ferreira S. 2005. Experimental Data and Modeling The Supercritical Fluid Extraction of Marigold (*Calendula officinalis*) Oleoresin. *J. Supercritical Fluids*, 34: 163-170.
- Casierra-Posada F., Ávila-León O.F., 2015. Shade Tolerance of Marigold Plants (*Calendula officinalis*). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 18 (1): 119 – 126.
- Cerullo G., Polli D., Lanzani G., De Silvestri S., Hashimoto H., Cogdell R.J., 2002. Photosynthetic Light Harvesting by Carotenoids: Detection of an Intermediate Excited State. *Science*, 298: 2395-2398.
- Cetkovic G.S., Djilas S.M., Canadanovic-Brunet J.M., Tumbas V.T., 2004. Antioxidant Properties of Marigold Extracts, *Food Res. Int.*, 37 (7): 643-650.
- Chakraborty G.S., 2010. Phytochemical Screening of *Calendula Officinalis* Linn. Leaf Extract by TLC. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, 1 (1): 131-134.
- Chakraborty G.S., Ghorpade P.M., 2010. Determination of Quercetin by HPTLC in “*Calendula officinalis*” Extract. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1 (1): 1-4.
- Chakurski I., Matev M., Stefanov G., Koichev A., Angelova I., 1981. Lechenie na düodenalni iazvi i gastroduodeniti s bilkova kombinatsiia ot *Symphitum officinalis* i *Calendula officinalis* sus i bez antiatsidni sredstva, *Vutr Boles*. 20 (6): 44-7.
- Chao C., Mong M., Chan K., Yi M., 2010. Anti-glycative and Anti-inflammatory Effects of Caffeic Acid and Ellagic Acid in Kidney of Diabetic Mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54 (3): 388-395.
- Chen A.Y., Chen Y.C., 2013. A Review of the Dietary Flavonoid, Kaempferol on Human Health and Cancer Chemoprevention. *Food Chemistry*, 138 (4): 2099–2107.
- Chen B.H., Yang S.H., 1992. An Improved Analytical Method for the Determination of Carotenoids and Xanthophylls in Dried Plant Materilas and Mixed Feeds. *Food Chem.*, 44: 61-66.

- Choi G.N., Kim J.H., Kwak J.H., Jeong C.H., Jeong H.R., Lee U., Heo H.J., 2012. Effect of Quercetin on Learning and Memory Performance in ICR Mice Under Neurotoxic Trimethyltin Exposure. *Food Chem.*, 132: 1019- 1024.
- Coelho-Dos-Reis J.G., Gomes O.A., Bortolini D.E., Martins M.L., Almeida M.R., Martins C.S., Carvalho L.D., Souza J.G., Vilela J.M., Andrade M.S., Barbosa-Stancioli E.F., 2011. Evaluation of The Effects of Quercetin and Kaempferol on The Surface of MT-2 Cells Visualized by Atomic Force Microscopy. *J Virol Methods*, 174: 47-52.
- Cordova C.A., Siqueria I.R., Netto C.A., Yunes R.A., Volpato A.M., Cechinel Filho V., Curi-Pedrosa R., Creczynski-Pasa T.B., 2002. Protective Properties of Butanolic Extract of the *Calendula officinalis* L. (Marigold) Against Lipid Peroxidation of Rat Liver Microsomes and Action As Free Radical Scavenger. *Redox Rep.*, 7 (2): 95-102.
- Cormier F., Crevier H.A., Do C.B., 1990. Effects of Sucrose Concentration on The Accumulation of Anthocyanins in Grape (*Vitis vinifera*) Cell Suspension. *Canadian Journal of Botany*, 68: 1822–1825.
- Craft N.E., Soares J.H., 1992. Relative Solubility, Stability, and Absorptivity of Lutein and β -carotene in Organic Solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 431–434.
- Creelman R.A., Mullet J.E., 1995. Jasmonic Acid Distribution and Action in Plants: Regulation During Development and Response to Biotic and Abiotic Stress. *PNAS*, 92: 4114–19.
- Cui Y., Han Y., Yang X., Sun Y., Zhao Y., 2014. Protective Effects of Quercetin and Quercetin-5',8-Disulfonate Against Carbon Tetrachloride-Caused Oxidative Liver Injury in Mice. *Molecules*, 19: 291-305.
- Cui Y., Morgenstern H., Greenland S., Tashkin D.P., Mao J.T., Cai L., Cozen W., Mack T.M., Lu Q.Y., Zhang Z.F., 2008. Dietary Flavonoid Intake and Lung Cancer-A Population-Based Case-Control Study. *Cancer*, 112: 2241-8.
- Ćurković-Perica M., Likić,S., Rusak G., 2014. Phenolic Compounds in *Centaurea rupestris* Tissues and Their Antiphytoviral Activity. *Croat. Chem. Acta*, 87 (1): 79-84.

- Çapan S., 2006. *Cucurbita pepo* L. (Kabak) Bitkisi Embriyo Kültürlerinde Kromozom Sayısı ve Mitoz Aktivitesinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üniversitesi, Edirne, Türkiye.
- Çetin B., Kurtuluş B., Akanlı Bingöl N., 2015. Effects of Plant Growth Regulators on Callus Formation in Different Explant of *Calendula officinalis* L. *Journal of Applied Biological Sciences*, 9 (3): 34-39.
- D'Archivio M.; Filesi C.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Masella, R., 2010. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *Int. J. Mol. Sci.*, 11: 1321–1342.
- Dajas F., 2012. Life or Death: Neuroprotective and Anticancer Effects of Quercetin. *J Ethnopharmacol*, 143: 383-396.
- Dakshayini K., Vaman Rao C., Karun A., Bhavyashree U., Ujwal P., 2016. High-Frequency Plant Regeneration and Histological Analysis of Callus in *Cichorium intybus*: An important medicinal plant. *Journal of Phytology*, 8 (1): 7-12.
- Dangash A., Ram M., Niranjan R., Bharillya A., Misra H., Pandya N., Jain D.C., 2015. *In vitro* Selection and Hormonal Regulation in Cell Culture of *Artemisia annua* L. Plant. *JSM. Cell Dev. Biol.*, 3 (1): 1013.
- De Flora S, Bagnasco M, Vainio H., 1999. Modulation of Genotoxic and Related Effects by Carotenoids and Vitamin A in Experimental Models: Mechanistic Issues. *Mutagenesis*, 14: 153-172.
- De Pascual-Teresa S., Moreno D.A., GarcíaViguera C., 2010. Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence. *Int. J. Mol. Sci.*, 11: 1679-703.
- Debiaggi, M.; Tateo, F.; Pagani, L.; Luini, M.; Romero, E., 1990. Effects of Propolis Flavonoids on Virus Infectivity and Replication. *Microbiologica*, 13: 207-13.
- Decendit A., Ramawat K.G., Waffo P., Deffieux G., Badoc A., Mérillon J.M., 1996. Anthocyanins, Catechins, Condensed Tannins and Piceid Production in *Vitis vinifera* Cell Bioreactor Cultures. *Biotechnol. Lett.*, 18: 659–662.
- Desai B.B., 2004. Seeds Handbook. Biology, Production, Processing and Storage (Second Edition, Revised and Expanded). Part I, Seed Biology. 31-50 pp.

- Di Cosmo F., Misawa M., 1985. Plant Cell Cultures and Microbial Insult: Interactions. *Trends Biotechnol.*, 3: 318-322.
- Długosz M., Wiktorowska E., Wiśniewska A., Pączkowski C., 2013. Production of Oleanolic Acid Glycosides by Hairy Root Established Cultures of *Calendula officinalis* L. *Acta Biochimica Polonica*, 60 (3): 467–473.
- Dodds J.H., Roberts L.W., 1985. Experiments in Plant Tissue Culture sec. Edi. Cambridge Univ. Press Presented by Britain.
- Dornenburg H., Knorr D., 1995. Strategies for The Improvement of Secondary Metabolite Production in Plant Cell Cultures. *Enz. Microb. Tech.*, 17: 674-684.
- Druesne-Pecollo N., Latino-Martel P., Norat T., et al. 2010. B-carotene supplementation and cancer risk: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *Int J Cancer*. 127: 172–184.
- Dumbravă D-G., Hădărugă N-G., Moldovan C., Raba D-N., Popa M-V., 2013. Obtaining and Comparative Analysis of Some Carotenoidic Extracts From Marigold (*Calendula officinalis* L.) Flowers and Celandine (*Chelidonium majus* L.) Flowers. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 19 (1): 74-78.
- Duran V., Matic M., Jovanovic M., Mimica N., Gajinovic Z., Poljacki M., Boza P., 2005. Results of The Clinical Examination of An Ointment with Marigold Extract in The Treatment of Venous Leg Ulcers. *Int. J. Tissue React.*, 27 (3): 101-6.
- Dwivedi S., Alam A., Shekhawat G.Y., 2016. Antioxidant Response of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Angiosperms; Asteraceae) During Developing Phase of Suspension Cell Culture. *Plant Science Today*, 3 (2): 115-123.
- Edes T.E., Thornton W., Shah J., 1989. Beta-Carotene and Aryl Hydrocarbon Hydroxylase in The Rat: An Effect of Beta-Carotene Independent of Vitamin A Activity. *J. Nutr.*, 119:796-799.
- Elias R., De Meo M., Vidal-Ollivier E., Laget M., Balansard G., Dumenil G., 1990. Antimutagenic Activity of Some Saponins Isolated From *Calendula officinalis* L., *C.arvensis* L. and *Hedera helix* L. *Mutagenesis*, 5 (4): 327-31.

- El-Qudah J.M., 2014. Contents of Chlorophyll and Carotenoid Pigments in Common Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *World Applied Sciences Journal*, 29 (10): 1277-1281.
- Endress R., 1994. Plant cells as producers of secondary compounds. In: R. Endress (Ed.) *Plant Cell Biotechnology*. Berlin, Springer-Verlag: 187–255.
- Escop Monographs. 2nd edition. New York: Thieme; 2003.
- Excerpted from: Vitamin and Mineral Safety 3rd Edition (2013) Council for Responsible Nutrition (CRN) www.crnusa.org
- Fan D., Zhou X., Zhao C., Chen H., Zhao Y., Gong X., 2011. Antiinflammatory, Antiviral and Quantitative Study of Quercetin-3-O-Beta-D-Glucuronide in *Polygonum perfoliatum* L. *Fitoterapia*, 82: 805-810.
- Farmer EE, Ryan CA. 1992. Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate The Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors. *Plant Cell*, 4: 129–34.
- Farnsworth N.R., Akerev O., Bingel A.S., 1985. The Bulletin of WHO., 63: 9865-9871.
- Fernandesa E.F.A., Melonib F., Borellac J.C. , Lopes N.P., 2013. Effect of Fertilisation and Harvest Period on Polar Metabolites of *Calendula officinalis*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 23: 731-735.
- Fernandez M.A., Saenz M.T., Garcia M.D., 1998. Antiinflammatory Activity in Rats and Mice of Phenolic Acids Isolated From *Scrophularia frutescens*. *J. Pharm. Pharmacol.*, 50: 1183–1186.
- Ferry D.R., Smith A., Malkhandi J., Fyfe D.W., Detakats P.G., Anderson D., Baker J., Kerr D.J., 1996. Phase I Clinical Trial of The Flavonoid Quercetin: Pharmacokinetics and Evidence for *In vivo* Tyrosine Kinase Inhibition. *Clin. Cancer Res.*, 2: 659-668.
- Fesen M.R., Kohn K.W., Leteurtre F., Pommier Y., 1993. Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 2399–2403.
- Fonseca, Y.M., Vicentini F.T.M.C., Catini C.D., Fonseca M.J.V., 2010. Determination of Rutin and Narcissin in Marigold Extract and Topical Formulations by Liquid Chromatography: Applicability in Skin Penetration Studies. *Quim. Nova.*, 33: 1320-1324.

- Fuster A., Picó C., Sánchez J., Oliver P., Zingaretti M.C., Murano I., Morroni M., Hoeller U., Goralczyk R., Cinti S., Palou A., 2008. Effects of 6-Month Daily Supplementation with Oral Beta-Carotene in Combination or not with Benzo[a]pyrene on Cell-Cycle Markers in The Lung of Ferrets. *J. Nutr. Biochem.*, 19 (5): 295–304.
- Gadzovska S., Pavlova V., Nasteska M., Neskoska A., Spasenoski M., 2008. Secondary Metabolite Production in *In vitro* Shoots of Marigold (*Calendula officinalis* L.). Proceedings of the III Congress of Ecologists of the Republic of Macedonia with International Participation, Struga. Special issues of Macedonian Ecological Society, Vol. 8, Skopje.
- Gandini S., Merzenich H., Robertson C., Boyle P., 2000. Meta-analysis of Studies on Breast Cancer Risk and Diet: The Role of Fruit and Vegetable Consumption and The Intake of Associated Micronutrients, *Eur. J. Cancer*, 36: 636–646.
- Garcia-Closas R.; Gonzalez C.A., Agudo A., Riboli E., 1999. Intake of Specific Carotenoids and Flavonoids and The Risk of Gastric Cancer in Spain. *Cancer Causes Control*, 10: 71-5.
- Gates M.A., Tworoger S.S., Hecht J.L., De V., Rosner I., Hankinson B.S.E., 2007. A Prospective Study of Dietary Flavonoid Intake and Incidence of Epithelial Ovarian Cancer. *Int. J. Cancer*, 121: 2225-32.
- Ghédira K., Goetz P., 2016. *Calendula officinalis* L. (Asteraceae): Souci. *Phytotherapie*, 14 (1): 62-67.
- Gilman E.F., Howe T., 1999. *Torenia Fournieri*. University of Florida, Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, 2 p.
- Giri A., Narasu M., 2000. Transgenic Hairy Roots: Recent Trends and Application. *Biotechnology Advances*, 18: 1-22.
- Gonceariuc M., 2003. Contributions to *Calendula officinalis* L. Breeding. *Bul Acad Stiinte. a Mold, Stiinte Biol, Chimsi Agric*, 2: 101-103 (Ro).
- Goodwin T.W., 1954. Studies in Carotenogenesis: The Carotenoids of The Flower Petals of *Calendula officinalis*. *Biochemical*, 58: 90-94.

- Gopinathan A., Pawde A.M., Singh G.R., Singh K., Amarpal A., Kinjavdekar P., 2006. Effect of *Calendula officinalis* in Burn Wounds of Bovine Calves and Heifers. *Indian J. Anim. Sci.*, 76 (6): 437- 441.
- Göktürk Baydar N., Hallaç Türk F., Çetin E.S., Babalık Z., 2010. Asmada Hücre Süspansiyon Kültürleri ile Sekonder Metabolit Üretimi Üzerine Araştırmalar. TÜBİTAK Tarım, Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Grubu (TOVAG). Proje No: 1060223.
- Gregus Z, Klaassen C.D., 1996. Mechanisms of toxicity. In: Klaassen CD, ed. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. New York: McGraw-Hill; 35–
- Grunberger D., Banerjee R., Eisinger K., Oltz E.M., Efros L., Caldwell M., Estevez V., Nakanishi K., 1988. Preferential Cytotoxicity on Tumor Cells by Caffeic Acid Phenethyl Ester Isolated From Propolis. *Experientia*, 44: 230–232.
- Grzelak A., Janiszowska w., 2002. Initiation and Growth Characteristics of Suspension Cultures of *Calendula officinalis* Cells. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 71 (1): 29-40.
- Gundlach H., Muller M.J., Kutchan T.M., Zenk M.H., 1992. Jasmonic Acid is A Signal Transducer in Elicitor-Induced Plant Cell Cultures. *P. Natl. Acad. Sci.*, 89: 2389–2393.
- Gürel A., Bedir E., Hayta Ş., Nartop P., Çetin B., Akgün İ.H., 2006. Bitki Hücre Kültürleri ve HPLC ile Sekonder Metabolit Analizleri, E.Ü.Müh. Fak. Biyomühendislik Bölümü, Uygulamalı Eğitim Kursu, Bornova-İzmir.
- Haleagrahara N., Siew C.J., Ponnusamy K., 2013. Effect of Quercetin and Desferrioxamine on 6- Hydroxydopamine (6-OHDA) Induced Neurotoxicity in Striatum of Rats. *J. Toxicol. Sci.*, 38: 25-33.
- Hall R., Beale M., Fiehn O., Hardy N., Sumner L., Bino R., 2002. Plant Metabolomics: The Missing Link in Functional Genomic Strategies. *The Plant Cell*, 14: 1437-40.

- Hämäläinen M., Nieminen R., Vuorela P., Heinonen M., Moilanen E., 2007. Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF- κ B Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF- κ B Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages. *Mediators of Inflammation*, Volume 2007, 10 pages.
- Haq N., 2005. *In vitro* Production of Bioactive Compounds From Medicinal and Aromatic Plants. *Tel. Med. Pak. Agriculture*, 1-27.
- Hayta Ş., Gürel A., 2009. Bazı Centiyane (*Gentiana spp.*) Türlerinde *Agrobacterium rhizogens* Aracılığı ile Transforme Saçak Kök Kültürlerinin Oluşturulması ve Sekonder Metabolit İçeriklerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi, İzmir.
- Heng K.W., Chan D.J.C., Chan L.K., 2013. Production of cell biomass and artemisinin via batch cell culture of *Artemisia annua*. *Advances in Environmental Biology*, 7 (12): 3737-3742.
- Herold A., Cremer L., Calugaru A., Tamas V., Ionescu F., Manea S., Szegli G., 2003. Antioxidant Properties of Some Hydroalcoholic Plant Extracts with Antiinflammatory Activity. *Roum. Archi. Microbiol. Immunol.*, 62 (3-4): 217-27.
- Hertog M.G., Feskens E.J., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D., 1993. Dietary Antioxidant Flavonoids and Risk of Coronary Heart Disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342: 1007- 11.
- Het Hof K.H., West C.E., Weststrate J.A., Hautvast J.G., 2000. Dietary Factors That Affect The Bioavailability of Carotenoids. *The Journal of Nutrition*, 130: 503–506.
- Hiraga S, Ito H, Yamakawa H, Ohtsubo N, Seo S, Mitsuhara I, Matsui H, Honma M, Ohashi Y., 2000. An HR-Induced Tobacco Peroxidase Gene is Responsive to Spermine, But not to Salicylate, Methyl Jasmonate and Ethaphon. *Mol. Plant Microbe Interaction*, 13: 210-216.
- Hussain I., Ullah R., Khan N., Ayaz S., Ahmad S., Shanzeb, Ahmed M., Hasan P.T., Khan F.A., 2011. Phytochemicals and Inorganic Profile of *Calendula officinale* and *Sonchus asper*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5 (16): 1813-1818.

- Hutcheson S.W., 1998. Current Concepts of Active Defense in Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36: 59–90.
- Iauk L., Lo Bue A.M., Milazzo I., Rapisarda A., Blandino G., 2003. Antibacterial Activity of Medicinal Plant Extracts Against Periodontopathic Bacteria. *Phytother. Res.*, 17 (6): 599-604.
- Islam R., Kumar M., 2014. Extraction of Total Carotenoids from *Calendula officinalis* and Their Effects on the Oxidation Stability of Mustard Oil. *Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technolog (JESTFT)*, 8 (2): 142-144.
- İşlek C., 2009. Serbest ve Tutuklanmış *Capsicum annuum* L. Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Kapsaisin Üretimi Üzerine Bazı Uyarıcıların Etkisi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Jaganathan S.K., 2011. Growth Inhibition by Caffeic Acid, One of the Phenolic Constituents of Honey, in HCT 15 Colon Cancer Cells. *The ScientificWorld Journal*, 2012: 372345.
- Jan A.T., Kamli M.R., Murtaza I., Singh J.B., Ali A., Haq Q.M.R., 2010. Dietary Flavonoid Quercetin and Associated Health Benefits An Overview. *Food Rev. Int.*, 26: 302-317.
- Jazvinscak J.M., Cipak G.A., Vukovic L., Vlainic J., Zarkovic N., Orsolcic N., 2012. Quercetin Supplementation: Insight into The Potentially Harmful Outcomes of Neurodegenerative Prevention. *N-S. Arch. Pharmacol.*, 385: 1185-1197.
- Jeong H.J., Ryu Y.B., Park S.J., Kim J.H., Kwon H.J., Kim J.H., Park K.H., Rho M.C., Lee W.S., 2009. Neuraminidase Inhibitory Activities of Flavonols Isolated From *Rhodiola rosea* Roots and Their *In vitro* Anti-influenza Viral Activities. *Bioorg. Med. Chem.*, 17: 6816-23.
- Jimenez-Medina E., Garcia-Lora A., Paco L., Collada A., Garrido F., 2006. A New Extract of The Plant *Calendula officinalis* Produces A Dual *In vitro* Effect: Cytotoxic Anti-tumor Activity and Lymphocyte Activation. *BMC Cancer*, 6: 119.

- Johari J., Kianmehr A., Mustafa M., Abubakar S., Zandi K., 2012. Antiviral Activity of Baicalein and Quercetin Against The Japanese Encephalitis Virus. *Int. J. Mol. Sci.*, 13: 16785-16795.
- Joseph D., Muralidhara K.M., 2013. Enhanced Neuroprotective Effect of Fish Oil in Combination with Quercetin Against 3-Nitropropionic Acid Induced Oxidative Stress in Rat Brain. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol Psychiatry*, 40: 83-92.
- Kalvatchev Z., Walder R., Garzaro D., 1997. Anti-HIV Activity of Extracts From *Calendula officinalis* Flowers, *Biomed Pharmacother.*, 51 (4): 176-80.
- Kampkotter A., Gombitang N.C., Zurawski R.F., Timpel C., Chovolou Y., Watjen W., Kahl R., 2007. Effects of The Flavonoids Kaempferol and Fisetin on Thermotolerance, Oxidative Stress and FoxO Transcription Factor DAF-16 in The Model Organism *Caenorhabditis elegans*. *Arch. Toxicol.*, 81: 849-58.
- Kashiwada Y., Nishizawa M., Yamagishi T., Tanaka T., Nonaka G., Cosentino L. M., Snider J.V., Lee K., 1995. Anti-AIDS Agents, 18. Sodium and Potassium Salts of Caffeic Acid Tetramers From *Arnebia euchroma* as Anti-HIV Agents. *J. Nat. Prod.*, 58: 392-400.
- Kaurinovic B., Popovic M., Cebovic T., Mimica-Dukic N., 2003. Effects of *Calendula officinalis* L. and *Taraxacum officinale* Weber (Asteraceae) Extracts on The Production of OH Radicals, *Fresen. Environ. Bull.*, 12 (2): 250-253.
- Kaya N., 2012. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don Türünde Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin *In vitro* Somaklonal Varyasyon üzerine Etkilerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye.
- Kaya N., Akı C., 2012. *Catharanthus roseus* Bitkisinin *In vitro* Biyokütle Değişimi Üzerine Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Etkileri. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) (Poster). Ege Üniv., İzmir, PC-146, 814 s.
- Kaya N., Akı C., 2013. Effect of Plant Growth Regulators on *In vitro* Biomass Changing in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Annals of Biological Research*, 4 (4):164-168.

- Kemper J.K., MD., MPH., 1999. *Calendula (Calendula officinalis)*. The Center for Holistic Pediatric Education and Research, 13 syf.
- Kemper K. J., 1999. *Calendula (Calendula officinalis)*. The Longwood Herbal Taskforce and The center for Holistic Pediatric Education and Research, 767 p.
- Khalid K.A., Silva J.A.T., 2010. Yield Essential Oil and Pigment Content of *Calendula officinalis* L. Flower Heads Cultivated Under Salt Stress Conditions. *Scientia Horticulturae*, 126 (2): 297-305.
- Kieran P.M., Mac Loughlin P.F., Malone D.M., 1997. Plant Cell Suspension Cultures: Some Engineering Considerations. *Journal of Biotechnology*, 59: 39–52.
- Kim O.T., Kim M.Y., Hong M.H., Ahn J.C., Huang B., 2004. Stimulation of Asiticoside Accumulation in The Whole Plant Cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban by Elicitors. *Plant Cell Rep.*, 23: 339-344.
- Kim Y., Liu X.S., Liu C., Smith D.E., Russell R.M., Wang X.D., 2006. Induction of Pulmonary Neoplasia in The Smoke-Exposed Ferret by 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanone (NNK): A Model for Human Lung Cancer. *Cancer Letters*, 234 (2): 209–219.
- King D.J., Mansfield K.J., Street H.E., 1973. Control of Growth and Cell Division in Plant Cell Suspension Cultures. *Can. J. Bot.*, 51: 1807-1823.
- Kishimoto S., Maoka T., Sumitomo K., Ohmiya A., 2005. Analysis of Carotenoid Composition in Petals of *Calendula (Calendula officinalis* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69 (11): 2122–2128.
- Krinsky N.I., Johnson E.J., 2005. Carotenoid Actions and Their Relation to Health and Disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26 (6): 459–516.
- Król B., 2011. Yield and The Chemical Composition of Flower Heads of Pot Marigold (*Calendula officinalis* L. cv. Orange King) Depending on Nitrogen Fertilization. *Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus*, 10 (2): 235-243.
- Kumar S.A., 2009. Plants-Based Medicines in India. <http://pib.nic.in/feature/feyr2000/fmay2000/f240520006.html>, 6 Haziran 2010.

- Kurkin V.A., Kurkina A.V., Afanasyeva P.V., Platonov I.A., Pavlova L.V., 2015. HPLC-Analysis of Narcissin in Flowers of *Calendula officinalis*. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 3 (6): 16-18.
- Kurkin V.A., Sharova O.V., 2007. Flavonoids From *Calendula Officinalis* Flowers. *Chem. Nat. Comp.*, 43 (2): 216-217.
- Kurz ve Constabel, 1979. Plant Cell Cultures, A Potential Sources of Pharmaceuticals. *Adv. Appl. Microbiol.*, 25: 209-240.
- Lau T., 2008. "A Healthy Way to Live": The Occurance, Bioactivity, Biosynthesis, and Synthesis of Kaempferol. *Chemistry*, 150: 1-3.
- Leach M.J., 2008. *Calendula officinalis* and Wound Healing: A Systematic Review. *Wounds*. 20 (8): 236-243.
- Leal F., Rodrigues, A., Fernandes, D., Nunes, F.M., Cipriano, J., Ramos, J., Teixeira, S., Vieira, S., Carvalho, L.M., Pinto-Carnide, O., 2009. *In vitro* Multiplication of *Calendula arvensis* for Secondary Metabolites Extraction. *Acta Hort. (ISHS)*, 812: 251-256.
- Legha M.R., Prasad K.V., Singh S.K., Kaur C., Arora A., Kumar S., 2012. Induction of Carotenoid Pigments in Callus Cultures of *Calendula offlcinalis* L. in Response to Nitrogen and Sucrose Levels. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 48 (1): 99-106.
- Lin C.W., Chen P.N., Chen M.K., Yang W.E., Tang C.H., Yang S.F., Hsieh Y.S., 2013. Kaempferol Reduces Matrix Metalloproteinase-2 Expression by Down-Regulating ERK1/2 and The Activator Protein-1 Signaling Pathways in Oral Cancer Cells. *Plos One*, 8 (11): 1-9.
- Lindsey K., 1985. Manipulation by Nutrient Limitation of The Biosynthetic Activity of Immobilized Cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. *annuum*. *Planta*, 165: 126-133.
- Lindsey K., Yeoman M.M., 1983. Novel Experimental Systems for Studying The Production of Secondary Metabolites by Plant Tissue Cultures. *Plant Biotechnology*, In: Mantell SH, Smith H, editors, Cambridge University Press, 39-66 p., London.

- Linga Rao M., Savithamma N., 2014. Isolation and Identification of Phenolic compounds by HPLC and Electrospray Ionization Mass Spectrometry of *Svensonia Hyderabadensis* – A Rare Medicinal Plant Taxon. *Int. J. Drug Dev. and Res.*, 6 (1): 199-207.
- Liu C., Wang X-D., Bronson R.T., Smith D.E., Krinsky N.I., Russel R.M., 2000. Effects of Physiological Versus Pharmacological β -Carotene Supplementation on Cell Proliferation and Histopathological Changes in The Lungs of Cigarette Smoke-Exposed Ferrets. *Carcinogenesis*. 21: 2245–2253.
- Luckner, M., and L. Nover. 1977. Expression of Secondary Metabolism: An Aspect of Cell Specialization of Microorganism, Higher Plants, and Animals. In M. Luckner, L. Nover, and H. Bohm (eds.), *Secondary Metabolism and Cell Differentiation*, pp. 2-102. Springer-Verlag, Berlin.
- Lyu S.Y., Rhim J.Y., Park W.B., 2005. Antiherpetic Activities of Flavonoids Against *Herpes simplex* Virus Type 1 (HSV-1) and Type 2 (HSV-2) *In vitro*. *Arch. Pharm. Res.*, 28: 1293-301.
- Maalik A., Khan F.A., Mumtaz A., Mehmood A., Azhar S., Atif M., Karim S., Altaf Y., Tariq I., 2014. Pharmacological Applications of Quercetin and its Derivatives: A Short Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13 (9): 1561-1566.
- Macht D.I., 1955. Calendula or Marigold in Medical History and in Shakespeare. *Bulletin of The h-History of Medicine*, 29 (6): 491-502.
- Maciel R.M., Costa M.M., Martins D.B., Franca R.T., Schmatz R., Graca D.L., Duarte M.M., Danesi C.C., Mazzanti C.M., Schetinger M.R., Paim F.C., Palma H.E., Abdala F.H., Stefanello N., Zimpel C.K., Felin D.V., Lopes S.T., 2013. Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Quercetin in Functional and Morphological Alterations in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Res. Vet. Sci.*, 95: 389-397.
- Mahmood N., Piacente S., Pizza C., Burke A., Khan A.I., Hay A.J., 1996. The Anti-HIV Activity and Mechanisms of Action of Pure Compounds Isolated from *Rosa damascena*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 229: 73-9.
- Malabadi R.B., Kumar S.V., 2005. Assessment of Anti-Dermatophytic Activity of Some Medicinal Plants. *Journal of Phytological Research*, 18 (1): 103-106.

- Malamy J., Klessig D.F., 1992. Salicylic Acid and Disease Resistance. *Plant J.*, 2: 643-654.
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C., 2005. Bioavailability and Bioefficacy of Polyphenols in Humans. I. Review of 97 Bioavailability Studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 230-242.
- Marin C., Boutaleb-Charki S., Diaz J.G., Huertas O., Rosales M.J., Perez-Cordon G., Guitierrez-Sanchez R., Sanchez-Moreno M., 2009. Antileishmaniasis Activity of Flavonoids From *Consolida oliveriana*. *J. Nat. Prod.*, 72: 1069-74.
- Matysik G, Wojciak-Kosior M, Paduch R., 2008. The Influence of *Calendula officinalis* Flos Extracts on Cell Cultures, and The Chromatographic Analysis of Extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38 (2): 285-92.
- McCoy M.C., 2003. The Effects of Phytohormones on Growth and Artemisinin Production in Hairy Root Cultures of *Artemisia annua* L. Degree of Master of Science in Biotechnology, Worcester Polytechnic Institute, England.
- Meckes M., Calzada F., Tapia-Contreras A., Cedillo-Rivera R., 1999. Antiprotozoal Properties of *Helianthemum glomeratum*. *Phytother. Res.*, 13: 102-5.
- Mehrabi A., Khodadadi E., Sadeghi Z., Shooshtari S., 2013. An Investigation of Tissue Culture and Co-Cultures of Different Explants in *Calendula officinalis*. *International Journal of Biosciences*, 3 (12): 201-205.
- Mehta D., Rastogi P., Kumar A., Kumar Chaudhary A., 2012. Review on Pharmacological Update: *Calendula officinalis* Linn. *Inventi Impact: Planta Activa*, vol 2012, Issue 4.
- Meijer J.J., 1989. Effects of Hydrodynamic and Chemical/osmotic Stress on Plant Cells in a Stirred Bioreactor. Ph.D. Thesis Technical University Delft.
- Min B.S., Tomiyama M., Ma C.M., Nakamura N., Hattori M., 2001. Kaempferol Acetylramnosides From The Rhizome of *Dryopteris Crassirhizoma* and Their Inhibitory Effects on Three Different Activities of Human Immunodeficiency Virus-1 Reverse Transcriptase. *Chem. Pharm. Bull.*, 49: 546-50.

- Miri Y., Kochehbagh S.B., Mirshekari B., 2013. Effect of Seed Bio-Fertilization Influences Germination and Early Growth of Marigold (*Calendula officinalis*). *International journal of Agronomy and Plant Production*, 4 (2): 217-222.
- Misawa M., 1994. Plant Tissue Culture: An Alternative for Production of Useful Metabolites, FAO Agricultural Services Bulletin, No:108, 42-45.
- Misotti A.M., Gnagnarella P., 2013. Vitamin Supplement Consumption and Breast Cancer Risk: A Review. *Ecancermedicalscience*, 7: 365.
- Mitrocotsa D., Mitaku S., Axarlis S., Harvala C., Malamas M., 2000. Evaluation of The Antiviral Activity of Kaempferol and its Glycosides Against Human Cytomegalovirus. *Planta Med.*, 66: 377-9.
- Mohammad A., Alam P., Ahmad M.M., Ali A., Ahmad J., Abdin M.Z., 2014. Impact of Plant Growth Regulators (PGRs) on Callogenesis and Artemisinin Content in *Artemisia annua* L. Plants. *Indian Journal of Biotechnology*, 13: 26-33.
- Mohammad S., Kashani H., 2012. Pot marigold (*Calendula officinalis*) Medicinal Usage and Cultivation. *Scientific Research and Essays*, 7 (14): 1468-1472.
- Moreno P.R.H., Van der Haijden R., Verpoorte R., 1995. Cell and Tissue Cultures of *Catharanthus roseus*. A literature survey: II. Updating from 1988 to 1993. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2: 1-25.
- Moretti E., Mazzi L., Terzuoli G., Bonechi C., Iacoponi F., Martini S., Rossi C., Collodel G., 2012. Effect of Quercetin, Rutin, Naringenin and Epicatechin on Lipid Peroxidation Induced in Human Sperm. *Reprod. Toxicol.*, 34 (4): 651-657.
- Motawi T.K., Abdelazim S.A., Darwish H.A., Elbaz E.M., Shouman S.A., 2015. Modulation of Tamoxifen Cytotoxicity by Caffeic Acid Phenethyl Ester in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Hindawi Publishing Corporation, Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016: 13 pp.
- Mritunjay K., Mondal D.B., Ananya D., 2011. Quantification of Catechin and Lycopene in *Calendula officinalis* Extracts Using HPTLC Method. *Asian J Pharm Clin Res.*, 4 (2): 128-129.

- Muir, W.H., Hildebrandt, A.C., and Riker, A.J., 1958. The Preparation, Isolation, and Growth in Culture of Single Cells From Higher Plants. *Am. J. Bot.*, 45: 589–597.
- Murashige T. ve Skoog F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Muzitano M.F., Tinoco L.W., Guette C., Kaiser C.R., Rossi-Bergmann B., Costa S.S., 2006. The Antileishmanial Activity Assessment of Unusual Flavonoids From *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*, 67: 2071-7.
- Nagai T, Miyaichi Y, Tomimori T, Suzuki Y, Yamaha H., 1992. Antiviral Activity of Two Flavonoids From *Tanacetum microphyllum*. *Antiviral Res.*, 19: 207-16.
- Nagaoka T., Banskota A.H., Tezuka Y., Saiki I., Kadota S., 2002. Selective Antiproliferative Activity of Caffeic Acid Phenethyl Ester Analogues on Highly Liver-Metastatic Murine Colon 26-L5 Carcinoma Cell Line. *Bioorg. Med. Chem.*, 10: 3351–3359.
- Namdeo A.G., 2007. Plant Cell Elicitation For Production of Secondary Metabolites: A Review. *Pharmacognosy Rev.*, 1: 69-79.
- Nan M., Pintea A. , Bunea A. , Eşianu S., Tămaş M., 2012. HPLC Analysis of Carotenoids From *Inula helenium* L. Flowers and Leaves. *Farmacia*, 60 (4): 501-509.
- Nartop P, Gürel A., 2004, Bitki Hücre Kültürleri ve Sekonder Metabolit Üretimi, E.Ü.Müh. Fak. Biyomühendislik Bölümü Semineri, Bornova/İzmir.
- Needs P.W., Kroon P.A., 2006. Convenient Syntheses of Metabolically Important Quercetin Glucuronides and Sulfates. *Tetrahedron*, 62: 6862–6868.
- Neradil J., Veselská R., Slanina J., 2003. UVC-Protective Effect of Caffeic Acid on Normal and Transformed Human Skin Cells In vitro. *Folia Biologica*, 49 (5): 197–202.
- Nikam S.L., Khan S.J., 2014. Efficacy of Growth Hormone for Callus Induction in *Calendula officinalis* L. *Journal of Cell and Tissue Research*, 14 (1): 4153-4157.

- Nojiri H., Sugimori M., Yamane H., Nishimura Y., Yamada A., Shibuya N., Kodama O., Murofushi N., Omori T., 1996. Involvement of Jasmonic Acid in Elicitor-Induced Phytoalexin Production in Suspension-Cultured Rice Cells. *Plant Physiol.*, 110: 387–392.
- Nothlings U., Murphy S.P., Wilkens L.R., Henderson B.E., Kolonel L.N., 2007. Flavonols and Pancreatic Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.*, 166: 924-31.
- Ohtsubo N, Mitsuhashi I, Koga M, Seo S, Ohashi Y, 1999. Ethylene Promotes The Necrotic Lesion Formation and Basic PR Gene Expression in TMV-Infected Tobacco. *Plant Cell Physiology*, 40: 808–17.
- Okoh O., 2008. Variation in The Essential Oil Composition of *Calendula officinalis* L. The Degree of Master of Science (Chemistry). University of fort hare, South Africa.
- Olenikov D., Kashchenko N., 2013. New Isorhamnetin Glycosides and Other Phenolic Compounds from *Calendula officinalis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 49 (5): 717–723.
- Olenikov D.N., Kashchenko N.L., 2014. Componential Profile and Amylase Inhibiting Activity of Phenolic Compounds from *Calendula officinalis* L. Leaves. *The Scientific World Journal*, 2014: 1-9.
- Olives Barbara A.I., Camara Hurtado M., Sanchez Mata M.C., Fernandez Ruiz V., Tejada M.L., 2006. Application of a UV–Vis Detection-HPLC Method for a Rapid Determination of Lycopene and B-Carotene in Vegetables. *Food Chemistry*, 95: 328–336.
- Olson J.A., 1994. Vitamin A, Retinoids and Carotenoids. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 8th ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 287–307.
- Olson J.A., Krinsky N.I., 1995. Introduction: The Colourful Fascinating World of The Carotenoids: Important Physiologic Modulators, *The FASEB Journal*, 9: 1547–1550.
- Oskay D., Oskay M., 2009. Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoteknolojik Önemi. *E-Journal of New World Sciences Academy*, 4 (2), 31-41.

- Palacio L., Cantero J., Cusido R.M., Goleniowski M.E., 2012. Phenolic Compound Production in Relation to Differentiation in Cell and Tissue Cultures of *Larrea divaricate* (Cav.). *Plant Science*, 193-194: 1-7.
- Park C.H., Martinez B.C., 1992. Enhanced Release of Rosmarinic Acid From *Coleus blumei* permeabilized by Dimethyl Sulfoxide (DMSO) While Preserving Cell Viability and Growth. *Biotechnology and Bioengineering*, 40: 459-464.
- Parr A.J., 1989. The Production of Secondary Metabolites by Plant Cell Cultures. *Journal of Biotechnology*, 10: 1-26.
- Patra N., Srivastava A.K., 2014. Enhanced Production of Artemisinin by Hairy Root Cultivation of *Artemisia annua* in a Modified Stirred Tank Reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174 (6): 2209-2222.
- Patra N., Srivastava A.K., 2016. Artemisinin Production by Plant Hairy Root Cultures in Gas-and Liquid-Phase Bioreactors. *Plant Cell Reports*, 35 (1): 143-153.
- Perez-Carreón J.I., Cruz-Jiménez G., Licea-Vega J.A., Arce Popoca E., Fattel Fazenda S., Villa-Trevino S., 2002. Genotoxic and Anti-Genotoxic Properties of *Calendula officinalis* Extracts in Rat Liver Cell Cultures Treated with Diethylnitrosamine. *Toxicol. In Vitro*, 16 (3): 253-8.
- Perez-Gutierrez S., Vargassolis R., Zavala S.M., Perez G.C., Perez G.R.M., 1998. Inhibitory Effect of Five Plant Extracts on Heart Rates of Rats. *Phytother. Res.*, 12: 49-50.
- Petkov E., Nickdor N., Uzunov P., 1981. Inhibitory Effects of Flavonoids on Xanthine Oxidase. *Planta Med.*, 43: 183-87.
- Pintea A., Bara A., Andrei S., Bele C., 2003. The Evaluation of Hepatoprotective Effects of *Calendula officinalis* L. Seeds Oil, I. Buletinul Universitatii de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara Cluj-Napoca, Seria Medicina Veterinara. 60: 125-130.
- Pommier P., Gomez F., Sunyach M.P., D'hombres A., Carrie C., Montbarbon X., 2004. Phase III Randomized Trial of *Calendula officinalis* Compared with Trolamine for The Prevention of Acute Dermatitis During Irradiation for Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.*, 22 (8): 1447-53.

- Preethi K.C., Kuttan G., Kuttan R., 2006. Antioxidant Potential of An Extract of *Calendula officinalis* Flowers *In vitro* and *In vivo*. *Pharm Biol.*, 44 (9): 691-697.
- Prouillet C., Mazière J.C., Mazière C., Wattel A., Brazier M., Kamel S., 2004. Stimulatory Effect of Naturally Occurring Flavonols Quercetin and Kaempferol on Alkaline Phosphatase Activity in MG-63 Human Osteoblasts Through ERK and Estrogen Receptor Pathway. *Biochemical Pharmacology*, 67 (7): 1307–1313.
- Purkayastha, R.P., 1995. In Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action, eds. Daniel, M. & Purkayastha, R. P. (Dekker, New York) 1–39.
- Qin J., Yeum K.J., Johnson E.J., Krinsky N.I., Russell R.M., Tang G., 2008. Determination of 9-Cis Beta-Carotene and Zeta-Carotene in Biological Samples. *J. Nutr. Biochem.*, 19 (9): 612-8.
- Qu J.G., Zhang W., Jin M.F., Yu X.J., 2006a. Effect of Homogeneity on Cell Growth and Anthocyanin Biosynthesis in Suspension Cultures of *Vitis vinifera*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22 (5): 805-810.
- Qu J.G., Yu X.J., Zhang W., Jin M.F., 2006b. Significant Improved Anthocyanins Biosynthesis in Suspension Cultures of *Vitis vinifera* by Process Intensification. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bae.*, 22: 299- 305.
- Radu G.L., Litescu S.C., Albu C., Teodor E., Truica G., 2012. Beta-Carotene And Lycopene Determination in New Enriched Bakery Products by HPLC-DAD Method. *Romanian Biotechnological Letters*, 17 (1): 7006-7012.
- Rahmani N., Daneshian J., Farahani H.A., Taherkhani T., 2011. Evaluation of Nitrogenous Fertilizer Influence on Oil Variations of Calendula (*Calendula officinalis* L.) Under Drought Stres Conditions. *J. Med. Plants Res.*, 5 (5): 696-701.
- Rahmani N., Taherkhani T., Zandi P., Aghdam A.M., 2012. Effect of Regulated Deficit Irrigation and Nitrogen Levels on Flavonoid Content and Extract Performance of Marigold (*Calendula officinalis* L.). *Annals of Biological Research*, 3 (6): 2624-2630.

- Rajendran L., Suvarnalatha G., Ravishankar G.A., Venkataraman L.V., 1994. Enhancement of Anthocyanin Production in Callus Cultures of *Daucus carota* L. Under The Influence of Fungal Elicitors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42: 227-231.
- Rakwal R., Tomogami S., Kodama O., 1996. Role of Jasmonic Acid As Signaling Molecule in Copper Chloride elicited Rice Phytoalexin Production. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60 (6): 1046-1048.
- Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A., 2002. Plant Cell Cultures: Chemical Factories of Secondary Metabolites. *Biotechnology Advances*, 20: 101-153.
- Ramadan M.F., Selim A.M.M., 2009. Antimicrobial and Antiviral Impact of Novel Quercetin-Enriched Lecithin. *J. Food Biochem.*, 33: 557-571.
- Ramawat K.G., Merillon J.M., 2013. Tetraterpenes: Carotenoids. In: Natural Products. Vol. 1: Phytochemistry, Botany and Metabolism of alkaloids, phenolics and Terpenes. Ramawat K.G., Merillon J.M. (eds.). Germany: Springer Berlin Heidelberg, 3251–3283.
- Ramos A., Edreira A., Vizoso A., Betancourt J., Lopez M., Decale M., 1998. Genotoxicity of An Extract of *Calendula officinalis* L., *J. Ethnopharmacol.*, 61 (1): 49-55.
- Rao C.V., Desai D., Kaul B., Amin S., Reddy B.S., 1992. Effect of Caffeic Acid Esters on Carcinogen-Induced Mutagenicity and Human Colon Adenocarcinoma Cell Growth. *Chemico-Biological Interactions*, 84 (3): 277–290.
- Re A.T., Mooney D., Antigna E., Dufour E., Bark I., Srinivasan V., Nohynek G., 2009. Application of The Threshold of Toxicological Concern Approach for the Safety Evaluation of *C.officinalis* Flower Petals and Extracts Used in Cosmetic and Personal Care Products. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (6): 1246–1254.
- Riedel H., Cai Z., Kütük O., Smetanska I., 2010. Obtaining Phenolic Acids From Cell Cultures of Various *Artemisia* species. *African Journal of Biotechnology*, 9 (51): 8805-8809.
- Rigane G., Ben Younes S., Ghazghazi H., Ben Salem R., 2013. Investigation into The Biological Activities and Chemical Composition of *Calendula officinalis* L. Growing in Tunisia. *I.F.R.J.*, 20 (6): 3001-3007.

- Roopashree T.S., Raman D., Shobha Rani R.H., Narendra C., 2008. Antibacterial Activity of Antipsoriatic Herbs: *Cassia Tora*, *Momordica Charantia* & *C. Officinalis*. *Natural products*, 1 (3): 20-28.
- Ross A.C., 1999. Vitamin A and Retinoids. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 305–327.
- Russell R.M., 2002. Beta-Carotene and Lung Cancer. *Pure Appl. Chem.*, 74: 1461–1467.
- Rusu M.A., Tamas M., Puica C., Roman I., Sabadas M., 2005. The Hepatoprotective Action of Ten Herbal Extracts in CCl₄ Intoxicated Liver. *Phytother. Res.*, 19 (9): 744-9.
- Saify Z.S., Mushtag N., Noor F., Arif M, Takween S., Ahmed S.P., 2000. Analgesic and Antimicrobial Activity of The Leaves Extract of *Calendula officinalis*, *Hamdard Medicus*; 43 (1): 34-37.
- Sajc L., Grubisic D, Vunjak-Novakovic G., 2000. Bioreactors for Plant Engineering: An Outlook for Further Research. *Biochemical Engineering Journal*, 4: 89–99.
- Sakharkar PR, Kasiram K, Patil AT., 2000. Antimicrobial Activity of *Calendula officinalis*. *Hamdard Medicus*, 43 (2): 5-7.
- Sanghavi N., Bhosale S.D., Malod Y., 2014. RP-HPLC Method Development and Validation of Quercetin Isolated From The Plant *Tridax procumbens* L. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 3 (6): 594-597.
- Savitha B.C., Thimmaraju R., Bhagyalakshmi N., Ravinshankar A.G., 2006. Different Biotic and Abiotic Elicitors Influence Betalain Production in Hairy Root Cultures of *Beta vulgaris* in Shake-Flask and Bioreactor. *Process Biochemistry*, 41 (1): 50-60.
- Seddon J.M., Ajani U.A., Sperduto R.D., Hiller R., Blair N., Burton T.C., Farber M.D., Gragoudas E.S., Haller J., Miller D.T., et al., 1994. Dietary Carotenoids, Vitamins A, C, and E, and Advanced Age-Related Macular Degeneration. Eyedisease Case-Control Study Group. *JAMA*, 272: 1413–1420.

- Sedghi M., Seyed Sharifi R., Pirzad A.R., Amanpour-Balaneji B., 2012. Phytohormonal Regulation of Antioxidant Systems in Petals of Drought Stressed Pot Marigold (*Calendula officinalis* L.). *J. Agr. Sci. Tech.*, 14: 869-878.
- Shah N.B., Seth K.A., 2010. Pharmacological Potential of *Trichosanthes dioica*- An Edible Plant. *Review Hygenia*, 2: 1-7.
- Shahidi F., Naczki M., 1995. Food Phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Applications, Technomic Publishing Company, Lancaster, UK.
- Sies H., Stahl W., 1995. Vitamins E and C, Beta-Carotene, and Other Carotenoids As Antioxidants. *Am J Clin Nutr.*, 62: 1315–1321.
- Singh M., Chaturvedi R., 2012. Evaluation of Nutrient Uptake and Physical Parameters on Cell Biomass Growth and Production of Spilanthol in Suspension Cultures of *Spilanthes acmella* Murr. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 35 (6): 943–951.
- Smith R., 2000. *Plant Tissue Culture*. Texas Agricultural Experiment Station, Texas A&M University, College Station, U.S.A., 2231 p.
- Song J.H., Shim J.K., Choi H.J., 2011. Quercetin 7-Rhamnoside Reduces Porcine Epidemic Diarrhea Virus Replication Via Independent Pathway of Viral Induced Reactive Oxygen Species. *Virol. J.*, 8: 460 p.
- Sökmen A., Gürel E., 2001. Sekonder Metabolit Üretimi. Ed.: Babaoğlu, M., Gürel E., Özcan S. Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi, Konya, 211-261 s.
- Srivastava A.K., Patra N., 2015. Use of Model-Based Nutrient Feeding for Improved Production of Artemisinin by Hairy Roots of *Artemisia Annuua* in a Modified Stirred Tank Bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177 (2): 373-388.
- Srivastava S., Srivastava A.K., 2012. Azadirachtin Production by Hairy Root Cultivation of *Azadirachta indica* in a Modified Stirred Tank Reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35 (9): 1549-1553.
- Staniforth V., Chiu L.T., Yang N.S., 2006. Caffeic Acid Suppresses UVB Radiation-Induced Expression of Interleukin-10 and Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases Inmouse. *Carcinogenesis*, 27 (9): 1803–1811.

- Stefek M., Karasu C., 2011. Eye Lens in Aging and Diabetes: Effect of Quercetin. *Rejuvenation Res.*, 14: 525- 534.
- Stewart C., 2003. Enhancing The Yield of Target Tissue and Secondary Metabolites in *Calendula officinalis* L., a Medicinal Plant. Degree of Master of Science. University of Windsor Scholarship at UWindsor, The Department of Biological Sciences, Canada.
- Strati I.F., Sinanoglou V.J., Kora L., Miniadis-Meimaroglou S., Oreopoulou V., 2012. Carotenoids From Foods of Plant, Animal and Marine Origin: An Efficient HPLC-DAD Separation Method. *Foods*, 1: 52-65.
- Street H.E., 1977. In Plant Tissue and Cell Culture. Bot. Monogr. Vol.11. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Sujatha K., Chitra K., Polisetti H., Karri S., Nimmalapudi S., Reddy C.U., 2011. Standardization of *Calendula officinalis* Linn. with Reference to Quercetin by High Performance Thin Layer Chromatography. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 1 (4): 789-792.
- Surmuş Asan H., 2013. *Hypericum retusum* Aucher'in Kallus ve Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Hiperisin Türevlerinin Üretilmesi. Doktora Tezi. Dicle Üniversitesi, Diyarbakır.
- Suzuki R., Noguchi R., Ota T., Abe M., Miyashita K., Kawada T., 2001. Cytotoxic Effect of Conjugated Trienoic Fatty Acids on Mouse Tumor and Human Monocytic Leukemia Cells. *Lipids*, 36 (5): 477-482.
- Szakiel A., Grzelak A., Dudek P., Janiszowska W., 2003. Biosynthesis of Oleanolic Acid and Its Glycosides in *Calendula officinalis* Suspension Culture. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41: 271–275.
- Szopa A., Ekiert H., 2015. *Anethum graveolens* L. *In vitro* Cultures – A Potential Source of Bioactive Metabolites, Phenolic Acids and Furanocoumarins. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, 57 (2): 29–37.

- Szwejkowska B., Bielski S., 2012. Effect of Nitrogen and Magnesium Fertilization on the Development and Yields of Pot Marigold (*Calendula officinalis* L.). *Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus*, 11 (2): 141-148.
- Taherkhani T., Rahmani N., Aghdam A.M., Zandi P., 2011. Assessment of Nitrogen Levels on Flower Yield of Calendula Grown Under Different Water Deficit Stresses Using Drought Tolerant Indices. *The Journal of American Science*, 7 (10): 591-598.
- Taiz L., Zeiger E., 2008. Bitki Fizyolojisi. Palme Yayınevi, 283-302 syf.
- Tan S.H., Musa R., Ariff A., Maziah M., 2010. Effect of Plant Growth Regulators on Callus, Cell Suspension and Cell Line Selection for Flavonoid Production from Pegaga (*Centella asiatica* L. urban). *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6 (4): 284-299.
- Tanaka T., Kojima T., Kawamori T., Wang A., Suzui M., Okamoto K., Mori H., 1993. Inhibition of 4-Nitroquinoline- 1-Oxide-Induced Rat Tongue Carcinogenesis by The Naturally Occurring Plant Phenolics Caffeic, Ellagic, Chlorogenic and Ferulic Acids. *Carcinogenesis*, 14: 1321–1325.
- Tátraaljai D., Földes E., Pukánszky B., 2014. Efficient Melt Stabilization of Polyethylene with Quercetin, A Flavonoid Type Natural Antioxidant. *Polymer Degradation and Stability*, 102: 41-48.
- Tavani A., La Vecchia C., 1999. Beta-Carotene and Risk of Coronary Heart Disease. A Review of Observational and Intervention Studies. *Biomed Pharmacother.*, 53: 409-416.
- Teli N.P., Timko M.P., 2004. Recent Developments in The Use of Transgenic Plants For The Production of Human Therapeutics and Biopharmaceuticals. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 79: 125-145.
- Theis N., Lerdau M., 2003. The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. *International Journal of Plant Science*, 164: 93-102.
- Thomsen K., Schmidt H., Fischer A., 1979. Beta-Carotene in Erythropoieticprotoporphyria: 5 Years' Experience. *Dermatologica*, 159: 82–86.

- Torbaghan M.E., 2012. Effect of Salt Stress on Germination and Some Growth Parameters of Marigold (*Calendula officinalis* L.). *Plant Science Journal*, 1 (1): 07-19.
- Trigiano R.N., Gray D.J., 1996. Plant Tissue Culture Concept and Laboratory Exercises. CRS Press., Boca Raton, Florida.
- Türkmen O.S., 2009. Kazdağı'nda Yetişen Oğulotu, Adaçayı ve Kekik Türlerinin Doku Kültürü Yöntemiyle Muhafazası ve Çoğaltılması. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye.
- Ukiya M., Akihisa T., Yasukawa K., Tokuda H., Suzuki T., Kimura Y., 2006. Anti-Inflammatory, Anti-Tumor-Promoting, and Cytotoxic Activities of Constituents of Marigold (*Calendula officinalis*) Flowers. *J. Nat. Prod.*, 69 (12): 1692-6.
- USDA, 2005. United States Department of Agriculture. Natural resources conservation services.
- Van der Heijden R, Verpoorte R, Ten Hoopen HJG (1989) Cell and Tissue Cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: A Literature Survey. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 18: 231-280.
- Van Overwalle G., 2007. Medicinal and Aromatic Plants, Chapter 9.
- Van Poppel G, Goldbohm RA., 1995. Epidemiological Evidence For Beta-Carotene and Cancer Prevention. *Am J Clin Nutr.*, 62: 1393-1402.
- Vanisree M., Lee C.Y., Lo S.F., Nalawade S.M., Lin C.Y., Tsay H.S., 2004. Studies on The Production of Some Important Secondary Metabolites From Medicinal Plants by Plant Tissue Cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45: 1-22.
- Vanisree M., Tsay H.S., 2004. Plant Cell Cultures—An Alternative and Efficient Source for The Production of Biologically Important Secondary Metabolites. *Int. J. Appl. Sci. Eng.*, 2: 29-48.
- Varzakas T., Kiokias S., 2016. HPLC Analysis and Determination of Carotenoid Pigments in Commercially Available Plant Extracts. *Curr. Res. Nutr. Food Sci. Jour.*, 4 (1): 1-14.

- Verma A., Jain N., 2011. Callus Production Under Different Culture Medium in *Pluchea lanceolata*: A Perennial Medicinal Plant. *Annals of Biological Research*, 2 (5) :191-195.
- Victorio C.P., Salgueiro Lage C.L., Sato A., 2012. Tissue Culture Techniques in The Proliferation of Shoots and Roots of *Calendula officinalis*. *Revista Ciência Agronômica*, 43 (3): 539-545.
- Vidal-Ollivier E, Elias R., Faure F., Babadjamian A., Crespín F., Balansard G., Boudon G., 1989. Flavonol Glycosides From *Calendula officinalis* Flowers. *Planta Med.*, 55 (1): 73-4.
- Vieira O., Laranjinha J., Madeira V., Almeida L., 1998. Cholesteryl Ester Hydroperoxide Formation in Myoglobin-Catalyzed Low Density Lipoprotein Oxidation. Concerted Antioxidant Activity of Caffeic and p-Coumaric Acids with Ascorbate. *Biochemical Pharmacology*, 55 (3): 333–340.
- Wang XD, Russell RM., 1999. Procarcinogenic and Anticarcinogenic Effects of Beta-Carotene. *Nutr. Rev.*, 57: 263-272.
- Wang L., Tu Y.C., Lian T.W., Hung J.T., Yen J.H., Wu M.J., 2006. Distinctive Antioxidant and Antiinflammatory Effects of Flavonols. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 9798-804.
- Whitmer S., Verpoorte R., Canel C., 1998. Influence of Auxins on Alkaloid Accumulation by a Transgenic Cell Line of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 53: 135-141.
- Wiktorowska E., Dlugosz M., Janiszowska W., 2010. Significant Enhancement of Oleanolic Acid Accumulation by Biotic Elicitors in Cell Suspension Cultures of *Calendula officinalis* L. *Enzyme Microb. Technol.*, 46: 14-20.
- Wiktorowska E., Dlugosz M., Janiszowska W., 2009. Evaluation of Antifungal Activity of Pentacyclic Triterpenoids Isolated From *Calendula officinalis* L. Bioactive Plant Compounds - Structural and Applicative Aspects, Session 4. Biotechnology and Phytochemistry, Environmental Interactions Abstract. 56: 66-67 p.

- Wolf G., 2002. The Effect of Low and High Doses of β -Carotene and Exposure to Cigarette Smoke on The Lungs of Ferrets. *Nutr Rev.*, 60: 88–90.
- Woutersen R., Wolterbeek A.P.M., Appel M.J., et al., 1999. Safety Evaluation of Synthetic Beta Carotene. *Crit. Rev. Toxicol.*, 29: 515-542.
- www.ankalab.com/fileadmin/standortseiten/synlab_tr/pdf/A_vitamini_ve_karotenler.pdf,
Haziran 2016
- www.glsiences.com/technical/technicalnote/064/, Haziran, 2016.
- Yamaguchi M., Kato H., Yoshida S., Yamamura S., Uchimiya H. ve Umeda M., 2003. Control of *In Vitro* Organogenesis by Cyclin-Dependent Kinase Activities in Plants. *PNAS*, 100 (13): 8019–8023.
- Yeoman M.M., Yeoman C.L., 1996. Manipulating Secondary Metabolism in Cultured Plant Cells. *New Phytologist*, 134: 553-569.
- Yoshikawa M., Murakami T., Kishi A., Kageura T., Matsuda H., 2001. Medicinal Flowers. III. Marigold. (1): Hypoglycemic, Gastric Emptying Inhibitory and Gastroprotective Principles and New Oleanane-Type Triterpene Oligoglycosides, Calendasaponins A, B, C and D From Egyptian *Calendula officinalis*. *Chem Pharm Bull.*, 49 (7): 863-70.
- Zandi K., Teoh B.T., Sam S.S., Wong P.F., Mustafa M.R., Abubakar S., 2011. Antiviral Activity of Four Types of Bioflavonoid Against Dengue Virus Type-2. *Virology*, 8: 560.
- Zhang W., Furusaki S., 1999. Production of Anthocyanins by Plant Cell Cultures. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.*, 4: 231–252.
- Zhang H.S., Zhang M., Yu L.H., Zhao Y., He N.W., Yang X.B., 2012. Antitumor Activities of Quercetin and Quercetin-5',8-Disulfonate in Human Colon and Breast Cancer Cell Lines. *Food Chem. Toxicol.*, 29: 3451–3460.
- Zhao J., Davis L.C., Verpoorte R., 2005. Elicitor Signal Transduction Leading to Production of Plant Secondary Metabolites. *Biotechnol. Adv.*, 23: 283–333.
- Zhong J.J., Bai Y., Wang S.J., 1996. Effects of Plant Growth Regulators on Cell Growth and Ginsenoside Saponin Production by Suspension Cultures of *Panax quinquefolium*. *Journal of Biotechnology*, 45 (3): 3227-234.

- Zhou M., Ren H., Han J., Wang W., Zheng Q., Wang D., 2015. Protective Effects of Kaempferol against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart via Antioxidant Activity and Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 β . *Oxidative. Medicine and Cellular Longevity*, 2015: 8 p. Article ID 481405.
- Ziegler R.G., Mayne S.T., Swanson C.A., 1996. Nutrition and Lung Cancer. *Cancer Causes Control*, 7: 157-177.
- Zitterl-Eglseer K., Sosa S., Jurenitsch J., Schubert-ZSsilavec M., Della Loggia R., Tubaro A., Bertoldi M., Franz C., 1997. Anti-Oedematous Activities of The Main Triterpendiol Esters of Marigold (*Calendula officinalis* L.). *J. Ethnopharmacol*, 57 (2): 139-144.
- Zitterl-Eglseer K., Reznicek G., Jurenitsch J., Novak J., Zitterl W., Franz C., 2001. Morphogenetic Variability of Faradiol Monoesters in Marigold *Calendula officinalis* L. *Phytochem Anal.*, 12 (3): 199-201.



EKLERİ

EK 1. Taze Ağırlık, Kuru Ağırlık ve Sekonder Metabolit Miktarını Hesaplama Kullanılan Formüller

$$\text{Taze Ağırlık (g/l)} = \frac{\text{Taze Ağırlık (g)}}{\text{Örnek Hacmi (ml)}} \times 1000$$

$$\text{Kuru Ağırlık (g/l)} = \frac{\text{Kuru Ağırlık (g)}}{\text{Örnek Hacmi (ml)}} \times 1000$$

$$\text{Sekonder Metabolit Miktarı (mg/g kuru ağırlık)} = \frac{\text{Alan}}{\text{Eğim}} \times \text{Örnek hacmi (l)} \times \frac{1}{\text{Örnek biyokütlesi(g)}}$$



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER:

Adı-Soyadı : Nergis KAYA
Doğum Yeri : Bursa
Doğum Tarihi : 12/11/1988

EĞİTİM DURUMU:

Lisans Öğrenimi : Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü.

Yüksek Lisans Öğrenimi : Uludağ Üniversitesi, Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Öğretmenliği Tezsiz Yüksek Lisans.

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans.
Kaya N., Akı C., 2012. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Türünde Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin *In Vitro* Somaklonal Varyasyon Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fak., Biyoloji Bölümü, syf 64.

Bildiği Yabancı Dil : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a. Yayınlar (SCI/Diğer):

Yüksek Lisans Tezi

Kaya N., Akı C., 2012. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Türünde Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin *In Vitro* Somaklonal Varyasyon Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fak., Biyoloji Bölümü, syf 64.

Hakemli Dergilerdeki Yayınlar

Kaya N., Akı C., 2013. Effect of plant growth regulators on *in vitro* biomass changing in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Annals of Biological Research*, 4 (4): 164-168.

b. Bildiriler (Uluslararası/Ulusal):

Kaya N., Akı C., 2013. Effect of Plant Growth Regulators on *In vitro* Biomass Changing in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Annals of Biological Research*, 4 (4): 164-168.

Çördük N., Akıncı N., Yücel G., Kaya N., Akı C. Genotoxic Effects of Dodine (1-Dodecylguanidium Acetate) on Root Cells of *Allium cepa*. The Second Scientific Conference on Ecology, 1 November 2013, Plovdiv/BULGARIA.

Akıncı N., Çördük N., Yücel G., Kaya N., Akı C. *Vicia faba* Bitkisinde Proteaz Aktivitesi ve Protein İçeriği Üzerine Dodin Fungusitinin Etkisi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı) (Poster). Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 23-27 Haziran 2014.

Çördük N., Akıncı N., Kıprak R.Ö., Kaya N., Akı C. Genotoxic and Cytotoxic effects of Proquinazid on Root Cells of *Allium cepa* L. International Academy of Arts, Science&Technology, ANTALYA, TÜRKİYE, 11-12 Haziran 2015, vol. 1, no. 1, pp. 100-100.

c. Katıldığı Projeler: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri)

KURSLAR:

İngilizce Dil Kursu: Ankara Üniversitesi Tömer Dil Eğitim Kurumu Bursa Şubesi (12ay)

STAJ:

Uludağ Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı (20 iş günü)

İLETİŞİM: E-mail: nergiskaya_@hotmail.com