

**ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***MEDICAGO SATIVA* L. CV. ELÇİ (ELÇİ YONCASI)'NDA BÜYÜK ÖLÇEKLİ  
HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNDE BAZI FİTOÖSTROJENLERİN  
ANALİZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TAYFUN AKTAŞ**

**HAZİRAN 2018**

**ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***MEDICAGO SATIVA* L. CV. ELÇİ (ELÇİ YONCASI)'NDA BÜYÜK ÖLÇEKLİ  
HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNDE BAZI FİTOÖSTROJENLERİN  
ANALİZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tayfun AKTAŞ**

**DANIŞMAN**

**: Prof. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN**

**ZONGULDAK**  
**HAZİRAN 2018**

**KABUL:**

Tayfun AKTAŞ tarafından hazırlanan “*Medicago sativa* L. cv. Elçi (Elçi Yoncası)’nda Büyük Ölçekli Hücre Süspansiyon Kùltürlerinde Bazı Fitoöstrojenlerin Analizi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir.  
29/06/2018

**Danışman:** Prof. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakùltesi, Biyoloji Bölümü



**Üye:** Prof. Dr. Hatice Nurhan BÜYÜKKARTAL

Ankara Üniversitesi, Fen Fakùltesi, Biyoloji Bölümü



**Üye:** Dr. Öğr. Üyesi Şenol ALAN

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakùltesi, Biyoloji Bölümü



**ONAY:**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. ..../.../2018



Doç. Dr. Ahmet ÖZARSLAN  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”*

Tayfun AKTAŞ

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### **MEDICAGO SATIVA L. CV. ELÇİ (ELÇİ YONCASI)'NDA BÜYÜK ÖLÇEKLİ HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNDE BAZI FİTOÖSTROJENLERİN ANALİZİ**

**Tayfun AKTAŞ**

**Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN**

**Haziran 2018, 80 sayfa**

*Medicago sativa* protein, vitamin ve mineral (folik asit, kalsiyum, potasyum vb.) bakımından zengin bir bitkidir. Vücut için kuvvet ve enerji verici, kanı ve karaciğeri detoksifiye edici, toksik madde uzaklaştırıcı, enfeksiyonlara karşı savaşçı, kansızlık için oldukça faydalı olduğu bilinen bir bitkidir. Türkiye’de eklem iltihaplarına, ABD’de ise kanser hastalıklarına karşı kullanılmaktadır. *M. sativa*’nın östrojen seviyesini artırarak kadınlarda menopoz dönemi semptomlarını azalttığı da bilinmektedir. Bu çalışmada *Medicago sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası)’nda bitki doku kültürü yöntemleriyle büyük ölçekli hücre süspansiyon kültürleri kurulmuştur. Büyük ölçekli hücre süspansiyon kültürlerinde üretilen kalluslardan HPLC’de formononetin analizi yapılmıştır. Ayrıca canlı hücre sayımı, DPPH süpürme aktivitesi ve toplam fenol madde miktarı tayini yapılmıştır. Yaptığımız çalışma sonucu büyük ölçekli hücre süspansiyon kültürlerinde ürettiğimiz kallusların tarladan toplanan herbaya göre daha

## ÖZET (devam ediyor)

fazla formononetin ürettiği belirlenmiştir. Formononetin miktarı en yüksek çıkan örnek 1000 ml'lik hücre süspansiyon kültüründe 4.99 mg/g'dır. Toplam fenol madde miktarı sonuçlarına göre en yüksek madde miktarına sahip süspansiyon kültürü örneğimiz 250 ml'lik olanda 40.2 mg/g olarak belirlenmiştir. DPPH süpürme aktivitesi en yüksek örneğimiz 1000 ml'lik hücre süspansiyon kültüründe % 51.36 canlılık oranı en yüksek olan örnek % 75 ile yine 1000 ml'lik hücre süspansiyon kültürüdür.

**Anahtar Kelimeler:** *Medicago sativa* L. cv. Elçi (Elçi Yoncası), formononetin, total fenol, DPPH, hücre canlılık testi.

## **ABSTRACT**

**M. Sc. Thesis**

### ***MEDICAGO SATIVA* L. CV. (ELÇI YONCASI) ANALYSIS OF SOME PHYTOSTROGENES IN THE LARGE SCALE CELL SUSPENSION CULTURES**

**Tayfun AKTAŞ**

**Zonguldak Bülent Ecevit University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology**

**Thesis Advisor: Prof. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN**

**June 2018, 80 pages**

*Medicago sativa* is rich in protein, vitamins and minerals (folic acid, calcium, potassium, etc.). Powerful and energetic for the body, detoxifying blood and liver, removing toxic substances, fighting against infections, a plant known to be quite useful for anemia. Turkey inflammation in the joints, are used against cancer in the United States. It is also known that *M. sativa* decreases menopausal symptoms in women by increasing the level of estrogen. In this study, *Medicago sativa* L. cv. Elçi (Elçi Yoncası) in large scale cell suspension cultures have been established by plant tissue culture methods. Formononetin analysis was performed on HPLC from calli produced in large scale cell suspension cultures. In addition, total phenol substance content, DPPH sweeping activity and viable cell count were determined. It has been determined that we produce more formononetin in callus we produce in large-scale cell suspension cultures, which we have made, compared to herbivorous herbs. The highest amount of formononetin in the sample is 4.99 mg/g in 1000 ml cell suspension culture. Suspension culture with the highest amount of substance according to the total phenol substance results was reported as 40.2 mg/g in our 250 ml sample. DPPH sweeping activity

## ABSTRACT (continued)

the highest in our 1000 ml cell suspension culture with 51.36%. The cell suspension culture is again 1000 ml with 75% of the sample with the highest viability.

**Keywords:** *Medicago sativa* L. cv. Elçi (Elçi Yoncası), formononetin, total phenol, DPPH, cell viability test.



## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve tez çalışmalarında bilgi, birikim ve tecrübelerini esirgemeyen değerli hocam sayın Prof. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN'e teşekkürü bir borç bilir, saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamdaki analiz sürecinde bize destek olan ve yardımlarını esirgemeyen sayın Dr. Öğr. Üyesi Şenol ALAN'a ve Doç. Dr. Muhammet ÖREN'e teşekkür ederim.

Çalışma ve yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Yasin HAZER'e ve uzman biyolog Havva ATAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca maddi, manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen çok değerli babam Yahya AKTAŞ, annem Rabiye AKTAŞ ve kardeşim Keziban AKTAŞ'a çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL: .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
ÖZET.....	iii
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
BÖLÜM 1 .....	1
GİRİŞ .....	1
1.1 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ .....	2
1.1.1 Kallus Kültürü.....	3
1.1.2 Hücre Süspansiyon Kültürü .....	3
1.1.3 Saçak Kök Kültürü.....	3
1.1.4 Biyoreaktör İle Üretim.....	4
1.2 BESİN ORTAMLARI .....	4
1.2.1 Majör elementler .....	6
1.2.2 Minör Elementler .....	7
1.2.3 Şekerler .....	7
1.2.4 Vitaminler .....	7
1.2.5 Yarı Katı Hale Getiren Maddeler.....	7
1.2.6 Bitki Büyüme Düzenleyicileri .....	8
1.3 ANTİOKSİDANLAR.....	8
1.4 SERBEST RADİKALLER .....	9
1.5 FLAVONOİDLER .....	9
1.5.1 Bitkilerde Flavonoidlerin Görevleri.....	10
1.5.2 Hayvanlarda Flavonoidlerin Etkileri .....	11
1.5.3 Formononetin.....	11
1.6 TOPLAM FENOLİK MADDE TAYİNİ .....	12
1.7 YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC).....	12
1.7.1 HPLC ile Miktar Tayini .....	13

## İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

BÖLÜM 2 .....	15
LİTERATÜR ÖZETİ .....	15
2.1 <i>MEDICAGO SATIVA</i> L. CV. (ELÇİ YONCASI)'NIN GENEL ÖZELLİKLERİ .....	15
2.1.1 <i>Medicago</i> L. Cinsinin Özellikleri .....	15
2.1.2 <i>Medicago</i> Cinslerinde Yapılan HPLC Analiz Çalışmaları .....	16
2.1.3 <i>Medicago sativa</i> L. cv. Elçi (Elçi yoncası)'nın Morfolojik Özellikleri .....	17
2.2 CANLI HÜCRE BELİRLEME ÇALIŞMALARI .....	18
2.3 <i>MEDICAGO SATIVA</i> 'DA YAPILAN TOPLAM FENOLİK MADDE MİKTARI VE DPPH ÇALIŞMALARI .....	20
2.4 <i>MEDICAGO SATIVA</i> L.'DE YAPILAN HPLC ANALİZ ÇALIŞMALARI .....	21
BÖLÜM 3 .....	25
MATERYAL VE METOD .....	25
3.1 MATERYAL .....	25
3.1.1 Eksplant .....	26
3.2 YÖNTEM .....	26
3.2.1 Çalışmada Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu .....	26
3.2.2 Besin Ortamlarının Sterilizasyonu .....	26
3.2.3 <i>M. sativa</i> L. cv. Elçi (Elçi yoncası) Tohum Sterilizasyonu .....	26
3.3 MS ORTAMI .....	26
3.3.1 Majör elementler .....	27
3.3.2 Minör elementler .....	27
3.3.3 Demir stok .....	28
3.3.4 Vitamin stok .....	28
3.3.5 Bitki büyüme düzenleyicilerinin stokları .....	29
3.3.6 pH ayarlaması .....	29
3.3.7 Agar eklenmesi .....	29
3.4 KULLANILAN BESİYERLERİNİN İÇERİKLERİ .....	30
3.4.1 Tohum Yetistirme Besin Ortamı .....	30
3.4.2 Kallus Yetiştirme Besin Ortamı .....	32
3.4.3 Büyük Ölçekli Hücre Süspansiyon Kültürü Ortamı .....	34
3.5. BÜYÜK ÖLÇEKLİ HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜNDEN SÜZME İŞLEMİ .....	35
3.6 <i>M. SATIVA</i> L. CV. ELÇİ (ELÇİ YONCASI)'NIN KALLUS HÜCRELERİNİN BOYANMASI .....	35
3.7 CANLI HÜCRE SAYIMI .....	36
3.8 TOPLAM FENOLİK MADDE TAYİNİ .....	36
3.8.1 <i>M. sativa</i> L. cv. Elçi (Elçi Yoncası)'nın Taze Örnekleri ve Büyük Ölçekli Hücre Süspansiyon Kültürü Örneklerinin Ekstraksiyon Çözeltilerinin Hazırlanması .....	36

## İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

3.8.2 Toplam Fenolik Madde Tayininde Kullanılan Cihaz .....	37
3.8.3 Toplam Fenolik Madde Tayini Çözeltilerinin Hazırlanması .....	37
3.9 DPPH SERBEST RADİKALİ GİDERİM AKTİVİTESİ YÖNTEMİ.....	38
3.9.1 <i>M. sativa</i> L. cv. Elçi (Elçi Yoncası)'nın Taze Örnekleri ve Büyük Ölçekli Hücre Süspansiyon Kültürü Örneklerinin Ekstraksiyon Çözeltilerinin Hazırlanması .....	38
3.9.2 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi İçin Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	39
3.9.3 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesinde Kullanılan Cihaz.....	39
3.9.4 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesinin Spektrofotometrede Okunması.....	40
3.9.5 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesinin Hesaplanması .....	40
3.10 HPLC-UV ANALİZLERİ .....	40
3.10.1 HPLC-UV Analizleri <i>M. sativa</i> L. cv. Elçi (Elçi Yoncası)'nın Ekstraksiyon Çözeltilerinin Hazırlanması .....	40
3.10.2 HPLC-UV Analizi için Standartların Kromatogramı .....	41
3.10.3 HPLC Analizlerinde Kullanılan Cihaz ve Kolon Bilgileri .....	41
3.10.4 HPLC-UV Analizi Gradyent Elüsyon Programları .....	42
3.11 İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	42
BÖLÜM 4 .....	43
ARAŞTIRMA BULGULARI .....	43
4.1 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ SONUÇLARI .....	43
4.2 AGREGAT ÖLÇÜM SONUÇLARI.....	44
4.3 CANLI HÜCRE SAYIMI SONUÇLARI .....	45
4.4 TOPLAM FENOLİK MADDE TAYİNİ SONUÇLARI .....	46
4.5 DPPH SERBEST RADİKALİ GİDERİM AKTİVİTESİ SONUÇLARI .....	47
4.6 HPLC-UV SONUÇLARI.....	48
BÖLÜM 5 .....	51
SONUÇ VE TARTIŞMA .....	51
KAYNAKLAR .....	59
ÖZGEÇMİŞ .....	65

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Genel flavonoid iskeleti.....	9
Şekil 1.2 17 $\beta$ -estradiol'ün flavonoidlerle yapısal benzerliği.....	10
Şekil 1.3 Formononetinin yapısı.....	11
Şekil 1.4 Bir HPLC cihazının şematik gösterimi.....	13
Şekil 3.1 <i>M. sativa</i> L. cv. Elçi (Elçi yoncası) tohumlar.....	23
Şekil 3.2 Ekim yapılmış tohumlar.....	29
Şekil 3.3 Bir haftalık aseptik fideler.....	29
Şekil 3.4 15 Günlük aseptik fideler.....	30
Şekil 3.5 Ekim yapılmış yeni eksplantlar A) hipokotil, B) kotiledon, C) apikal meristem.....	31
Şekil 3.6 Hücre süspansiyon kültürü kurulan erlenmayerler A) 100 ml B) 250 ml C) 500 ml D) 1000 ml.....	33
Şekil 3.7 Boyanan hücreler (A) 100 ml, B) 250 ml, C) 500 ml, D) 1000 ml'lik hücre süspansiyon kültürleri.....	34
Şekil 3.8 Formononetin standardı kromatogramı.....	39
Şekil 4.1 Olgunlaşmış kalluslar A) hipokotil, B) kotiledon, C) apikal meristem.....	41
Şekil 4.2 Hücre süspansiyon kültürleri (A) 100 ml, B) 250 ml, C) 500 ml, D) 1000 ml.....	42
Şekil 4.3 Gallik asit kalibrasyon eğrisi.....	44
Şekil 4.4 Formononetin standardı kalibrasyon eğrisi.....	46
Şekil 4.5 100 ml'lik hücre süspansiyon kültürü kromatogramı.....	47
Şekil 4.6 250 ml'lik hücre süspansiyon kültürü kromatogramı.....	47

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Şekil 4.7 500 ml'lik hücre süspansiyon kültürü kromatogramı.....	47
Şekil 4.8 1000 ml'lik hücre süspansiyon kültürü kromatogramı.....	47
Şekil 4.9 Mayıs ayı mahsulü kromatogramı.....	48
Şekil 4.10 Eylül ayı mahsulü kromatogramı.....	48

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 Kültür ortamlarındaki konsantrasyon miktarları.....	5
Çizelge 2.1 <i>Medicago sativa</i> L. cv. (Elçi yoncası)'nın taksonomisi.....	17
Çizelge 3.1 MS ortamında kullanılan majör tuzlar.....	25
Çizelge 3.2 MS ortamında kullanılan minör tuzları.....	25
Çizelge 3.3 MS ortamında kullanılan demir stok.....	26
Çizelge 3.4 MS ortamında kullanılan vitamin stok.....	26
Çizelge 3.5 Tohum yetiştirme ortamı (standart MS ortamı).....	28
Çizelge 3.6 Kallus yetiştirme ortamı.....	30
Çizelge 3.7 Hücre süspansiyon kültür ortamı.....	32
Çizelge 3.8 Standartların gradiyent elüsyon programı.....	40
Çizelge 4.1 Agregat ölçüm sonuçları (mm) ( $p<0,05$ ).....	43
Çizelge 4.2 Canlı hücre oranı (%) ( $p<0,05$ ).....	43
Çizelge 4.3 Hücre süspansiyon kültürleri, mayıs ve eylül ayı toplam fenol madde miktarları ( $p<0,05$ ).....	44
Çizelge 4.4 DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları (%) ( $p<0,05$ ).....	45
Çizelge 4.5 HPLC-UV analiz sonuçları (Formononetin) (mg/g) ( $p<0,05$ ).....	46

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

$\mu\text{g}$	:Mikrogram
cm	:Santimetre
mm	:Milimetre
mM	:Mikromolar
nmol	:Nanomolar
g	:Gram
mg	:Miligram
kg	:Kilogram
atm	:Atmosfer
dk	:Dakika
$^{\circ}\text{C}$	:Santigrat Derece
ml	:Mililitre
M	:Molar
lt	:Litre
nm	:Nanomolar



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

### KISALTMALAR

2,4-D	: 2,4 Dikloro Fenoksi Asetik Asit
AA	: Askorbik asit
B5	: Gamborg (1968)
BAP	: 6-Benzilaminopürin
BHA	: Bütil hidroksi toluen
BHT	: Bütil hidroksi anisol
C	: Karbon
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EtOH	: Etanol
HCl	: Hidroklorik asit
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
IAA	: Indol Asetik Asit
LS	: Linsmaier-Skoog (1965)
MeOH	: Metanol
MS	: Murashige-Skoog (1962)
NAA	: Naftalin asetik asit
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
NaOH	: Sodyum hidroksit

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Fabaceae (Leguminosae / Baklagiller), Fabales takımından çoğunu otsu bitkilerin oluşturduğu çalı ve ağaç türlerini de içeren büyük bir familyadır. 700 cins ve 20 bin civarında tür içerir. *Phaseolus vulgaris* (fasulye), *Vicia faba* (bakla), *Cicer arietinum* (nohut), *Glycine max* (soya), *Lens culinaris* (mercimek), *Pisum sativum* (bezelye) gibi gıda olarak kullanılan türler bu familyaya aittir. Fabaceae familyası üyeleri aynı zamanda hayvan yemi olarak, farmakolojik açıdan insan sağlığı için ve süs bitkisi olarakta kullanılmaktadır.

*Medicago sativa* (yonca) farklı iklimlere uyum sağlama kabiliyeti, yüksek yem verim kapasitesi ve kalitesiyle tüm dünya üzerinde önemli bir yem bitkisidir. “Yem bitkilerinin kraliçesi” olarak adlandırılan yonca hemen hemen tüm yem bitkilerinden daha verimli olup hayvanların yem rasyonlarında (bir hayvanın günlük alması gereken yem miktarı) temel bileşeni oluşturmaktadır. *Medicago* kökünün güçlü oluşu ve yılda 3-7 kere biçilmesi sayesinde zengin ot kaynağıdır ve *M. sativa* bulunduğu toprağı en ekonomik şekilde kullanır (Elçi, 2005). *Medicago* ayrıca bitki doku kültüründe *in vitro* rejenerasyon kabiliyetinden dolayı model bitki olarak bilinmektedir (Erişen 2005).

Bitki sekonder metabolitlerinin üretimi amacıyla son 30 yılda bitki doku kültürü teknikleri en önemli yöntemlerden biri olmuştur. Tıbbi bitkilerin üretiminde karşılaşılan zorluklar nedeniyle bitki doku kültürünün önemi gün geçtikçe artmaktadır. Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, niteliğı belli fiziksel ve kimyasal ortamlarda bitki, organ, doku ve hücrelerin *in vitro* kültüre alınması olarak tanımlanır. Bitki doku kültürünün; kallus kültürü, hücre süspansiyon kültürü, saçak kök kültürü ve biyoreaktörde üretim gibi farklı çalışma alanları mevcuttur. Bitki doku kültürü çalışmaları ile bitkiler klonlanarak çoğaltılmakta, transgenik bitki üretimi sağlanmakta, ilaç sanayinde hammadde olarak kullanılan sekonder metabolitlerin üretimi gerçekleştirilmektedir.

Flavonoidler, sarı renkli olmaları nedeniyle Latince sarı anlamına gelen flavus sözcüğünden türetilerek ismini almışlardır. 15 C atomlu 2-fenil benzopiron (difenil propan) yapısı (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) gösterirler ve polifenolik bileşikler olarak bilinirler (Kahraman et al. 2002). Flavonoidlerde, serbest radikal uzaklaştırıcı (antioksidan), kardiyovasküler, karaciğer koruyucu, antiviral ve son zamanlarda da antikanserojen aktiviteleri üzerinde çalışmalar devam etmektedir (Birman 2012).

Yapılan bu çalışmada *M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası) bitkisinde bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak kallus oluşturulması ve bu kallusların büyük ölçekli hücre süspansiyon kültürlerine (100 ml, 250 ml, 500 ml ve 1000 ml) alınmasıyla flavonoid olan formononetin'in HPLC'de analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

## 1.1 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

Bitki doku kültürünün tanımı: aseptik şartlarda yapay bir besin ortamında (*in vitro*), bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (eksplant) veya organ (apikal meristem, hipokotil vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesidir. Bitki doku kültürü, yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik farklılığı oluşturmak için önemli bir alandır (Babaoğlu 2001).

Bitki doku kültüründe ilk ticari ilgi alanını süs ve gıda bitkileri oluşturmuştur. Bitki doku kültüründeki önemli çalışmalar; 1902 Haberlandt ilk izole edilmiş hücrelerin kültürü, 1904 Hanning olgun embriyoların kültürü, 1907 Ereky biyoteknoloji teriminin ilk defa kullanımı, 1922 Kotte ve Robbins kök ve sürgün uçlarının laboratuvarda çoğaltımı, 1934 Gautheret ilk kallus kültürleri, 1942 Gautheret ilk kallus kültürlerinden sekonder metabolit üretimi, 1946 Ball sürgün uçlarından ilk bitki eldesi, 1953 Watson ve Crick DNA'nın yapısının belirlenmesi, 1958 Steward ve arkadaşları ilk somatik embriyo üretimi, 1962 Murashige ve Skoog MS ortamının geliştirilmesi, 1983 Murai ve ark. transgenik ilk bitkinin elde edilmesi tarihsel olarak önemlidir.

### **1.1.1 Kallus Kültürü**

Kallus, *in vitro* kültür ortamlarına bırakılan bitki hücresi veya dokusundan meydana gelen farklılaşmamış, sarı ve dağılabilen (friable) hücre yığındır. Kallus yığınları morfolojik düzensizliğe sahiplerdir. Çoğu bitki dokusu kallus oluşturabilir ama her *in vitro* ortam her bitkiye uygun olmayabilir. Kallus kültürünün oluşturulduğu eksplantın başlangıcı sekonder metabolit üretiminde önemli yer tutmaktadır (Babaoğlu 2001).

Farklı ortamlarda yapılan kültürler genellikle kallus kültürü ile başlar. Direkt ve indirekt organogenez, bitki rejenerasyonu, somatik embriyogenez ve hücre süspansiyon kültürlerinin başlangıç noktası kallus kültürüdür.

### **1.1.2 Hücre Süspansiyon Kültürü**

Hücre süspansiyon kültürleri, çalkalanmakta olan *in vitro* sıvı ortamda friable olan hücreler ile agregatlardan (hücre kümesi) meydana gelir. Kallus kültür ortamından farkı katılaştırıcı jellerin bulunmamasıdır. Bu inkübasyon boyunca hücre ve agregatlar belli bir süre artar ve maksimum noktaya ulaşır. Süspansiyon kültürlerinden daha iyi sonuç alabilmek için kalluslar kullanılır. Ana bitkiden alınan eksplantlara kıyasla kallus hücreleri *in vitro* ortama uyum sağlamıştır ve sıvı ortama da adaptasyonu kolay olacaktır. Kalluslar genellikle cam erlenmayer içindeki katılaştırıcı element içermeyen besin ortamının içerisine alınır ve çalkalayıcıda inkübasyona bırakılır. Kallus hücreleri sıvı içerisinde dağılarak tek tek besinle daha çok temas halinde bulunur ve büyümeleri daha hızlı olur (Akçam-Oluk 2006, Babaoğlu 2001).

### **1.1.3 Saçak Kök Kültürü**

Saçak kök kültürleri hızlı gelişim, genetik ve biyokimyasal kararlılık gibi özelliklere sahip olmasından dolayı sekonder metabolit üretiminde avantajlı bir konumda bulunmaktadır. Saçak kök kültürleri bitki metabolizması ve fizyolojisi için model sistemler oluşturmaktadırlar. Özel kimyasal madde, ilaç üretimi, transgenik bitki rejenerasyonunda kullanılmaktadır (Shanks and Morgan 1999).

Saçak kök kültürlerinde genel olarak *Agrobacterium rhizogenes* bakterisi kullanılarak sekonder metabolit üretimi yapılmaktadır (Babaoğlu 2001).

#### **1.1.4 Biyoreaktör İle Üretim**

Biyoreaktör, içerisindeki canlı organizma, hücre ve hücre kümelerinin sıvı *in vitro* ortam içerisinde kültür ortamına zarar vermeden pH, sıcaklık, hava temini, karıştırma ve taze besiyeri ile değişim işlemlerinin yapılabilmesine olanak tanıyan elektronik metal, cam veya plastikten yapılmış tanktır. . Biyoreaktörler içerisindeki besin ortamının şartlarını yakından takip etmeyi sağladığı gibi fiziksel ve kimyasal müdahaleye de elverişli bir sistemdir. Biyoreaktörler genelde endüstriyel fermantasyon, bitki doku kültürü, gıda endüstrisi, ilaç ve rekombinant proteinlerin (antikor, büyüme faktörü, aşı, antibiyotik vb.) büyük ölçekli üretimlerinde kullanılmaktadır (Topçu and Çölgeçen 2015).

## **1.2 BESİN ORTAMLARI**

Kallus, hücre süspansiyonu, protoplast kültürleri ve bitki rejenerasyonu gibi doku kültürü işlemlerinde en önemli aşama besin ortamına karar vermektir. Farklı bitki türlerinde farklı besin ortamlarının daha iyi sonuç verdiği yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur. Besin ortamlarının formülasyonunda farklı doz ve kombinasyonlarda su, makro ve mikro elementler, vitaminler, şekerler, katılaştırıcılar, bitki büyüme düzenleyiciler, tamponlar ve amino asitler kullanılır. Sıklıkla kullanılan besin ortamları; MS (Murashige and Skoog 1962), LS (Linsmaier and Skoog 1965) ve B5 (Gamborg at al. 1968) dir.

**Çizelge 1.1** Kültür ortamlarındaki konsantrasyon miktarları (mg/l) (Babaoğlu et al. 2001).

Bileşenler	MS	B5	SH	LS	White S-3	NN	Nitsch's H	KM	LM	SI
KNO <sub>3</sub>	1900	2500	2500	1900	80	950	950	1900	1900	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-	-	1650	-	720	720	600	1650	-
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	300	-	-	-	-	-	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134	-	-	-	-	-	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	250	400	370	720	185	185	300	1850	370
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	150	200	440	-	220	166	600	22	440
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	300	-	-	-	-	-
KCl	-	-	-	-	65	-	-	300	-	1400
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-	-	170	68	68	68	170	340	170
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	-	150	-	-	-	-	-	-	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	-	16,5	-	-	-	-	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	200	-	-	-	-	-
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	-	10	10	16,89	-	-	-	10	21	-
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3	-	-	-	7	25	25	-	-	22,3
KI	0,83	0,75	1	0,83	0,75	-	-	0,75	4,15	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	3	5	6,2	1,5	10	10	3	31	6,2
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	2	1	10,58	3	10	10	2	43	8,6
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,2	0,025	-	0,025	0,025	0,025	0,50	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,1	0,25	-	0,25	0,25	0,25	1,25	0,25

CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,1	0,025	-	-	-	0,025	0,125	0,025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	15	27,85	-	27,8	-	-	27,8	27,8
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-
Sequestrene330 Fe	-	-	-	-	-	-	-	28	-	-
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3	20	-	-	37,3	-	-	37,3	37,3
Nikotinic asit	0,5	1	5	-	-	5	-	-	0,5	0,5
Pridoksin-HCl	0,5	1	0,5	-	-	0,5	-	1	0,1	0,5
Thiamin-HCl	0,1	10	5	0,4	-	0,5	-	1	0,1	0,1
Biotin	-	-	-	-	-	0,05	-	0,01	-	-
Folik asit	-	-	-	-	-	0,5	-	0,4	-	-
<i>myo</i> -inositol	100	100	1000	-	-	100	-	100	100	100
l-inositol	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-
Glisin	2	-	-	-	-	2	-	0,1	-	2
Glutamin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1462
Sakkaroz	30000	20000	30000	30000	-	20000	-	20000	30000	10000

### 1.2.1 Majör elementler

Temel besin ortamında en önemli bileşenlerden birisi azottur. Bazı besin ortamlarında fazla miktarda ve değişik formlarda azot bulunurken bazı ortamlarda da düşük miktarlarda azot bulunur. Nadir ortamlarda ise hiç azot bulunmaz. Farklı majör elementlere örnek olarak ise magnezyum, fosfor, kükürt, sodyum ve kalsiyum verilebilir (Babaoğlu 2001).

### **1.2.2 Minör Elementler**

Demir, manganez, çinko, bor, molibden, kobalt ve iyot en çok kullanılan minör elementlerin başında gelmektedir (Gamborg and Philips 1995).

### **1.2.3 Şekerler**

Şekerler besin ortamında en önemli bileşenlerden biridir. Kültür altında tutulan bitki veya eksplantlar yeterli karbonhidrat sentezi yapamadıkları için enerji ihtiyacını şekerlerden karşılar. Besiyerlerinde en çok kullanılan şeker sakkarozdur. Ayrıca glikoz, maltoz, rafinoz ve fruktoz da kültür ortamında sıklıkla kullanılır (Babaoğlu 2001).

### **1.2.4 Vitaminler**

Thiamin (B1 vitamini), nikotik asit (B3 vitamini) ve pridoksin (B6 vitamini) bitki doku kültürü için en gerekli vitaminlerdir. Ayrıca myo-inositol, d-biotin, askorbik asit, folik asit, d-pantotenik asit ve retinol gerekli görüldüğü zamanlarda besiyerine ilave edilebilir (Babaoğlu 2001).

### **1.2.5 Yarı Katı Hale Getiren Maddeler**

Besiyerini yarı katı hale getiren maddelerdir. Genellikle kırmızı deniz alglerinin polisakkarit bileşimlerinden üretilir. En çok kullanılan jel yapıcı maddeler agar, agaroz, sea-kem agaroz, aljinat, silikajel, phytigel, jelatin ve nişastadır. Oluşturulan jel bitkiler tarafından alınamaz ve besiyerindeki diğer bileşenlerle reaksiyona girmezler (Babaoğlu 2001).



### **1.2.6 Bitki Büyüme Düzenleyicileri**

Oksinler; bitki doku kültüründe tek kullanıldıklarında kallus uyarımını ve somatik embriyo oluşumunu sağlar sitokininlerle beraber kullanıldıklarında ise sürgün oluşturlar. Örnek olarak; IAA (organik), IBA, NAA ve 2,4-D(sentetik türev)'dir. Organik oksin elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde, sentetik oksin türevleri ise ticari alanlarda meyve dökümünün önlenmesinde sıklıkla kullanılır (Babaoğlu 2001).

Sitokininler; hücre bölünmesi, sürgün çoğaltımı ve bitki rejenerasyonunda kullanılır. Sürgünlerde köklenme ve embriyogenezi önler ve antioksidan etkisi sebebiyle yaşlanmayı ertelerler. Örneğin; zeatin(organik) kinetin, BAP (sentetik türev)'dir. Doğal sitokininler sentetik türevlerine göre sürgünlerin köklendirilmesinde daha güçlüdür (Babaoğlu 2001).

Oksinlerin ve sitokininlerin dışında absisik asit ve gibberellinler de bitki büyüme düzenleyicileri içerisinde girer. Absisik asit somatik embriyo olgunlaştırılmasında, gibberellinler ise bitki rejenerasyonunun uyarılmasında ve sürgün boyunun uzamasında kullanılır (Babaoğlu 2001).

### **1.3 ANTİOKSİDANLAR**

Antioksidanlar, serbest radikallerin oksidasyonunu önleyen, yakalayan ve stabilize etme kabiliyetine sahip olan maddelerdir. Oksidasyon yavaşlatma işlemlerinde en çok kullanılan ve en etkili olan maddeler antioksidanlardır (Sevim 2011). Serbest radikaller biyolojik sistemlerde ve gıdaların bozulmasında rol oynar. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için antioksidanlar kullanılmaktadır (Sachdeva et al. 2014).

Antioksidanların etki mekanizmaları iki şekilde oluşur:

- a) Serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi,
- b) Serbest radikal oluşumunun engellenmesi (Sevim 2011).

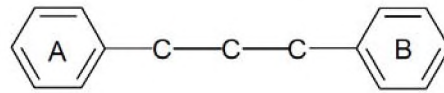
## 1.4 SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller patolojik ve fizyolojik süreçlerde meydana gelebilen, bir yada birden çok eşleşmemiş elektrona sahip olan atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller pozitif, negatif veya nötral yüklü olabilirler (Delibaş and Özçankaya 1995).

Serbest radikaller hayvanlarda ve bitkilerde protein ve DNA hasarına neden olarak hücrelerin yaşlanmasına ve ölümüne neden olmaktadır. İnsanlarda oksidatif stresin etkisiyle Alzheimer, Parkinson ve romatizmal hastalıklara neden olduğu bilinmektedir. Besinlerle alınan antioksidanların, serbest radikallere karşı korunmada, hastalıkların ve en önemlilerinden biri olarak kanserin engellenmesinde etkili olduğu bilinmektedir (Çaylak 2011).

## 1.5 FLAVONOİDLER

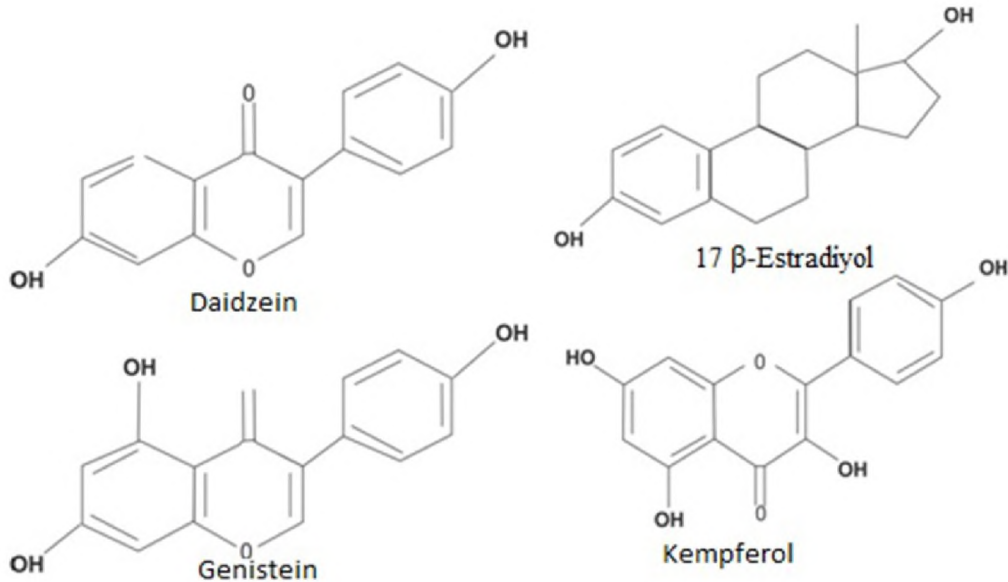
Renklerinin sarı olmaları nedeniyle Latince sarı anlamında olan flavus kelimesinden türetilerek flavonoid ismini almışlardır. 15 C atomlu 2-fenil benzopiron (difenil propan) yapısı (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) gösterirler. Ayrıca polifenolik bileşiklerdir (Kahraman et al. 2002). Flavonoidler bitkide çiçek, yaprak, kök, gövde, tohum ve meyve gibi bütün kısımlarda bulunur (Işık 2005). Flavonoidler 1930 yılına kadar P vitamini olarak isimlendirilmesine rağmen sonraları vitamin olmadığı anlaşılmış ve yeni bir çalışma alanı doğurmuştur (Kumar and Pandey 2013).



Şekil 1.1 Genel flavonoid iskeleti (Işık 2005).

### 1.5.1 Bitkilerde Flavonoidlerin Görevleri

Birçok çiçek ve meyvenin renginin oluşumunda, polinatör çekiminde (pelargonidinler, siyanidinler, delphinidinler), bitkiyi UV-A ve UV-B ışınımından korumada (kempferol), enzim inhibitörü, antioksidan gibi görevleri vardır. Bazı stres koşullarında (yaralanma, kuraklık, metal veya açlık) sentezlenirler. Flavonoidlerin en bilinenleri olan fitoöstrojenler (örneğin; genistein, kempferol, daidzein) yapısal olarak memelilerdeki 17  $\beta$ -estradiol (E2)'e benzerdirler. Bitkilerdeki bir başka görevi de enerji dönüşümü ve büyüme hormonlarına etki etmesidir. Antioksidan kapasite derecesi ve UV dalga boylarını emme yeteneği flavonoidlerin farklı halka yapısına sahip olmalarından kaynaklıdır. Antioksidan kapasitesi fazla olan flavonoidler dihidroksi B halkasına sahipken, UV dalgalarını daha iyi absorbe etme yeteneği monohidroksi B halkalı flavonoidlerdir. Fitoöstrojenler bakımından Fabaceae familyası oldukça zengindir. Flavonoidlerin bulunuş yerleri genelde vakuollerdir. Hücre içi taşınımı endoplazmik retikulum tarafından sağlanır. Oksin hareketi ve yıkımını düzenleyen moleküllerin flavonoidler olduğu düşünülmektedir. Ayrıca flavonoidler plazma membranındaki oksin taşınımında proteinlerin etkili inhibitörüdürler (Işık 2005, Kumar and Pandey 2013).



Şekil 1.2 17  $\beta$ -estradiol'ün flavonoidlerle yapısal benzerliği (Aktaş and Çölgeçen 2017).

### 1.5.2 Hayvanlarda Flavonoidlerin Etkileri

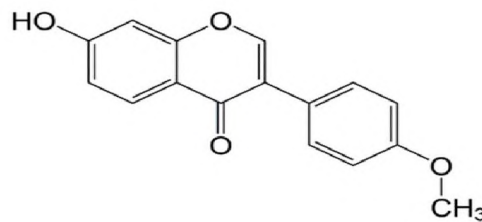
Flavonoidler uzun yıllar çalışılmış olmasına rağmen biyolojik aktiviteleri ve hücrel mekanizmaları tam anlamıyla aydınlığa kavuşmuş değildir. Ancak yapılan çalışmalarda serbest radikal uzaklaştırıcı (antioksidan), kardiyovasküler, karaciğer koruyucu, antiviral ve son zamanlarda da antikanserojen etkisi olduğu ortaya konulmuştur (Birman 2012).

Flavonoidleri ticari olarak farklı alanlarda da kullanmak amacıyla araştırmalar yapılmaktadır. Flavonoidlerin antioksidan özellikleri tanenlerin bileşenine katılmalarını sağlar. Bundan dolayı besin, tekstil, deri, metalürji, tıp, ziraat gibi alanlarda kullanımı artmakla birlikte bazı ürünleri ve malzemeleri boyama işlerinde kullanılmaktadır. UV ışınımından koruma özelliği sayesinde bazı flavonoidlerin kozmetik ürünlerinde özellikle kremlerde kullanıldığı bilinmektedir (Işık 2005).

### 1.5.3 Formononetin

Formononetin bir izoflavonoiddir. İzoflavonoidlerin östrojen seviyesini artırarak menopoz semptomlarını azalttığı klinik çalışmalarla ortaya konulmuştur (Çölgeçen et al. 2014). Asyalı kadınlarda izoflavonid içeriği yüksek soya bazlı besin tüketimi sayesinde östrojen bağımlı kanserlerin az görüldüğü bilinmektedir (Evcimen and Aslan 2015). Ayrıca formononetin endoplazmik redikulum için belirlenmiş en iyi aktivatörlerden biridir (Medjakovic and Jungbauer 2008).

Formononetin, Alzheimer hastalığında, kırık iyileşmesinde, kardiyovasküler hastalıklarda, kolon ve meme kanseri hastalıklarında antitümör etkisi olduğu belirlenmiştir (Kaczmarczyk-Sedlak et al. 2013).



Şekil 1.3 Formononetinin yapısı.

## 1.6 TOPLAM FENOLİK MADDE TAYİNİ

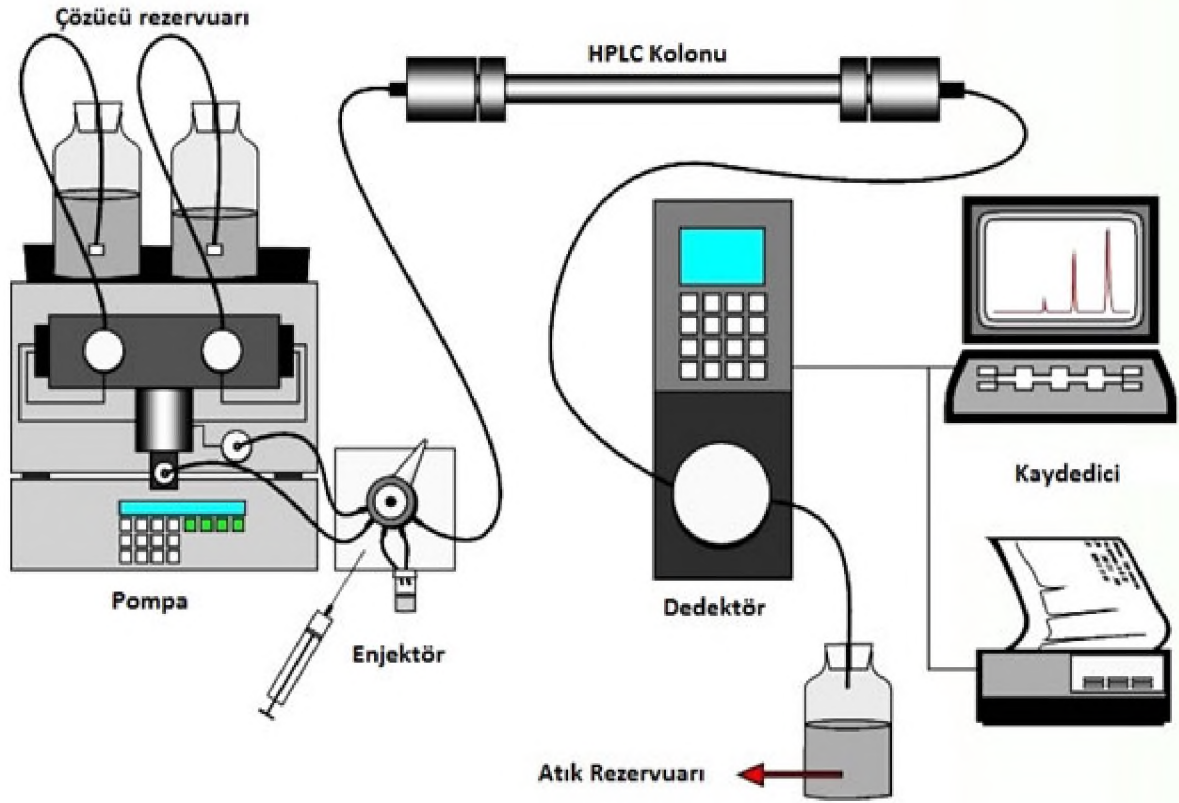
Toplam fenolik madde miktarı belirlemede farklı yöntemler kullanılmaktadır (TRAP metodu, Folin Ciocalteu metodu, TEAC metodu, CUPRAC metodu) (Karadağ et al. 2009). Bizim çalışmamızda toplam fenolik madde tayini Folin Ciocalteu yöntemiyle yapılmıştır. Örneklerdeki toplam fenol madde miktarı belirlemede, antioksidan aktivite sağlayan hidroksil gruplarının hakkında bilgi verici niteliktedir. Su ve organik çözücülerde çözünen fenolik bileşiklerin Folin Ciocalteu reaktifiyle renkli bileşik oluşturması olayıdır. Bu bileşik 765 nm absorbansta maksimuma ulaşır. Bu fenolik madde tayini yöntemi Singleton ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Singleton and Rossi 1965, Singleton et al. 1999).

## 1.7 YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Yüksek performanslı sıvı kromatografisidir. Son dönemde genellikle biyolojik, farmakolojik, endüstriyel ve ilaç sanayi gibi alanlarda örneklerin ayrılması ve belirlenmesinde kullanılmaktadır.

HPLC analizi sonuçlarının tekrarlanabilirliği yüksek olan cihazdır. Tüm kromatografik tekniklerin uygulanması için ihtiyaç duyulan uygun kolondur. Amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbohidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler ve steroidler gibi birçok ürüne uygulanabilir. HPLC kolonlarında duyarlılık çok yüksektir ve rejenerasyon gerekmeden birçok kez kullanılabilir. 10 µg'lık bir örnekte dahi floresans veya elektron yakalama dedektörleri yardımıyla tayin işlemi uygulanabilir. Dezavantaj olarak görülen ise hareketli faz olarak kullanılan yürütücülerin (solvan) pahalı olmasıdır.

HPLC ekipmanları bir hareketli faz deposu, pompa, enjektör, ayırma kolonu, dedektör, bilgisayara verilerin aktarma portu (USB) ve bilgisayar programıdır. HPLC analiz işlemi, çözücüdeki örneğin cihaza enjekte edilmesiyle başlar. Sistemin en önemli bölümü kolondur. Örnek ile hareketli fazın kolona pompalanmaya başlamasıyla kolon içerisinde bileşenlere ayırma işlemi başlar. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından ayrı ayrı kaydedilir ve bilgisayara aktarılır. Bu sonuçlar kromatogram olarak isimlendirilir.



Şekil 1.4 Bir HPLC cihazının şematik gösterimi (İnovatif kimya dergisi 2018).

### 1.7.1 HPLC ile Miktar Tayini

HPLC’de madde miktar tayini pik alanları sayesinde hesaplanır. Miktar tayininde kullanılan örneğin alanı hesaplanır. Kullanılan standart çözeltisinin pik alanı da hesaplanır. Standartın kalibrasyon eğrisi çizilir ve karşılaştırma yapılır. Kromatogramlardan alınacak doğru sonuçlar kolon sıcaklıkları, elüent akış hızları ve örnek enjeksiyon hızlarının sabit olmasına bağlıdır. Bunların kontrolü mutlak suretle yapılmalıdır. Artık gelişmiş kromatografik cihazlar sayesinde pik alanları otomatik ve güvenilir sonuçlar vermektedir (Skoog and Leary 1992, Cazes 2004).

## BÖLÜM 2

### LİTERATÜR ÖZETİ

#### 2.1 *MEDICAGO SATIVA* L. CV. (ELÇİ YONCASI)'NIN GENEL ÖZELLİKLERİ

##### 2.1.1 *Medicago* L. Cinsinin Özellikleri

*Medicago* dünyada ve ülkemizde en önemli yem bitkilerinden birisidir. Matenears'ın deyimine göre “yonca yem bitkilerinin kraliçesidir.” Yonca kökü çok kuvvetli olmakla beraber yılda 3-7 kere biçilme kapasitesi sayesinde bol ot verme gücü vardır. Uzun ömürlü bir bitki olmasının yanı sıra *M. sativa* üstün kalitede yem bitkisidir.

Yoncalar 1, 2 veya çok yıllık otsu nadiren çalimsı bitkidir. Yaprak tipik 3 yaprakçıktan oluşan trifoliattır. Yaprakçıklar uzun ve eliptik şekilde ve orta yaprakçık sapı belirgin bir şekilde uzundur. Erkek organ Diadelphous'dur. Meyve düz, orak ve helezon şekildedir. İçerinde 1 yada birden çok tohum bulunur (Elçi 2005).

Elçi (2005)'de belirtilen *Medicago* tür sayısı dünyada 64 Türkiye'de ise 30 iken günümüzde bu sayı artmıştır;

Dünya üzerinde bulunan *Medicago* türleri:

*Medicago arabica*, *Medicago arborea*, *Medicago archiducis-nicolai*, *Medicago astroites*, *Medicago aurantiaca*, *Medicago biflora*, *Medicago blanchiana*, *Medicago bonarotiana*, *Medicago brachycarpa*, *Medicago cancellata*, *Medicago carstiensis*, *Medicago ciliaris*, *Medicago citrina*, *Medicago constricta*, *Medicago coronata*, *Medicago crassipes*, *Medicago cretacea*, *Medicago daghestanica*, *Medicago disciformis*, *Medicago doliata*, *Medicago edgeworthii*, *Medicago falcata*, *Medicago fischeriana*, *Medicago granadensis*, *Medicago heyniana*, *Medicago huberi*, *Medicago hybrida*, *Medicago hypogaea*, *Medicago intertexta*, *Medicago italica*, *Medicago laciniata*, *Medicago lanigera*, *Medicago laxispira*,

*Medicago lesinsii*, *Medicago littoralis*, *Medicago lunata*, *Medicago lupulina*, *Medicago marina*, *Medicago medicaginoides*, *Medicago minima*, *Medicago monantha*, *Medicago monspeliaca*, *Medicago murex*, *Medicago muricoleptis*, *Medicago noeana*, *Medicago orbicularis*, *Medicago orthoceras*, *Medicago ovalis*, *Medicago pamphylica*, *Medicago papillosa*, *Medicago persica*, *Medicago phrygia*, *Medicago pironae*, *Medicago platycarpus*, *Medicago plicata*, *Medicago polyceratia*, *Medicago polymorpha*, *Medicago popovii*, *Medicago praecox*, *Medicago prostrata*, *Medicago radiata*, *Medicago rhodopea*, *Medicago rhytidiocarpa*, *Medicago rigidula*, *Medicago rigiduloides*, *Medicago rostrata*, *Medicago rotata*, *Medicago rugosa*, *Medicago ruthenica*, *Medicago sativa*, *Medicago sauvagei*, *Medicago saxatilis*, *Medicago schischkinii*, *Medicago scutellata*, *Medicago secundiflora*, *Medicago shepardii*, *Medicago sinskiae*, *Medicago soleirolii*, *Medicago sphaerocarpos*, *Medicago strasseri*, *Medicago suffruticosa*, *Medicago syriaca*, *Medicago tenoreana*, *Medicago tornata*, *Medicago truncatula*, *Medicago tuberculata*, *Medicago turbinata*, *Medicago sp.* (NCBI 2018).

Türkiye’de bulunan *Medicago* türleri:

*Medicago radiata*, *Medicago orbicularis*, *Medicago lupulina*, *Medicago sativa*, *Medicago x varia*, *Medicago falcata*, *Medicago papillosa*, *Medicago arborea*, *Medicago scutellata*, *Medicago noeana*, *Medicago blanchiana* varyete *blanchiana*, *Medicago blanchiana* varyete *bonarotiana*, *Medicago rotata* varyete *rotata*, *Medicago rotata* varyete *eliezeri*, *Medicago coronata*, *Medicago praecox*, *Medicago minima* varyete *minima*, *Medicago minima* varyete *brevispina*, *Medicagodisciformis*, *Medicago polymorpha* varyete *polymorpha*, *Medicago polymorpha* varyete *vulgaris*, *Medicago arabica*, *Medicago marina*, *Medicago shepardii*, *Medicago littoralis* varyete *littoralis*, *Medicago truncatula* varyete *truncatula*, *Medicago truncatula* varyete *longiaculeata*, *Medicago rigidula* varyete *rigidula*, *Medicago rigidula* varyete *cinerascens*, *Medicago rigidula* varyete *submitis*, *Medicago rigidula* varyete *agrestis*, *Medicago constricta*, *Medicago doliata* varyete *muricata*, *Medicago turbinata* varyete *turbinata*, *Medicago turbinata* varyete *chiotica*, *Medicago turbinata* varyete *aculeata*, *Medicago murex* varyete *murex*, *Medicago intertexta* varyete *ciliaris*, *Medicago granadensis* (TÜBİVES 2018).

### 2.1.2 *Medicago* Cinslerinde Yapılan HPLC Analiz Çalışmaları

Baklagil familyası hem hayvanlar hemde insanlar açısından oldukça fazla tüketilen, tarımsal ve ticari önemi bulunan besin kaynağıdır. Bu besinler arasında *Medicago*’nun da önemi fazladır. Farag ve arkadaşlarının yaptığı *M. truncatula* cv. Jemalong çalışmasında bitki örneği ile hücre süspansiyon kültüründe yetiştirdikleri örnekleri karşılaştırmışlardır. Hücre süspansiyon kültüründe SH (Schenkand Hildebrandt ) ortamı kullanılmıştır. Bu çalışmada



farklı flavonoid ve izoflavonoidler kıyaslanmıştır. Örneğin HPLC çalışmasında bitkide belirlenemeyen daidzein, genistein, biokanin A, naringenin gibi maddeler hücre süspansiyon kültüründe belirlenmiştir. Ayrıca formononetin miktarında bitkiye kıyasla hücre süspansiyon kültüründe azalma olduğu ortaya konmuştur (Frag et al. 2007).

*M. truncatula* (Turface'de yetiştirilmiş)'nin 8-9 haftalık bitki örneklerinden yapılan çalışmada bazı flavonoidlerin varlığı ve miktarları üzerinde çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışma formononetinin bitkide bulunduğu yönündedir (Modolo et al. 2007).

Yapılan 9 farklı *Medicago* (*M. arabica*, *M. doliata*, *M. minima*, *M. murex*, *M. orbicularis*, *M. polymorpha*, *M. rigidula*, *M. tornata* and *M. truncatula*) cinsi çalışmasında aralarındaki flavonoid madde miktarları farkları çalışılmıştır. 11 farklı izoflavonoid kullanılmıştır; Puerarin, daidzin, genistin, daidzein, glisitein, genistein, pratensein, formononetin, irilone, prunetin, biokanin A. Yapılan HPLC analizlerinde 9 farklı cinsin birbirlerinden çok farklı madde miktarlarına sahip oldukları bulunmuştur (Visnevschi-Necrasov et al. 2015).

### **2.1.3 *Medicago sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası)'nın Morfolojik Özellikleri**

Saplar, kök tacından sürgün verirler. Bazal tomurcuktan 20-25 arası sap oluşabilir. Genç sürgünlerin içi dolu, yaşlı sürgünlerin içi boştur. Bitki boyu çevre şartlarına bağlı olarak değişebildiği gibi ortalama 60-100 cm arasındadır. Dik olarak yetişebildiği gibi bazı durumlarda yatık olarak da görülebilir.

Yapraklar trifoliattır. Ortadaki yaprak sapı diğerlerinden uzundur. Yapraklar 0.5-2 cm uzunluk, 0.2-1 cm genişliğindedir. Kulakçıklar genelde mızrak gibi, kenarları derin dişli ucu sivridir.

Çiçekler 0.5-1 cm uzunluğunda, her çiçek 2-3 mm'lik saplarla salkıma bağlıdır. Her salkımda 10-30 arası çiçek vardır. Meyveler yaprak koltuklarında salkım biçimindedir. Her meyvede 2-3 tohum vardır. Tohumlar parlak ve kahverenkli. Boyu 2-3 mm civarındadır (Elçi 2005).

*M. sativa* L. dünya üzerinde ılıman bölgelerde yayılış gösteren (ABD, güney Kanada, Avrupa, Çin, Güney Amerika ve Güney Afrika) bir bitkidir. Genel olarak 2400 m rakıma kadar yayılış kabiliyeti gösterir. Diğer yem türlerine göre kuraklığa daha fazla dayanıklıdır (FOA 2018).

**Çizelge 2.1** *Medicago sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası)'nın taksonomisi (USDA PLANTS 2018).

Alem	Plantae
Alt alem	Tracheobionta
Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Fabales
Aile	Fabaceae
Cins	<i>Medicago</i> L.
Tür	<i>Medicago sativa</i> L.
Alt tür	<i>Medicago sativa</i> L. cv. Elçi (Elçi yoncası)

## 2.2 CANLI HÜCRE BELİRLEME ÇALIŞMALARI

Canlı hücre belirleme çalışmaları için literatür taraması yapılırken *M. sativa*'daki süspansiyon kültürü çalışmalarının az olduğu görülmüştür. Biz çalışmamızı biyoreaktöre taşımak istediğimizden hücre canlılığı bizim için önemlidir. Ayrıca farklı türlerdeki hücre canlılık testleri çalışmalarına bu bölümde yer verilmiştir.

Hücre süspansiyon kültürlerinde iki çeşit hücre tipi vardır. Bu hücre tipleri; silindirik ve küreseldir (Carpita 1985). Bizim çalışmamızda da bu iki tip hücre gözlenmiştir. Zhao ve arkadaşlarının yapmış olduğu (*Saussurea medusa*) çalışmada hücre süspansiyon kültürlerindeki agregat boyları ölçülerek farklı boylardaki agregatların jaceosidin üretimine etkisi araştırılmıştır. 3 ve 4 mm'lik agregatların 6 mm'lik agregata göre 10 günün sonunda daha fazla jaceosidin ürettiği belirlenmiştir. Ayrıca 12 gün sonunda ise jaceosidin üretimi her agregat tipinde aynı olduğu ortaya konulmuştur (Zhao et al. 2003).

*M. sativa* L. (Chaubet tarafından üretilen)'de yapılan hücre süspansiyon kültürü çalışmasında hücreler MS ortamında yetiştirilmiştir. Hücre canlılığı belirlemek üzere % 0.375'lik trypan blue boyası kullanılmıştır. Yapılan bu hücre canlılık testinde 11 günlük periyot takip edilmiştir ve en iyi oranın % 80'le ilk gün olduğu belirtilmiştir. Ayrıca gün geçtikçe hücre canlılık oranında düşüş olduğu 11. günde ise bu oranın % 20'ye düştüğü belirlenmiştir (Steward et al. 1999).

Baker ve Mock'un çalışmasında *Glycine max* ve *Nicotiana tabacum* üzerinde *Pseudomonas syringae* bakterisinin hücre canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir. Canlılık tayini için Evans Blue kullanılmıştır. *Pseudomonas syringae*'in hücre süspansiyon kültüründeki örnekler üzerinde canlılığı olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir. 15 saatlik periyotta hücre canlılığında % 70'in üzerinde düşüş olduğu belirtilmiştir (Baker and Mock 1994).

*Glycine max* üzerinde yapılmış bir başka hücre canlılık testi araştırmasında fenosafranin boyası kullanılmıştır. Fenosafranin ile ölü hücrelerin boyandığı ve bunların sayıldığı belirtilmiştir. *Glycine max* hücreleri üzerine *Fusarium solani* fungal hastalık etmeni bırakılarak hücre canlılığındaki değişim kıyaslanmıştır. *Fusarium solani* maruziyeti sonucu ölü hücre oranı % 80'e yaklaşmıştır (Li et al. 1999).

Trypan blue boyası bitki hücrelerinin yanı sıra hayvan hücrelerinin canlılık testlerinde de sıklıkla kullanılır. Patel ve arkadaşlarının *Solanum nigrum*'un *Hela* hücrelerindeki antikanser aktivitesi araştırılmıştır. *Solanum nigrum* ekstresi *Hela* hücrelerine enjekte edilerek inkübasyon sonunda hücre canlılığına aktivitesi araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda *Hela* hücrelerinin canlılık oranı % 70-72 çıkmıştır (Patel et al. 2009).

Keller ve arkadaşları yapmış oldukları *Momordica charantia* çalışmasında hücre canlılığı tespiti için Trypan Blue kullanmışlardır. Ölü ve canlı hücreleri ayrı ayrı sayarak sonuçları oluşturduklarını belirtmişlerdir. *Momordica charantia*'nın etanollü ekstraktlarında canlılık oranı düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru düştüğü yönde belirlenmiştir (Keller et al. 2011).

### 2.3 *MEDICAGO SATIVA*'DA YAPILAN TOPLAM FENOLİK MADDE MİKTARI VE DPPH ÇALIŞMALARI

*M. sativa* Linn. (NISCAIR tarafından taksonomik teşhisi yapılmış “Himalaya herbs store”dan temin edilmiş)’in 200 gramlık oda sıcaklığında kurutulmuş herba örnekleri 48 saat boyunca MeOH’le ekstrakte edilmiştir. Örnekler 517 nm absorbansta spektrofotometrede okutulmuştur. DPPH süpürme aktivitesi çalışmasında etki % 71.05 olarak tayin edilmiştir (Bora and Sharma 2010).

*M. sativa* Linn. (NISCAIR tarafından taksonomik teşhisi yapılmış “Himalaya herbs store”dan temin edilmiş)’de yapılan bir diğer DPPH çalışmasında herbaryumdan temin edilen kuru 100 g örnek 24 saat boyunca MeOH’le ekstrakte edilmiştir. Spektrofotometrede 517 nm absorbansta örnekler okutulmuştur. Yapılan çalışma sonucu DPPH süpürme aktivitesi % 70 olarak ortaya konulmuştur (Bora and Sharma 2011).

Karimi ve arkadaşlarının *M. sativa* (İran’da Taghavi çiftliğinden temin edilmiş)’da yaptığı çalışmada herba örnekleri liyofilizatörde kurutulmuştur. Kurutulan örnekten 2 g ile ekstraksiyon işlemi % 80’lik MeOH kullanılarak yapılmıştır. Spektrofotometrede 765 nm absorbansta okutulan toplam fenolik madde miktarı 45.2 mg/g olarak tayin edilmiştir. DPPH süpürme aktivitesi de % 54 olarak belirlenmiştir (Karimi et al. 2013).

*M. sativa* L. (Kanada’da “Healt store”dan temin edilmiş)’de yapılan toplam fenolik madde miktarı (Folin Ciocalteu metodu) ve DPPH çalışmasında 2 ile 7 gün arasındaki fideler kullanılmıştır. Total fenol çalışmasında en iyi sonucu 4 günlük fideden 0.9 mg/100 g olarak elde etmişlerdir. DPPH analizleri sonucunda ise 6 günlük fideden % 64 giderim aktivitesi olduğunu belirlenmiştir (Zincă and Vizireanu 2013).

Silva ve arkadaşlarının yapmış olduğu *M. sativa* L. (marketten temin edilmiş) çalışmasında herba örneği liyofilizatörde kurutulmuştur ve 3 g kuru örnekle saf suda ekstraksiyon işlemi

yapılmıştır. Herba örneğinin DPPH süpürme aktivitesinin % 56 olduğu belirlenmiştir ( Silva et al. 2013).

## 2.4 *MEDICAGO SATIVA* L.'DE YAPILAN HPLC ANALİZ ÇALIŞMALARI

*Medicago sativa* protein, vitamin (A, C, E, K, B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>) ve mineral (folik asit, kalsiyum, potasyum vb.) bakımından zengin bir bitkidir. Sindirimi kolaylaştırıcı etkisinin yanında saponin ve demir içeriği bakımından zengindir (Gülen 2013).

Vücut için kuvvet ve enerji verici, kanı ve karaciğeri detoksifiye edici, toksik madde uzaklaştırıcı, enfeksiyonlara karşı savaşçı, kansızlık için oldukça faydalı bir bitkidir. Irak ve Türkiye'de eklem iltihaplarına, ABD'de ise kanser hastalıklarına karşı kullanılmaktadır. *M. sativa*'nın östrojen seviyesini artırarak kadınlarda menopoz dönemi semptomlarını azalttığı bilinmektedir (Gülen 2013).

Son yıllarda *Medicago sativa* ökaryotik özel moleküllerin üretiminde çok kullanılan bir bitkidir. Ayrıca flavonoid içeriği bakımından zengin olan Fabaceae familyasında fazlaca *in vitro* üretim stratejileri uygulanmaktadır (Fritzemeier et al. 1983, Rolfs et al. 1987, Luczkiewicz and Daniel Glo'd 2003, El-Beltagi et al. 2011, Çölgeçen et al. 2014).

*M. sativa* L. cv. Moapa 69'da yapılan bir başka çalışmada hidroponik çözelti ile yetiştirilen bitkiler *Rhizobium meliloti* bakterisine maruz bırakılarak içerisindeki flavonoid değişiklikleri gözlemlenmiştir. *R. meliloti* bulunan bitki örneğiyle bulunmayan bitki örneği HPLC ile ölçüm yapılarak kıyaslanmıştır. Bakteriye maruz bırakılan bitkide, *R. meliloti* bulunmayan bitkiye göre 3 farklı flavonoid gözlenmiştir. Farklı gözlenen flavonoidlerden biri de formononetindir. Diğer ikisi medikarpin ve medikarpin glikosittir (Dakora et al. 1993).

*M. sativa* L.'de yapılan hücre süspansiyon kültürü çalışmasında medikarpin varlığı analizler sonucu ortaya konulmuştur. Ayrıca medikarpin fungal elisitöre 4 saatlik maruziyeti sonucu enzim aktivitesini indüklediği belirlenmiştir. Hücre süspansiyon kültürlerinde yüksek seviyelerde biriken medikarpinin fitoaleksin biyosentezini uyardığı belirtilmiştir (Orr vd. 1993).

*M. sativa* L. cv. Euver'da yapılmış olan bakır klorür stresine karşı çalışmada normal şartlarda bitkide bulunmayan formononetin ve medikarpinin 1 mM bakır klorür uygulanan bitkide formononetin ve medicarpin tespit edilmiştir. Bakır klorür bitkiye hipokotillerinden kesit alınarak hidroponik yöntemle eklenmiştir. Bakır klorür eklenen bitkide formononetin miktarının en yüksek ölçümü 1 gramlık yaş bitki örneğinde 3,3 nmol olarak ölçülmüştür (Parry et al. 1994).

Coronado ve arkadaşlarının yapmış olduğu *M. sativa* cv. Nagyszenas çalışmasında azot oranlarındaki değişikliklerle bitkideki formononetin miktarının farklılıklarını ortaya koymuşlardır. Aeroponik sistemle geliştirdikleri bitkilere iki farklı potasyum nitrat (KNO<sub>3</sub>) konsantrasyonu (0.25 mM ve 10 mM) kullanmışlardır. Sınırlı azot kullandıkları bitki ekstresinde yaptıkları HPLC analizi sonucu formononetin madde miktarının daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (Coronado et al. 1995).

Fitoaleksinler, bitki bünyesinde mikrobik, fungal ve fiziksel stres faktörlerine karşı üretilen antimikrobiyal ve antifungal etkili bileşiklerdir. Bir izoflavonoid olan medikarpin *Medicago*'daki en önemli fitoaleksindir. Xian-Zhi He ve arkadaşları kallus kültürü tekniğiyle SH (Shenk ve Hildebrandt) ortamında çoğalttıkları *M. sativa* cv. Apollo hücrelerini hücre süspansiyon kültürlerine alarak üretime devam etmişlerdir. Elde ettikleri hücrelerin analizlerini gerçekleştirdiklerinde medicarpinin önemli ölçüde arttığını ve formononetin varlığını tespit etmişlerdir (He et al. 1998).

Larose ve arkadaşlarının yapmış olduğu *M. sativa* cv. Sitel çalışmasında mikorizal mantarın flavonoidler üzerine etkisi incelenmiştir. Bitki köklerine *Glomus intraradices* mantarı uygulanmıştır. Bitkiden 0.5-2 g arasındaki kuru örneklerden hazırlanan ekstraktlardan yapılan analizlerde daidzein miktarında artış görülürken formononetin miktarları azalmıştır (Larose et al. 2002).

*M. sativa* cv. Lucerne'de yapılan LC-MS çalışmasında 2 g kuru örneklerden hazırlanan ekstraktan yapılan analizlerde biyokanin A, komestrol, daidzein, formononetin ve genistein analizleri yapılmıştır. Bitkideki formononetin miktarı 40 mg/kg olarak tespit edilmiştir (Martin et al. 2006).

Çölgeçen ve arkadaşlarının yaptığı *Medicago sativa* L.cv. Elçi (Elçi yoncası) çalışmasında normal koşullarda daidzein varlığı bitkide tespit edilememişken kallus kültürleriyle yapılan analizlerde üretilebildiği gösterilmiştir. Çalışmanın devamında kallus kültürlerini hücre süspansiyon kültürlerine taşıyarak hücre çoğaltmasına devam etmişlerdir. Hücre süspansiyon kültürlerinden gerçekleştirdikleri analizler sonucu da daidzeinin yanı sıra formononetinin de bitki tarafından üretildiği belirlenmiştir. Bu araştırma sonunda ise doğal ortamındaki bitkiye ve kallus ortamına kıyasla hücre süspansiyon kültüründe daidzein ve formononetin miktarlarının daha yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir (Çölgeçen et al. 2014).

Aralarında *M. sativa* cv. Azurara'nında bulunduğu 6 farklı *Medicago* cinsinden HPLC analizleri yapılmış ve farklı flavonoid miktarları çalışılmıştır. 1 gramlık kuru örneklerden hazırlanan, farklı ekstraksiyon yöntemleride kıyaslanan çalışmada sulu çözelti ile hazırlanan *M. sativa* ekstraksiyonunda formononetin ve daidzein tespit edilememiştir. Ancak etanollü ekstraksiyonda daidzein 1.48 mg/kg, formononetin ise 2.40 mg/kg olarak tespit edilmiştir (Rodrigues et al. 2014).

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOD

#### 3.1 MATERYAL

Bu tez çalışmasında kullanılan *M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası) Bülent Ecevit Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne ait olan deneme bahçesinde yetiştirilmektedir. *M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası)'ndan elde edilen çiçekler kurutularak tohumlar temin edilmiştir.

Mayıs ve eylül ayı olmak üzere deneme bahçemizden herba örnekleri toplanmıştır. 40-50 cm arasında toplanan örnekler liyofilizatörde kurutularak -80 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1 *M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası) tohumları.



### **3.1.1 Eksplant**

Bitki büyüme maddesi içermeyen MS ortamlarına 10-12 tane tohum ekilerek 15 günlük aseptik genç fideler elde edilmiştir. Daha önceki çalışmada (Çölgeçen et al. 2014) en iyi üretim sağlanan hipokotil, kotiledon ve apikal meristem olmak üzere 3 farklı eksplant alınarak kallus üretimi yapılmıştır.

## **3.2 YÖNTEM**

### **3.2.1 Çalışmada Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu**

Laboratuarda kullanılan kavanozlar, filtre kağıtları, alüminyum folyolar otoklavda 121 °C'de 1 atm basınç altında 20 dk, petripler, pensler, bisturiler ve mezurlar ise alüminyum folyoya sarılarak 190 °C'de etüvde en az 2 saat sterilize edildi.

### **3.2.2 Besin Ortamlarının Sterilizasyonu**

Tohum çimlendirme, kallus kültür ortamı ve büyük ölçekli hücre süspansiyon kültürü ortamları otoklavda 121 °C'de 1 atm basınç altında 20 dk sterilize edildi.

### **3.2.3 *M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası) Tohum Sterilizasyonu**

Tohumlar yüzey sterilizasyonu için 96 %'lik etil alkolde bir dakika bekletildi. Tohumlar 3 defa, otoklavlanmış distile su ile yıkandı ve 10 %'luk ticari sodyum hipoklorit (NaOCl) içerisinde 5 dakika bekletildi. Daha sonra tohumlar 3 kere, otoklavlanmış distile suyla durulanarak hormonsuz MS (Murashige and Skoog 1962) ortamına ekildi.

## **3.3 MS ORTAMI**

MS ortamı hazırlamak için öncelikle aşağıdaki çizelgelerde belirtilen ölçülerde stok çözeltiler hazırlandı.

### 3.3.1 Majör elementler

Çizelge 3.1 MS ortamında kullanılan majör tuzlar.

MAJÖR STOK	g/lt
KNO <sub>3</sub>	19
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,5
CaCl.H <sub>2</sub> O	4,4
MgSO <sub>4</sub>	3,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7

Çizelge 3.1’de belirtildiği ölçülerde majör tuzlar hassas terazide tartılarak balon jodedeki saf suya sırasıyla eklendi. Hacim 1 litreye tamamlandı ve manyetik alan karıştırıcısı yardımıyla çözümleri sağlandı. Elde edilen major stok çözeltisi amber renkli şişede etiketlenip buzdolabında saklandı.

### 3.3.2 Minör elementler

Çizelge 3.2 MS ortamında kullanılan minör tuzları.

MİNÖR STOK	g/lt
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,62
KI	0,083
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,68
Na <sub>2</sub> NaO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,86
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025

Çizelge 3.2’de belirtilen ölçülerde minör tuzlar tartıldı. Balon jojedeki saf suya sırasıyla eklendi. Hacim 1 litreye tamamlandı ve manyetik alan karıştırıcısı yardımıyla çözümleri sağlandı. Elde edilen minör stok çözeltisi amber renkli şişede etiketlenip buzdolabında saklandı.

### 3.3.3 Demir stok

**Çizelge 3.3** MS ortamında kullanılan demir stok.

<b>DEMİR STOK</b>	<b>g/lt</b>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,78
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	3,72

Çizelge 3.3’de belirtilen ölçülerde Demir sülfat (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) ve Sodyum EDTA (Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O) hassas terazide tartıldı. Balon jojedeki saf suya sırasıyla eklendi. Hacim 1 litreye tamamlanarak manyetik alan karıştırıcısı yardımıyla çözdürüldü. Elde edilen demir stok çözeltisi amber renkli şişede etiketlenerek buzdolabında saklandı.

### 3.3.4 Vitamin stok

**Çizelge 3.4** MS ortamında kullanılan vitamin stok.

<b>VİTAMİN STOK</b>	<b>g/lt</b>
Nikotinik asit (B3 vitamini)	0,025
Piridoksin-HCl (B6 vitamini)	0,025
Tiamin-HCl (B1 vitamini)	0,025

Vitamin elementleri çizelge 3.4’deki miktarlarda hassas terazide tartılarak balon jojedeki saf suya sırasıyla eklendi. Hacim 1 litreye tamamlanarak manyetik alan karıştırıcısı yardımıyla

çözdürüldü. Elde edilen vitamin stok çözeltisi amber renkli şişede etiketlenerek buzdolabında saklandı.

### **3.3.5 Bitki büyüme düzenleyicilerinin stokları**

a) 2,4 dikloro fenoksi asetik asitin (2,4-D) stok çözelti olarak hazırlanması (mg/ml)

2,4 dikloro fenoksi asetik asit (2,4-D) 50 mg tartılıp temiz bir behere alındı. İçerisine 2-3 damla 1M NaOH eklenerek çözünmesi sağlandı. Üzerine 50 ml saf su eklendi ve manyetik alan karıştırıcısında çözüldü. Etiketlenerek amber renkli şişede buzdolabında saklandı.

b) Kinetin stok çözelti olarak hazırlanması

Kinetin 50 mg tartılıp temiz bir behere alındı. İçerisine 2-3 damla 1M HCl eklenerek çözdürüldü. Üzerine 50 ml saf su eklendi ve manyetik alan karıştırıcısında çözüldü. Etiketlenerek amber renkli şişede buzdolabında saklandı.

c) Naftalin asetik asit (NAA) stok çözelti olarak hazırlanması

Naftalin asetik asit (NAA) 50 mg tartılıp temiz bir behere alındı. İçerisine 2-3 damla 1M NaOH eklenerek çözünmesi sağlandı. Üzerine 50 ml saf su eklendi ve manyetik alan karıştırıcısında çözüldü. Etiketlenerek amber renkli şişede buzdolabında saklandı.

### **3.3.6 pH ayarlaması**

Besin ortamlarına agar eklenmeden önce pH ayarı bitki için optimum olan 5.8'e ayarlandı.

1 M NaOH ve 1 M HCl çözeltileri yardımıyla ayarlama yapıldı.

### **3.3.7 Agar eklenmesi**

pH ayarı yapılmış MS ortamına en son olarak otoklava bırakılmadan önce 7 g/l olacak şekilde agar eklendi.

### 3.4 KULLANILAN BESİYERLERİNİN İÇERİKLERİ

#### 3.4.1 Tohum Yetistirme Besin Ortamı

Tohum çimlendirme (standart MS ortamı) ortamını hazırlamak için (1 litre);

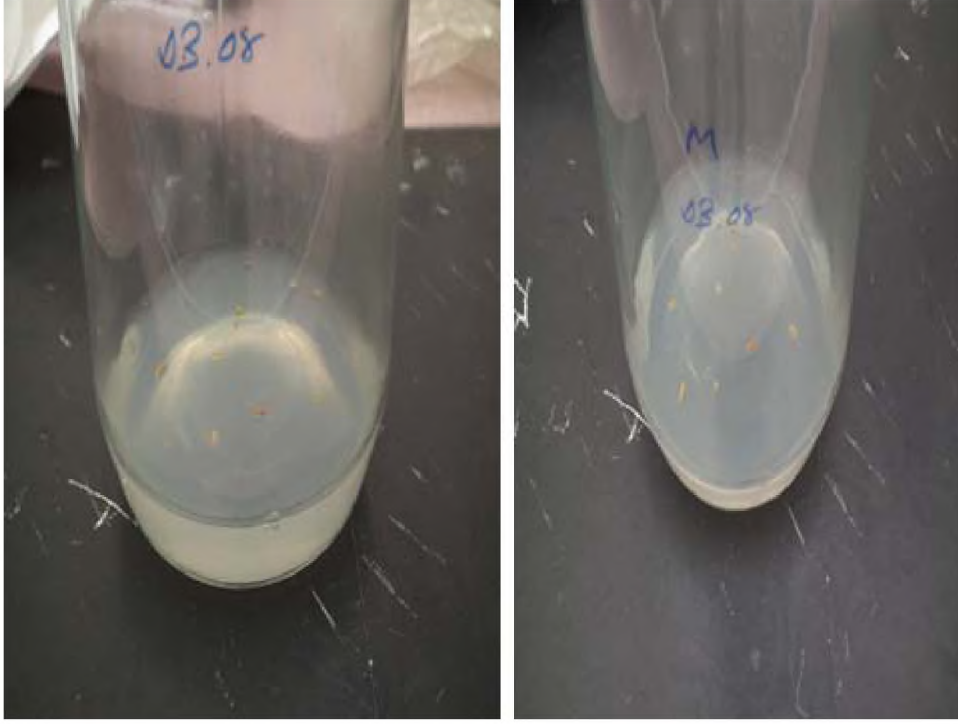
**Çizelge 3.5** Tohum yetiştirme ortamı (standart MS ortamı).

Sükroz	20 g
Majör stok	100 ml
Minör stok	10 ml
Vitamin stok	10 ml
Demir stok	10 ml

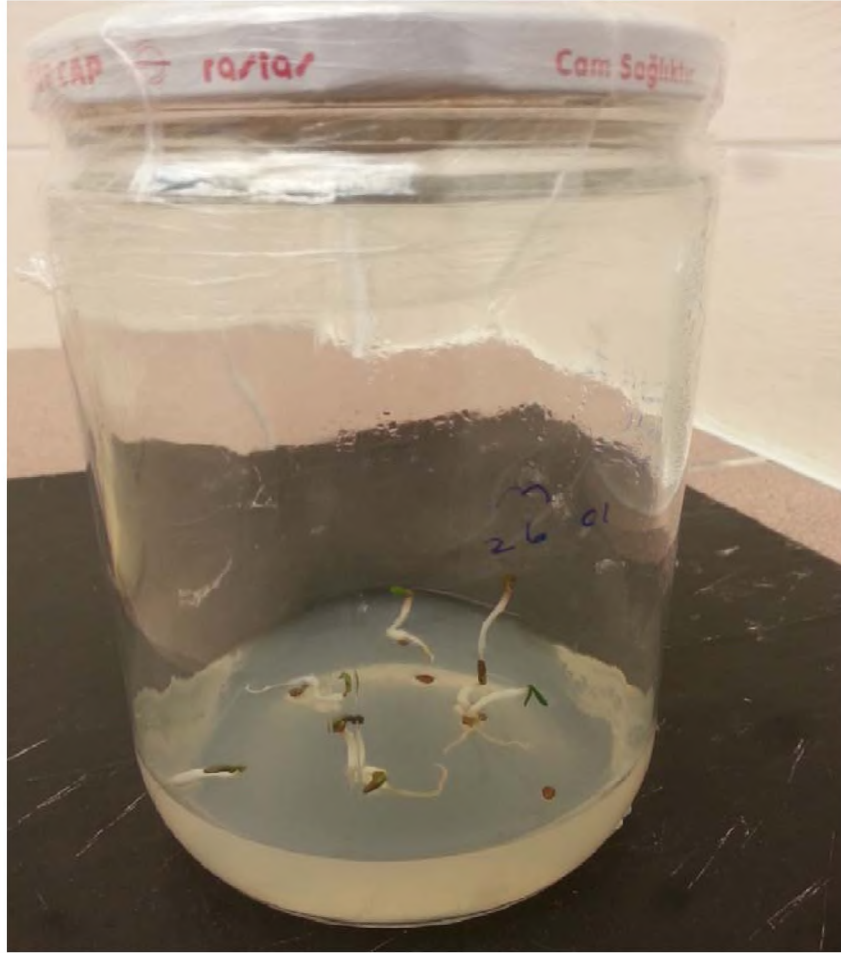
1 litrelik erlenmayerin içine göz kararı biraz saf su eklendi. Çizelge 3.5'te belirtilen maddeler sırasıyla miktarlarınca eklendi. Sonrasında ortam 1 litreye tamamlanarak pH 5.8'e ayarlandı. pH ayarından sonra 7 g agar eklendi. Ortamlar 121 °C'de 1 atm basınç altında 20 dakika sterilize edildi.

Otoklav sonrası besin ortamının vücut ısısına yakın sıcaklığa düşmesi beklenerek 8x14 cm boyutlarındaki kavanozlara döküldü. Yaklaşık 24 saat donması beklendi.

Tohum ekimi için hazırlanan ortamlara kavanoz başı 10-12 adet tohum ekimi yapıldı. Ekim işlemi yapılan kavanozlar 24±2°C'de karanlık ortama alındı. Burada 3-4 gün bekleyen tohumlar filizlenme gösterdi. Filizlenmeden sonra 16/8 saat fotoperiyot uygulamasında 15 günlük aseptik fideler olması beklendi.



Şekil 3.2 Ekim yapılmış tohumlar.



Şekil 3.3 Bir haftalık aseptik fideler.



**Şekil 3.4** 15 günlük aseptik fideler.

### 3.4.2 Kallus Yetiştirme Besin Ortamı

Kallus yetiştirme ortamı hazırlamak için(1 litre);

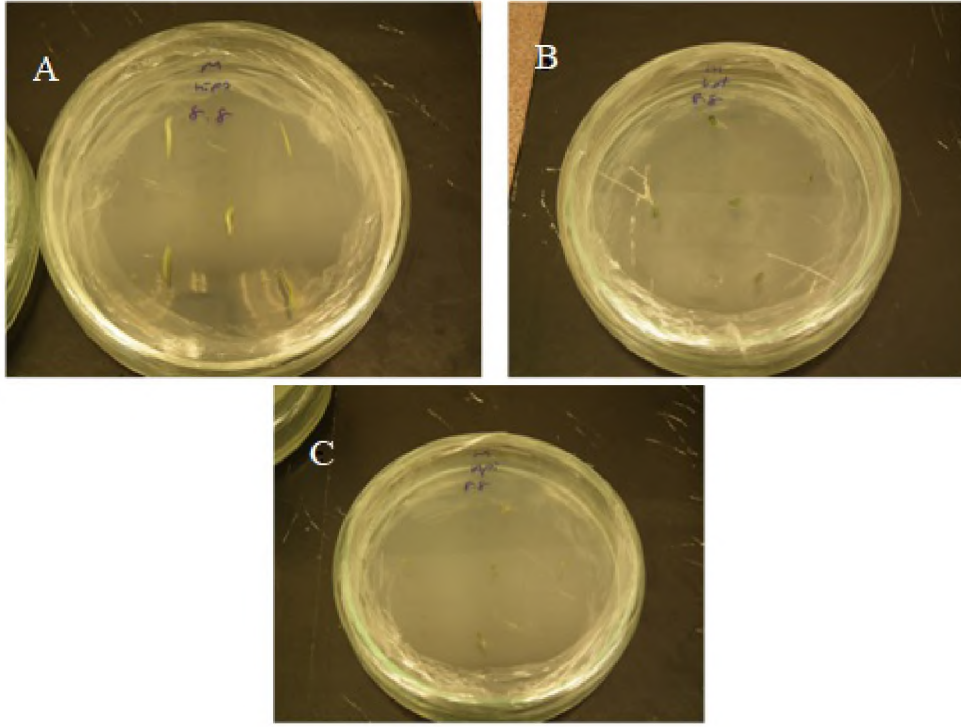
**Çizelge 3.6** Kallus yetiştirme ortamı.

Sükroz	20 g
Majör stok	100 ml
Minör stok	10 ml
Vitamin stok	10 ml
Demir stok	10 ml
Kinetin	1.5 ml
NAA	1.5 ml
2,4 D	0.7 ml

1 litrelik erlanmayerin içine göz kararı biraz saf su eklendi. Çizelge 3.6'da belirtilen maddeler sırasıyla miktarlarınca eklendi. Sonrasında ortam 1 litreye tamamlanarak pH'ı 1 M HCl ve 1 M NaOH ile damla damla ayarlanak 5.8'e sabitlendi. pH ayarından sonra 7 g agar eklendi. Ortamlar 121 °C'de 1 atm basınç altında otoklavda 20 dakika sterilize edildi.

Otoklav sonrası besin ortamının vücut ısısına yakın sıcaklığa düşmesi beklenerek 10x1.5 cm boyutlarındaki petrilere döküldü. Yaklaşık 24 saat donması beklendi.

15 günlük aseptik fidelerden hipokotil, kotiledon ve apikal meristem olmak üzere 3 farklı eksplant alındı. Bu eksplantlar kallus oluşumu için yukarıda belirtilen kallus yetiştirme ortamına alındı. Her petriye aynı eksplantlardan 5 tanesi ekildi. Eksplantlar karanlık alanda  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 3 haftalık periyotlarda bekletildi. 3 hafta sonunda alt kültür işlemi yapıldı.



Şekil 3.5 Ekim yapılmış yeni eksplantlar a) hipokotil, b) kotiledon, c) apikal meristem.



### 3.4.3 Büyük Ölçekli Hücre Süspansiyon Kültürü Ortamı

Hücre süspansiyon ortamı hazırlamak için (1 litre);

**Çizelge 3.7** Hücre süspansiyon kültür ortamı.

Sükroz	20 g
Majör stok	100 ml
Minör stok	10 ml
Vitamin stok	10 ml
Demir stok	10 ml
Kinetin	1.5 ml
NAA	1.5 ml
2,4 D	0.7 ml

1 litrelik erlenmayerin içine göz kararı biraz saf su eklendi. Çizelge 3.7’de belirtilen maddeler sırasıyla miktarlarıncaya eklendi. Sonrasında ortam 1 litreye tamamlanarak pH’ı 1 M HCl ve 1 M NaOH ile damla damla ayarlanak 5.8’e sabitlendi. Hazırlanan ortamlar 121 °C’de 1 atm basınç altında otoklavda 20 dakika sterilize edildi.

Otoklav sonrasında uygun sıcaklığa düşen ortamlar 100 ml’lik, 250 ml’lik, 500 ml’lik ve 1000 ml’lik erlenmayerlere döküldü. Erlenmayerlerin ölçüleri; 100 ml’lik 6x10 cm, 250 ml’lik 8x14 cm, 500 ml’lik 10x18 cm ve 1000 ml’lik 13x22 cm’dir.

Uygun gelişim gösteren sarı dağılabilen (friable) kalluslar 100 ml’de 2.5 g olacak şekilde hücre süspansiyon ortamına alındı. Hücre süspansiyon kültürüne alınan kalluslar 180 rpm’de 20 gün boyunca 16/8 fotoperiyotta çalkalayıcıda tutuldu.



**Şekil 3.6** Hücre süspansiyon kültürü kurulan erlenmayerler A) 100 ml B) 250 ml C) 500 ml D) 1000 ml.

### **3.5. BÜYÜK ÖLÇEKLİ HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜNDEN SÜZME İŞLEMİ**

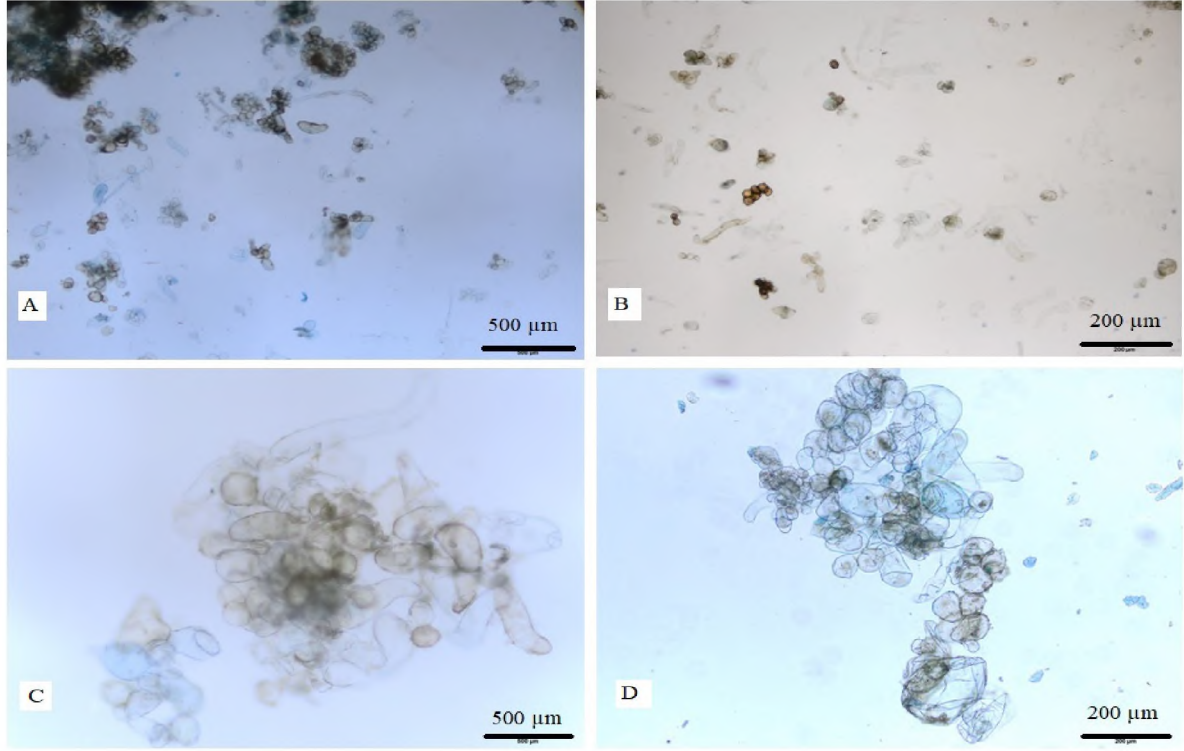
Çalkalayıcıda 20 gününü tamamlayan kalluslar süzme işlemi için 200 mesh'lik Sigma-Aldrich Cell Dissociation Kit yardımıyla 1 dk süzüldü. Cell Dissociation Kit üzerinde biriken kalluslar toplanıp tartılarak -80 °C'de muhafaza edildi.

### **3.6 *M. SATIVA* L. CV. ELÇİ (ELÇİ YONCASI)'NIN KALLUS HÜCRELERİNİN BOYANMASI**

Öncelikle hücre süspansiyon kültüründen alınan hücreler mikrosantrifüj tüplerine koyuldu. Üzerlerine 0.5 ml %0,2'lik trypan blue boyası döküldü. 20 dk boyanması için beklendi ve süzülerek saf suyla yıkandı. Yıkanan hücreler lam üzerine alınarak lamelle kapatıldı.

### 3.7 CANLI HÜCRE SAYIMI

Hücre sayımı için Olympus BX51 marka mikroskop ve Olympus SC100 kamera kullanıldı. Fotoğraflar üzerinde Digimizer Image Analysis programı ile sayımlar yapıldı. Canlı hücre sayısının hesaplanması için % canlılık = (canlı hücre sayısı / toplam hücre sayısı) x 100 formülü kullanıldı (Patel vd. 2009).



Şekil 3.7 Boyanan hücreler (A) 100 ml, B) 250 ml, C) 500 ml, D) 1000 ml’lik hücre süspansiyon kültürleri.

### 3.8 TOPLAM FENOLİK MADDE TAYİNİ

#### 3.8.1 *M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi Yoncası)’nın Taze Örnekleri ve Büyük Ölçekli Hücre Süspansiyon Kültürü Örneklerinin Ekstraksiyon Çözeltilerinin Hazırlanması

*M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası)’nın Bülent Ecevit Üniversitesi Biyoloji Bölümü deneme bahçemizde mayıs ve eylül aylarında iki farklı herba toplandı. 100 ml’lik, 250 ml’lik, 500 ml’lik ve 1000 ml’lik süspansiyon kültürlerinden elde edilen kalluslar süzüldü. Liyofilizatör

ile örnekler 3 gün kurutuldu ve öğütücü yardımıyla toz haline getirildi. Toz halindeki örnekler 1'er gram tartılarak ayrı ayrı paketlenildi. Deneyde kullanılacak cam malzemeler yıkandıktan sonra % 99,9'luk MeOH'tan geçirilerek kurutuldu. Ekstrakt için kullanılmak üzere % 80'lik MeOH hazırlandı. Kullanılacak erlenmayerler etiketlendi. 1'er gramlık toz örnekler erlenmayerlere boşaltıldı. Üzerlerine 100 ml % 80'lik MeOH eklendi. 24 °C'de 180 rpm'de çalkalayıcıda 1 saat çalkalamaya bırakıldı. Bu esnada süzme işlemi yapmak için şilifli balon jöjelerin boş daraları alındı ve etiketlendi. Süzme işlemi için filtre kurutma kağıtları huni görevi görecektir şekilde hazırlandı. 1 saat çalkalamadan sonra ekstraksiyon şilifli balon jöjelere huni şeklindeki filtre kağıtları yardımıyla süzöldü. Süzöntüden kalan toz örnekler tekrar erlenmayerlere alınarak % 80'lik 150 ml MeOH eklendi ve 24 °C'de 180 rpm'de 24 saat çalkalanmak üzere çalkalayıcıya bırakıldı. 24 saatin sonunda aynı örnekler aynı şilifli balon jöjelere tekrar süzöldü. BÜCHI marka rotaevaporatörde 45 °C banyoda % 80'lik MeOH'ün uçurma işlemi yapıldı. Uçurma işleminden sonra şilifli balonlarda kalan ekstraktların kuru ağırlığını öğrenmek için brüt ağırlıklar hassas terazide ölçöldü. Şilifli balon dibindeki ekstraktı çözmek amacıyla 10 ml % 99,9'luk MeOH kullanılarak vorteks yardımıyla çözümleri sağlandı. Elde edilen 10 ml'lik ekstraktlar buzdolabında muhafaza edildi.

### **3.8.2 Toplam Fenolik Madde Tayininde Kullanılan Cihaz**

Toplam fenol miktar tayininde 4 küvet gözlü VWR marka V-1200 spectrophotometer model cihaz kullanıldı.

### **3.8.3 Toplam Fenolik Madde Tayini Çözeltilerinin Hazırlanması**

Folin-Ciocalteu yöntemiyle toplam fenol miktarı belirlenmiştir (Singleton and Rossi 1965). Bitki ekstraktları % 75'lik EtOH'de çözüldü. Örnekler 1 mg/ml olarak hazırlandı. Örnekten 20 µl alınarak üzerine 100 µl Folin-Ciocalteu, 300 µl % 20'lik sodyum karbonat çözeltisi ve en son olarak 1580 µl saf su eklendi. Kalibrasyon eğrisi için 15.62 mg/l, 31.75 mg/l, 62.5 mg/l, 125 mg/l, 250 mg/l, 500 mg/l ve 1000 mg/l konsantrasyonlarda gallik asit hazırlandı. Örnek yerine bu kez gallik asitten 20 µl alınarak diğertir çözeltiler aynı oranda eklendi. Sonrasında bütün örnekler karanlık ortamda 30 dk inkübasyona alındı. İnkübasyon sonunda örnekler 765 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutuldu. Gallik asit dilüsyonlarından

kalibrasyon eğrisi çıkarıldı. Kalibrasyon eğrisi kullanılarak diğer örneklerin toplam fenol madde miktarı hesaplandı.

### 3.9 DPPH SERBEST RADİKALİ GİDERİM AKTİVİTESİ YÖNTEMİ

#### 3.9.1 *M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi Yoncası)'nın Taze Örnekleri ve Büyük Ölçekli Hücre Süspansiyon Kültürü Örneklerinin Ekstraksiyon Çözeltilerinin Hazırlanması

*M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası)'nın Bülent Ecevit Üniversitesi Biyoloji Bölümü deneme bahçemizde Mayıs ve Eylül aylarında iki farklı herba toplandı. 100 ml'lik, 250 ml'lik, 500 ml'lik ve 1000 ml'lik süspansiyon kültürlerinden elde edilen kalluslar süzüldü. Liyofilizatör ile örnekler 3 gün kurutuldu ve öğütücü yardımıyla toz haline getirildi. Toz halindeki örnekler 1'er gram tartılarak ayrı ayrı paketlenildi. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi tayini için 2 adet 1 gramlık örnek kullanıldı. Deneyde kullanılacak cam malzemeler yıkandıktan sonra % 99,9'luk MeOH'tan geçirilerek kurutuldu. Ekstrakt için kullanılmak üzere % 80'lik MeOH hazırlandı. Kullanılacak erlenmayerler etiketlendi. 1'er gramlık toz örnekler erlenmayerlere boşaltıldı. Üzerlerine 100 ml % 80'lik MeOH eklendi. 24 °C'de 180 rpm'de çalkalayıcıda 1 saat çalkalamaya bırakıldı. Bu esnada süzme işlemi yapmak için şilifli balon jojelerin boş daraları alındı ve etiketlendi. Süzme işlemi için filtre kurutma kağıtları huni görevi görecektir şekilde hazırlandı. 1 saat çalkalamadan sonra ekstraksiyon şilifli balon jojelere huni şeklindeki filtre kağıtları yardımıyla süzüldü. Süzüntüden kalan toz örnekler tekrar erlenmayerlere alınarak % 80'lik 150 ml MeOH eklendi ve 24 °C'de 180 rpm'de 24 saat çalkalanmak üzere çalkalayıcıya bırakıldı. 24 saatin sonunda aynı örnekler aynı şilifli balon jojelere tekrar süzüldü. BÜCHI marka rotaevaporatörde 45 °C banyoda % 80'lik MeOH'ün uçurma işlemi yapıldı. Uçurma işleminden sonra şilifli balonlarda kalan ekstraktların kuru ağırlığı öğrenmek için brüt ağırlıklar hassas terazide ölçüldü. Şilifli balon dibindeki ekstraktı çözmek amacıyla 10 ml % 99,9'luk MeOH kullanılarak vorteks yardımıyla çözümleri sağlandı. Elde edilen 10 ml'lik ekstraktlar buzdolabında muhafaza edildi. Deney için ekstraktlardan 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml olarak flakonlarda 4 farklı dilüsyon hazırlandı. Ayrıca yapay antioksidan olan BHT (Bütildihidroksi toluen) ve BHA

(Bütihidroksianisol) ve doğal antioksidan olan Askorbik Asit 4 farklı dilüsyon olarak (1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml) hazırlandı.

### **3.9.2 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi İçin Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

a) Askorbik Asit çözeltisinin hazırlanması: Hassas terazide 1 g Askorbik Asit tartılarak 10 ml % 99,9'lük MeOH ile çözüldü. 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml olarak 4 farklı dilüsyon hazırlandı.

b) BHT (Bütihidroksi toluen) çözeltisinin hazırlanması: Hassas terazide 1 g BHT tartılarak 10 ml % 99,9'lük MeOH ile çözüldü. 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml olarak 4 farklı dilüsyon hazırlandı.

c) BHA (Bütihidroksi anisol) çözeltisinin hazırlanması: Hassas terazide 1 g BHA tartılarak 10 ml % 99,9'lük MeOH ile çözüldü. 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml olarak 4 farklı dilüsyon hazırlandı.

d) DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) çözeltisinin hazırlanması: DPPH serbest radikalinin ışıqla temasını önlemek amacıyla erlenmayer alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korundu. Hassas terazide Sigma-Aldrich marka DPPH 2,4 mg tartılarak 100 ml % 70'lik EtOH'de çözüldü.

### **3.9.3 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesinde Kullanılan Cihaz**

DPPH serbest radikali giderim aktivitesinin belirlenmesi için 4 küvet gözlü VWR marka V-1200 spectrophotometer model cihaz kullanıldı.

### 3.9.4 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesinin Spektrofotometrede Okunması

Öncelikle spektrofotometrede kullanılmak üzere disposable küvetler % 99,9'luk MeOH'den geçirilerek hazırlandı. Flakonlarda hazırlanan 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml bitki ekstraksiyon çözeltileri ve Askorbik Asit, BHA, BHT çözeltilerine 2 ml DPPH eklenerek 30 dk karanlık ortamda bekletildi.

Spektrofotometrede autozero işlemi için blank zero gözüne disposable küvet ile 4 ml % 99,9'luk MeOH koyularak sıfırlama yapıldı. DPPH serbest radikali eklenmiş olan 4 farklı dilüsyon çözeltilerinin 1. göze 1000 µg/ml, 2. göze 500 µg/ml, 3. göze 250 µg/ml, 4. göze 125 µg/ml olacak şekilde yerleştirildi. Spektrofotometre 517 nm absorbansa ayarlanarak 3 tekrarlı okuma yapıldı.

### 3.9.5 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesinin Hesaplanması

*M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası)'nın taze bitki örnekleri ve büyük ölçekli süspansiyon kültüründe yetiştirilmiş kallus örneklerinin serbest radikal giderim aktivitesi DPPH radikali kullanılarak ölçüldü. Ekstraktların DPPH serbest radikali giderim aktiviteleri Sanchez-Moreno yöntemine göre hesaplanmıştır (Wang and Lee 1996).

$$\text{İnhibisyon(\%)} = \frac{\text{Ab(kontrol)} - \text{Ab(örnek)}}{\text{Ab(kontrol)}} \times 100$$

## 3.10 HPLC-UV ANALİZLERİ

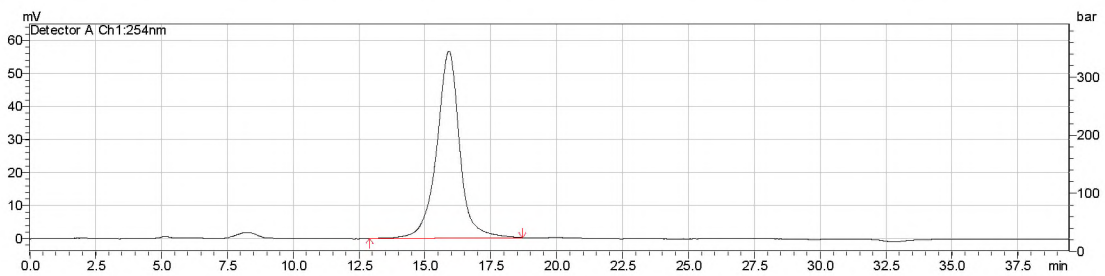
### 3.10.1 HPLC-UV Analizleri *M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi Yoncası)'nın Ekstraksiyon Çözeltilerinin Hazırlanması

*M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası)'nın Bülent Ecevit Üniversitesi Biyoloji Bölümü deneme bahçesinden Mayıs ve Eylül aylarında iki farklı herba toplandı. 100 ml'lik, 250 ml'lik, 500 ml'lik ve 1000 ml'lik süspansiyon kültürlerinden elde edilen kalluslar süzüldü. Liyofilizatör ile örnekler 3 gün kurutuldu ve öğütücü yardımıyla toz haline getirildi. Toz halindeki örnekler 1'er gram tartılarak ayrı ayrı paketlenildi. Deneyde kullanılacak cam malzemeler yıkandıktan

sonra % 99,9'lük MeOH'tan geçirilerek kurutuldu. Ekstrakt için kullanılmak üzere % 80'lik MeOH hazırlandı. Kullanılacak erlenmayerler etiketlendi. 1'er gramlık toz örnekler erlenmayerlere boşaltıldı. Üzerlerine 100 ml % 80'lik MeOH eklendi. 24 °C'de 180 rpm'de çalkalayıcıda 1 saat çalkalamaya bırakıldı. Bu esnada süzme işlemini yapmak için şilifli balon jöjelerin boş daraları alındı ve etiketlendi. Süzme işlemi için filtre kurutma kağıtları huni görevi görecek şekilde hazırlandı. 1 saat çalkalamadan sonra ekstraksiyon şilifli balon jöjelere süzöldü. Süzöntüden kalan toz örnekler tekrar erlenmayere alınarak % 80'lik 150 ml MeOH eklendi ve 24 °C'de 180 rpm'de 24 saat çalkalanmak üzere çalkalayıcıya bırakıldı. 24 saatin sonunda aynı örnekler aynı şilifli balon jöjelere tekrar süzöldü. BÜCHI marka rotaevaporatörde 45 °C banyoda % 80'lik MeOH'ün uçurma işlemi yapıldı. Uçurma işleminden sonra şilifli balonlarda kalan ekstraktların kuru ağırlığını öğrenmek için brüt ağırlıklar hassas terazide ölçöldü. Şilifli balon dibindeki ekstraktı çözmek amacıyla 10 ml % 99,9'lük MeOH kullanılarak vorteks yardımıyla çözünmeleri sağlandı. Elde edilen 10 ml'lik ekstraktlar buzdolabında muhafaza edildi.

### 3.10.2 HPLC-UV Analizi için Standartların Kromatogramı

HPLC analizinde kullanılacak hareketli faz için kullanılan kimyasallar ve flavonoid olan standart da HPLC için saflıkta Sigma Aldrich'ten temin edildi. Formononetin %100'lük MeOH kullanılarak çözüldü. Formononetin için; 300 ppm, 150 ppm, 75 ppm, 37.5 ppm, 18.75 ppm, 9.37 ppm ve 4.68 ppm olarak dilüsyonlar hazırlandı. Kromatogramı çıkarıldı.



Şekil 3.8 Formononetin standardı kromatogramı.

### 3.10.3 HPLC Analizlerinde Kullanılan Cihaz ve Kolon Bilgileri

Shimadzu marka 1200 HPLC serisi sistemi cihazda analizler gerçekleştirilmiştir. C18 5 µm 4.6 mm x 250 mm kolon kullanılmıştır.



### 3.10.4 HPLC-UV Analizi Gradyent Elüsyon Programları

HPLC-UV analizi için kullanılan gradyent elüsyon programı 0,35 ml/dk akış hızında % 70'lik MeOH kullanılarak yapılmıştır. Formononetin 20 µl olarak enjekte edilmiştir. Cihazın maksimum absorbanı 254 nm olarak ayarlanmıştır.

**Çizelge 3.8** Standartların gradyent elüsyon programı.

Standart	Zaman (dk)	Akış Hızı (ml/dk)	% A (MeOH+Ultra Saf Su)
Formononetin	35	0,35	70

### 3.11 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

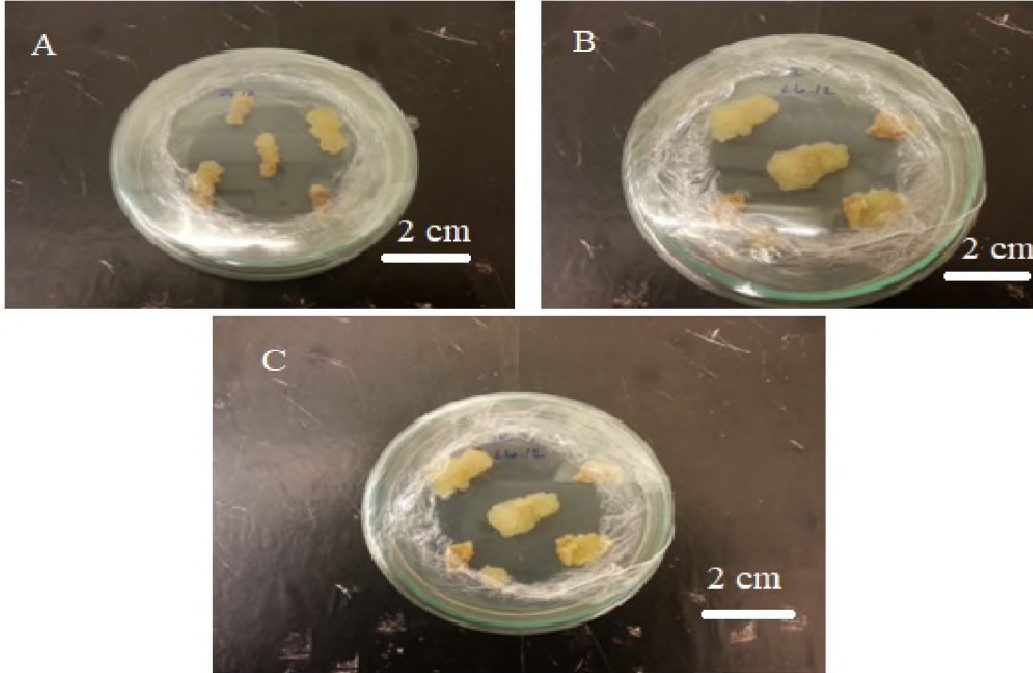
HPLC ile miktar tayini, toplam fenolik içeriği, DPPH süpürme aktivitesi ve canlı hücre sayımı çalışmalarında SPSS 13 ve Microsoft Office 2010 Excel programından yararlanıldı.  $P < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BÖLÜM 4

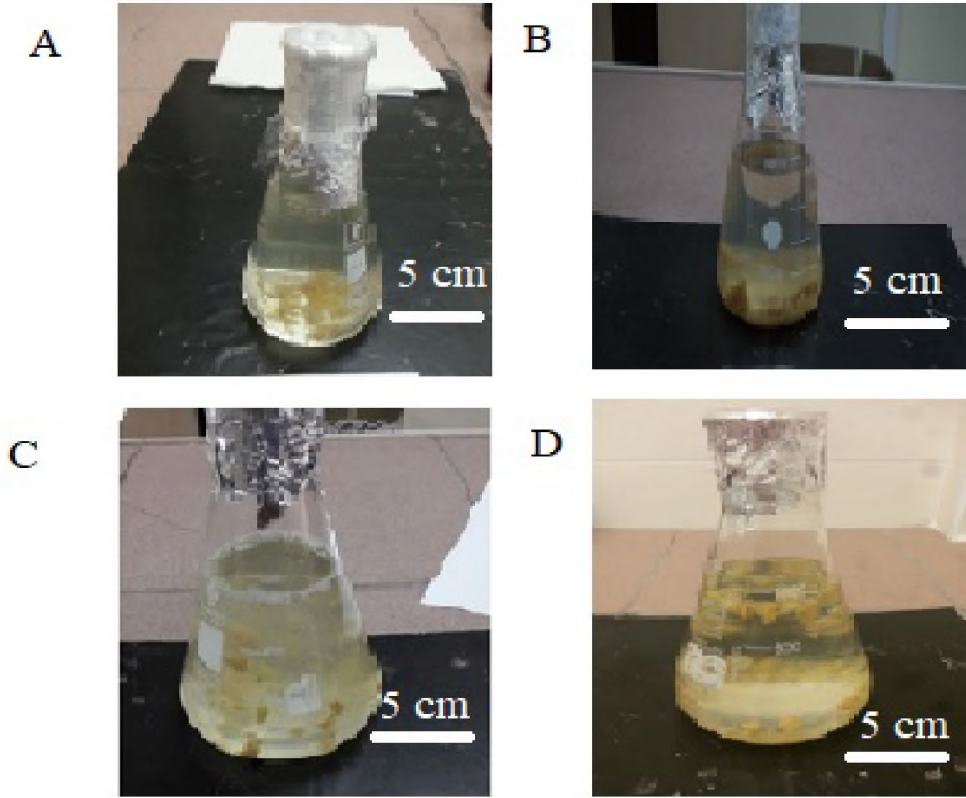
### ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 4.1 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ SONUÇLARI

Yapmış olduğumuz çalışmada Çölgeçen et al. (2014)'ün yapmış olduğu kallus ve hücre süspansiyon kültürleri ortamları içerisinde en uygun olan ortam MS3 bizim çalışmamızda kullanılmıştır. Kallus yetiştirme ortamları ve süspansiyon kültürü ortamlarındaki kontaminasyon oranı çok düşük olmuştur. Laboratuvarımızda bulunan UV-C lambalar sayesinde kontaminasyon % 5'lere kadar düşmüştür. Kallus geliştirmede ve süspansiyon kültürlerinde herhangi bir sorunla karşılaşılmamıştır.



Şekil 4.1 Olgunlaşmış kalluslar A) hipokotil, B) kotiledon, C) apikal meristem.



**Şekil 4.2** Hücre süspansiyon kültürleri (A) 100 ml, B) 250 ml, C) 500 ml, D) 1000 ml.

#### 4.2 AGREGAT ÖLÇÜM SONUÇLARI

Hücre süspansiyon kültüründe yapılan ölçüm parametreleri hücre süspansiyon kültürünün kalitesini ortaya çıkarmanın yanı sıra kültürlerin biyoreaktöre taşınması işleminde verimi ve madde üretiminin kalitesini belirlemek için yapılmıştır. Hücre süspansiyon kültürlerinde friable (kolay dağılabilen) kallus kullanılmıştır. Kalluslar süspansiyon kültürü içerisinde dağılım gösterse de homojen bir dağılım genelde göstermez. Bizim çalışmamızda da kallus dağılımı heterojen olmuştur. Hücre süspansiyon kültür ortamlarında süzme işlemi yapılmadan önce fotoğraflar çekilmiş ve agregat boylarının ölçümü yapılmıştır (Çizelge 4.1). Agregat boylarında büyük farklılıklar gözlenmedi. Genel olarak agregatların 5 mm civarında olduğu gözlenmiştir. En düşük agregat ölçüsü 3 mm en yüksek agregat ölçüsü ise 7.4 mm çapındadır.

**Çizelge 4.1** Agregat ölçüm sonuçları (mm) ( $p<0,05$ ).

Ekstrakt	Sonuç (mm)
100 ml	4.67±0.1
250 ml	5.18±0.08
500 ml	4.95±0.09
1000 ml	5.81±0.06

### 4.3 CANLI HÜCRE SAYIMI SONUÇLARI

Çalışmamızda kurduğumuz büyük ölçekli hücre süspansiyon kültürlerindeki kalluslardan canlı hücre sayımı yapılmıştır. Canlı hücre sayımı hücre süspansiyon kültüründeki verimi ve kaliteyi göstermek için yapılmıştır. Canlı hücre sayımı sonuçları çizelgesi aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.2).

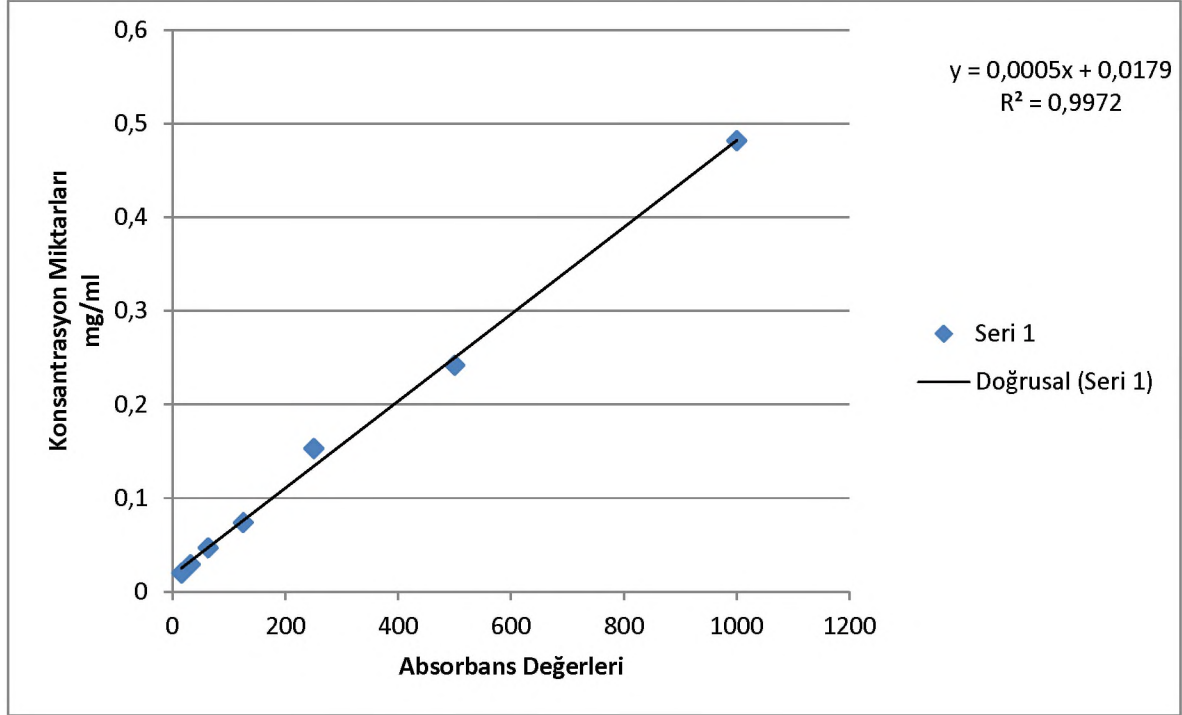
**Çizelge 4.2** Canlı hücre oranı (%) ( $p<0,05$ ).

Ekstrakt	Canlılık oranı (%)
100 ml	71.40±4.1
250 ml	67.80±2.2
500 ml	62.40±1.8
1000 ml	75±0.9

Hücre canlılık testleri analizlerinde en iyi sonuç 1000 ml'lik hücre süspansiyon kültürlerinde % 75 olarak belirlenmiştir. 100 ml'lik süspansiyon kültürü onu takip ederken canlılık oranı % 71.40'dır. 250 ml'lik süspansiyon kültürü % 67.80 son olarak ise 500 ml'lik hücre süspansiyon kültüründe canlılık oranı % 62.40'dır.

#### 4.4 TOPLAM FENOLİK MADDE TAYİNİ SONUÇLARI

Toplam fenol miktarı tayini için yapılan analizler gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiğinden hesaplanmıştır. Gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiği aşağıda verilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Gallik asit kalibrasyon eğrisi.

Çizelge 4.3 Hücre süspansiyon kültürleri, mayıs ve eylül ayı toplam fenol madde miktarları ( $p < 0,05$ ).

Ekstrakt	Total fenolik madde miktarı (mg/g)
100 ml	30.2±0.4
250 ml	40.2±0.3
500 ml	32.2±0.3
1000 ml	34.2±0.2
Mayıs ayı herba	32.2±0.5
Eylül ayı herba	44.2±0.1

Toplam fenol madde miktarı analizlerinde en iyi sonuç eylül ayı herbasından 44.2 mg/g olarak elde edilmiştir. En az toplam fenolik madde miktarına sahip örnek ise 100 ml'lik hücre süspansiyon kültürü olmuştur. Hücre süspansiyon kültürü örneklerimizde ise en iyi sonuç 40.2 mg/g ile 250 ml'lik örneğimiz olmuştur (Çizelge 4.3).

#### 4.5 DPPH SERBEST RADİKALİ GİDERİM AKTİVİTESİ SONUÇLARI

DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçlarının grafiği aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.4). Doğal antioksidan olan askorbik asit, yapay antioksidan olan BHT ve BHA sonuçları ve örneklerimizin DPPH serbest radikali giderim aktiviteleri karşılaştırılmıştır.

**Çizelge 4.4** DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları (%) ( $p < 0,05$ ).

Ekstrakt	DPPH giderim aktivitesi(%)
100 ml	41.63±3.1
250 ml	45.22±1.1
500 ml	47.26±1.3
1000 ml	51.36±1.2
Mayıs ayı herba	80.51±2.5
Eylül ayı herba	85.69±2.1
Askorbik asit	97.83±0.9
BHT	95.24±0.9
BHA	95.29±1.1

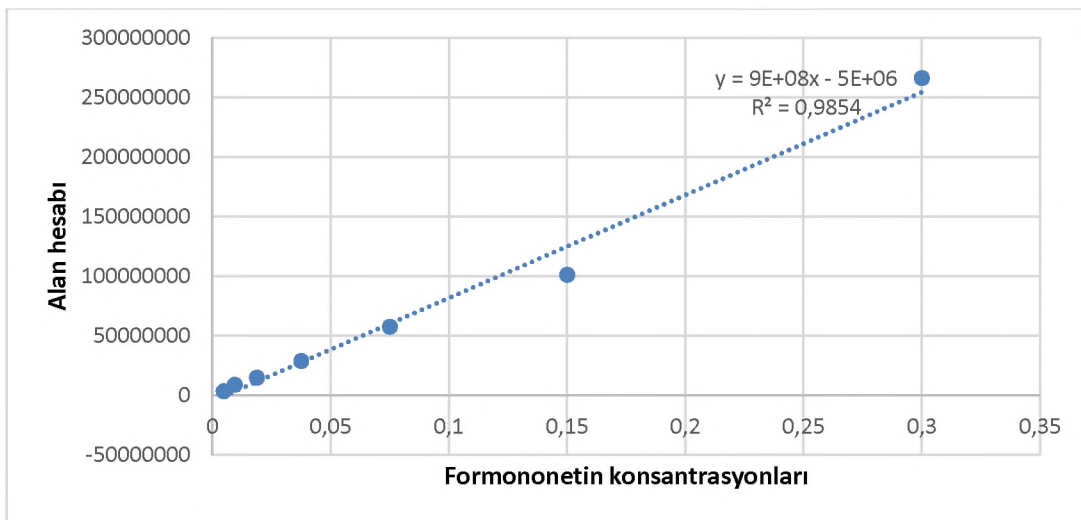
Mayıs ve eylül ayı herbalarının DPPH serbest radikali giderme aktivitesi bakımından oldukça iyi olduğu görülmektedir. Hücre süspansiyon kültürlerinin birbirleri arasında çok büyük farklılıklar olmamasına rağmen en iyi sonuç 51.36 % olan 1000 ml'lik hücre süspansiyon kültürüdür.

#### 4.6 HPLC-UV SONUÇLARI

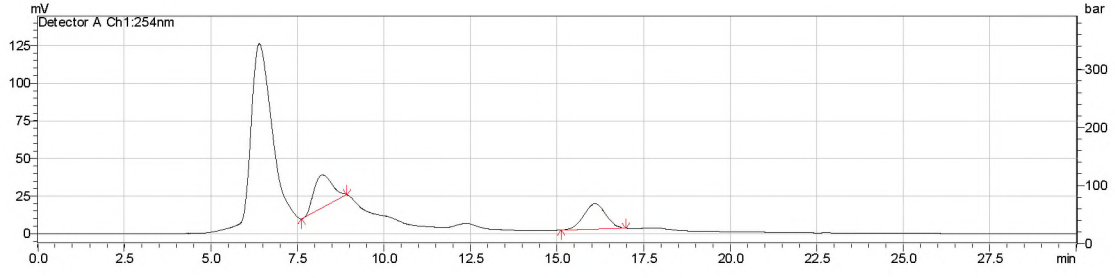
HPLC-UV’de *M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası)’nın büyük ölçekli hücre süspansiyon kültürlerinden elde edilen kallusların ve mayıs, eylül aylarında toplanan bitki örneklerinin analizleri yapılmıştır. Analizlerimiz sonucu formononetin miktarı herbalar arasında en iyi sonuç mayıs ayı herbası 2.07 mg/g olarak belirlenmiştir. Hücre süspansiyon kültürleri arasında en yüksek 4.99 mg/g ile 1000 ml’lik hücre süspansiyon kültürü olmuştur. Ayrıca *M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası)’nın herbayla karşılaştırıldığında hücre süspansiyon kültürlerinde formononetin miktarının arttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5** HPLC-UV analiz sonuçları (Formononetin) (mg/g) ( $p < 0,05$ ).

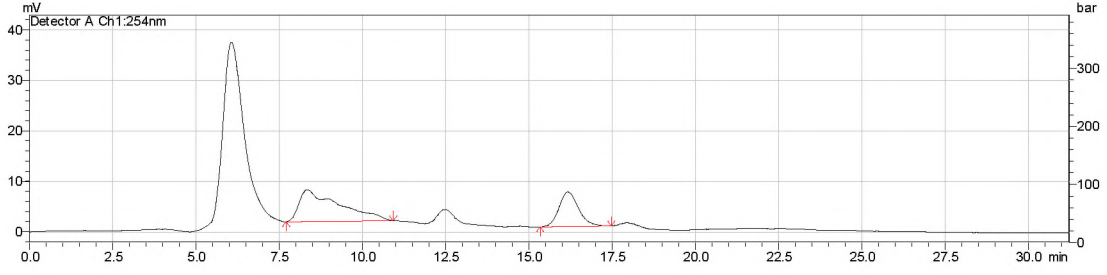
Ekstrakt	Miktar (mg/g)
100 ml	3.72±0.04
250 ml	3.46±0.06
500 ml	3.36±0.08
1000 ml	4.99±0.09
Mayıs ayı herba	2.07±0.05
Eylül ayı herba	1.84±0.09



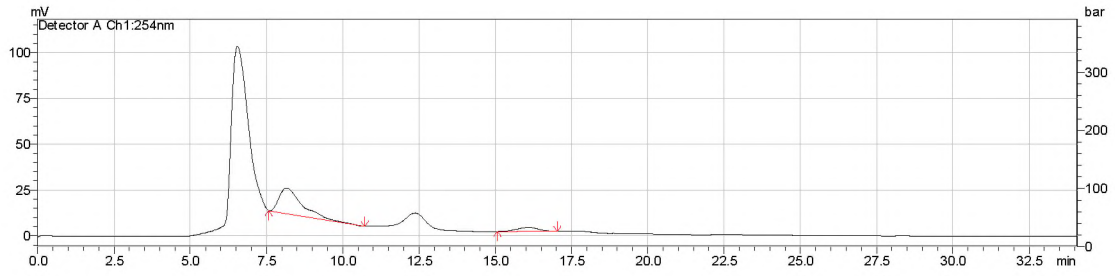
**Şekil 4.4** Formononetin standardı kalibrasyon eğrisi.



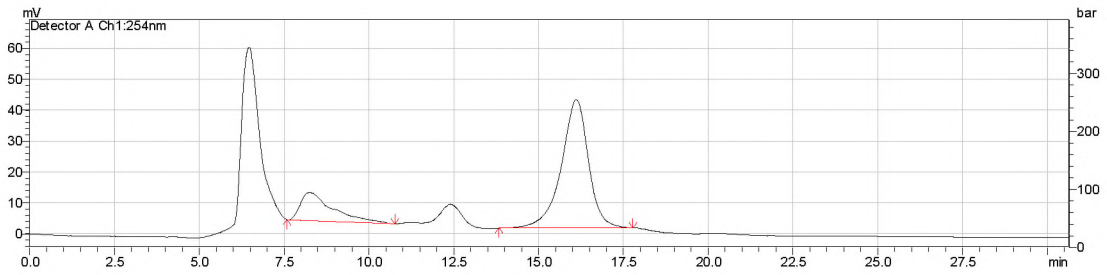
Şekil 4.5 100 ml'lik hücre süspansiyon kültürü kromatogramı.



Şekil 4.6 250 ml'lik hücre süspansiyon kültürü kromatogramı.

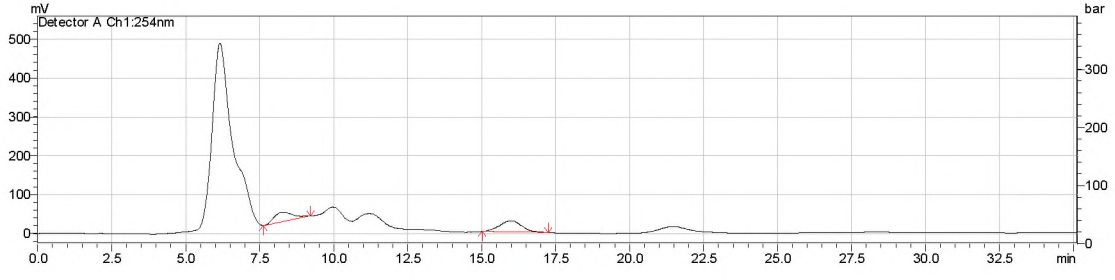


Şekil 4.7 500 ml'lik hücre süspansiyon kültürü kromatogramı.

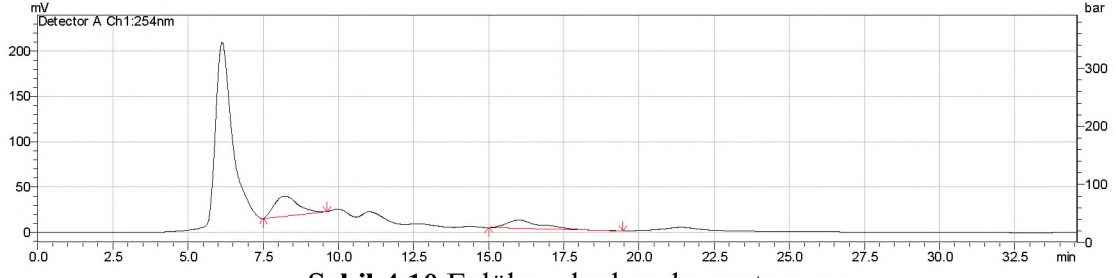


Şekil 4.8 1000 ml'lik hücre süspansiyon kültürü kromatogramı.





**Şekil 4.9** Mayıs ayı herbası kromatogramı.



**Şekil 4.10** Eylül ayı herbası kromatogramı.

## BÖLÜM 5

### SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmamızda *Medicago sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası) tohumlarından *in vitro* şartlarda 15 günlük aseptik fideler üretilerek kullanıldı.

Çölgeçen et al. (2014) tarafından yapılan çalışmada kallus oluşturmak ve bazı flavonoidlerin üretimi için farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortamlar hazırlanmış ve en başarılı olan MS3 ortamı (1,5 ml/L Kinetin, 1,5 ml/L NAA, 0,7 ml/L MS ortamı) bizim çalışmamızda da kullanılmıştır. Fidelerden 3 farklı eksplant (hipokotil, kotiledon ve apikal meristem) alınarak bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS ortamında kalluslar üretilmiştir. Kallus üretimi daha yavaş ve az olan epikotil ve ilk yaprak eksplantlarına ilk denemeden sonra devam edilmemiştir. Olgunlaşan sarı renkli friable (dağılabilen) kalluslar agarsız aynı bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS3 büyük ölçekli hücre süspansiyon ortamlarına (100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml) alınmıştır. 20 günlük kültür süresi sonunda hücre canlılık testi, toplam fenol miktarı belirleme, DPPH süpürme aktivitesi ve HPLC' de formononetin tayini için süzölmüştür.

Hücre canlılık testleri Trypan Blue ile gerçekleştirilmiştir. Büyük ölçekli hücre süspansiyon kültürlerinde en yüksek canlılığa sahip olan % 75 ile 1000 ml'lik hücre süspansiyon kültürü olmuştur. 100 ml'lik hücre süspansiyon kültürü % 71.40'la ikinci sırada yer almaktadır. 250 ml'lik ve 500 ml'lik hücre süspansiyon kültürlerinde sırasıyla canlılık oranları % 67.80 ve % 62.40 olmuştur. Canlılık oranlarına bakıldığında aralarında çok büyük farkların bulunmadığı görülmektedir. 500 ml'lik hücre süspansiyon kültüründeki % 62.40 oranı hücresel homojenitenin sağlanamaması nedeniyle ortaya çıkmış bir yüzde olabileceği düşünülmektedir.

Toplam fenol yönünden en zengin örnek eylül ayı herbasında 44.2 mg/g olarak belirlenmiştir. Büyük ölçekli hücre süspansiyon kültürleri arasında en fazla total fenol miktarına sahip örnek ise 250 ml'likte 40.2 mg/g'dır. Mayıs ayı herbası 32.2 mg/g, 100 ml'lik, 500 ml'lik, 1000 ml'lik örneklerde sırasıyla 30.2 mg/g, 32.2 mg/g, 34.2 mg/g total fenol içeriğine sahiptir. Mayıs ve Eylül ayı herbarları arasındaki miktar farklılığı anlamlıdır. Toplam fenol miktarı tayininde örneklerimiz arasında çok büyük farklılıklar olmamıştır.

Mayıs ayı herbası % 80.5 eylül ayı herbası ise % 85.69 DPPH serbest radikali giderim aktivitesine sahiptir. Büyük ölçekli hücre süspansiyon kültürleri arasında en yüksek DPPH serbest radikali giderim aktivitesine sahip olan örnek 1000 ml'lik hücre süspansiyon kültürüdür ve % 51.36 giderim aktivitesine sahiptir. Hücre süspansiyon kültürlerinin hacimleri azaldıkça DPPH süpürme aktiviteside azalmıştır. Buna göre 500 ml'lik % 47.26, 250 ml'lik, % 45.22, 100 ml'lik hücre süspansiyon kültürü de % 41.63 DPPH serbest radikali giderim aktivitesine sahiptir. Büyük ölçekli hücre süspansiyon kültürlerinin DPPH süpürme aktiviteleri ise tarladan mayıs ve eylül aylarında toplanan herbaya oranla düşüktür.

HPLC analizlerinde formononetin madde miktarına sahip en yüksek örnek 1000 ml'lik hücre süspansiyon kültürü olmuştur. 1000 ml'lik hücre süspansiyon kültüründe 4.99 mg/g formononetin belirlenmiştir. Mayıs ayı herbasında 2.07 mg/g, eylül ayı herbasında 1.84 mg/g, 100 ml'lik 3.72 mg/g, 250 ml'lik 3.46 mg/g ve 500 ml'lik hücre süspansiyon kültüründe ise 3.36 mg/g olarak formononetin bulunmuştur. Tarladan toplanan örneklerle kıyaslandığında hücre süspansiyon kültüründeki üretimlerimizde formononetin miktarında artış görülmüştür.

Steward et al. (1999) yaptığı *M. sativa* L. (Chaubet tarafından üretilen)'de hücre canlılığı belirleme çalışmasında % 0.375'lik trypan blue boyası kullanmışlardır. Bizim çalışmamızda trypan blue % 0.2'lik kullanılmıştır. Hücre süspansiyon kültüründe 11 günlük periyotta takip ettikleri hücre canlılık testinde en iyi sonuçları ilk gün % 80 olarak belirlenmiştir. Gün geçtikçe canlılık oranında azalma gözlemişlerdir. 11. gün sonunda ise canlılık % 20'ye düşmüştür. Bizim çalışmamızda ise 20 günün sonunda süspansiyon kültürlerinde sayım yapılmıştır ve en yüksek oran 1000 ml'lik kalluslarda % 75 olarak belirlenmiştir.

Hücre canlılık testleri *M. sativa*'da az bulunduğu için farklı türlerde metod kıyaslama açısından tartışma bölümüne alınmıştır. Trypan Blue ile benzerlik göstererek ölü hücre boyayan Evans Blue ile Baker and Mock (1994), *Glycine max* ve *Nicotiana tabacum* üzerinde *Pseudomonas syringae* bakterisinin hücre canlılığına etkisini çalışmışlardır. *Pseudomonas syringae*'nin süspansiyon kültüründeki hücre canlılığını düşürdüğünü belirtmişlerdir. Boyama için hücreleri 5 dk Evans Blue'da bekletmişlerdir. Bizim yaptığımız ön denemelerde ise 5 ve 10 dakika boyama için yeterli görülmemiş ve 20 dk boyama süresi optimum olarak belirlenmiştir. Ayrıca Baker and Mock her bir örnek için 50 rastgele hücre saymış bizim çalışmamızda ise her bir süspansiyon kültürü için en az 100 hücre sayılarak 5 tekrar yapılmıştır.

Li et al. (1999) yapmış olduğu *Glycine max* üzerinde *Fusarium solani* fungal hastalık etmeninin hücre canlılığı üzerine etkisi çalışmasında fenosafranin boyası kullanılmıştır. Fenosafranin bizim çalışmamızda kullandığımız Trypan Blue gibi ölü hücreleri boyamaktadır. Ancak boyama rengi koyu kırmızı şeklindedir. Bu çalışma sonucu *Fusarium solani*'nin hücreleri öldürdüğü belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda süspansiyon hacminin canlılık üzerine etkisi incelenmiştir. En iyi sonucunda en yüksek hacime sahip 1000 ml'lik süspansiyon kültürümüzde olduğu ortaya koyulmuştur.

Zhao et al. (2003) yapmış olduğu *Saussurea medusa* çalışmasında hücre süspansiyon kültürlerindeki agregat boyları ölçülerek farklı boylardaki agregatların jaceosidin üretimine etkisi araştırılmıştır. 3 ve 4 mm'lik agregatların 6 mm'lik agregata göre 10 günün sonunda daha fazla jaceosidin ürettiği belirlenmiştir. Ancak 12 gün sonunda jaceosidin üretimi her agregat tipinde aynı olduğu gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda agregatlar ortalama 5 mm civarında olmuştur.

Bora and Sharma (2010)'nın yapmış olduğu *M. sativa* Linn. (NISCAIR tarafından taksonomik teşhisi yapılmış "Himalaya herbs store"dan temin edilmiş) DPPH süpürme aktivitesi çalışmasında sonuçlarını % 71.05 (200 g kuru örnek) olarak belirtilirken bizim yaptığımız çalışmada herba örneklerimizde en iyi sonucumuz eylül ayı herbamızda % 85.69

(1 g kuru örnek) olarak ölçülmüştür. Bizim çalışmamızda çok daha az miktarda kuru örnekten ekstraksiyon yapılmıştır.

Yine Bora and Sharma (2011)'nin yapmış olduğu *M. sativa* Linn. (NISCAIR tarafından taksonomik teşhisi yapılmış “Himalaya herbs store”dan temin edilmiş) çalışmasında DPPH süpürme aktivitesi üzerine durulmuştur. Bu sefer 100 g kuru örneği saf metanolla 24 saat ekstrakte ederek analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise ekstrakte işlemi % 80'lik metanolla gerçekleştirilmiştir. DPPH süpürme aktivitesi % 70 bulunmuş bizim çalışmamızda ise eylül ayı herbası % 85.69 olarak belirlenmiştir.

Karimi et al. (2013) yaptığı *M. sativa* (İran'da Taghavi çiftliğinden temin edilmiş) çalışmasında kuru yaprak örnekleri kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda ise *M. sativa*'nın toprak üstünde bulunan bütün bölümleri (herba) kullanılmıştır. Toplam fenolik madde miktarı 45.2 mg/g olarak belirtilirken bizim çalışmamızda herba örneğimizdeki en iyi sonuç eylül ayı herbamızda 44.2 mg/g olarak bulunmuştur. Her iki çalışmada da ekstraksiyon için % 80'lik MeOH kullanılmıştır. Ayrıca DPPH süpürme aktivitesini % 54 olarak belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda ise bu sonuç daha yüksek % 85.69 olarak tespit edilmiştir.

2 ile 7 günlük *M. sativa* L. (Kanada'da “Healt store”dan temin edilmiş) fidelerinden analiz gerçekleştiren Zine and Vizireanu (2013) toplam fenolik madde miktarında en iyi sonucu 4 günlük fideden 0.9 mg/100 g olarak elde etmişlerdir. DPPH süpürme aktivitesi sonuçlarına göre ise en iyi sonucun 6 günlük fidede % 64 olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak genç fideler kullanılmıştır. Çalışmamızda herba total fenol sonuçlarında eylül ayı herbası 44.2 mg/g, DPPH süpürme aktivitesi ise % 85.69'dur.

*M. sativa* L. (marketten temin edilmiş)'de Silva et al. (2013) herbada yaptığı DPPH süpürme aktivitesi çalışmasında sonuçların % 56 olduğu bulunmuştur. Ekstraktlarını 3 gram kuru örnekten hazırlarken çözücü olarak saf su kullanmışlardır. Bizim çalışmamızda ise 1 gram kuru örnek kullanılmakla birlikte çözücü olarak % 80'lik MeOH kullanılmıştır ve en iyi sonucumuz % 85.69 ile eylül ayı herbamız olmuştur.

Dakora et al. (1993) yapmış olduğu *M. sativa* L. cv. Moapa 69 çalışmasında bitki hidroponik yöntemle yetiştirilmiş ve *Rhizobium meliloti* bakterisine maruz bırakılmıştır. Çalışmalarında HPLC yürütücüsü olarak metanol, saf su ve asetik asit kullanırken akış hızı 2 ml/dk olarak verilmiş ve formononetin tutunma zamanı 37-38. dakikalar arası olduğu belirtilmiştir. Kontrol grubunda formononetin tespit edilemezken, *Rhizobium meliloti* bakterisine maruziyet sonucu formononetin tespit etmişler ancak kantitatif tayin yapmamışlardır. Bizim çalışmamızda HPLC yürütücüsü olarak %70'lik metanol-ultra saf su kullanılmıştır ve formononetin tutunma zamanı 16. dakika olarak belirlenmiştir. Ayrıca bizim çalışmamızda herba örneklerinde düşük miktarda formononetin tespit edilmiştir.

Parry et al. (1994) yaptığı *M. sativa* L. cv. Euver çalışmasında bitki hidroponik yöntemle yetiştirilmiştir. Bitki hipokotillerinden kesit alınarak yaralı dokuya bakır klorür uygulanmıştır. Yapılan bu çalışmada bitki ekstraktları bizim çalışmamızdan farklı olarak 1 gramlık yaş örneklerden hazırlanmıştır. Analizlerinde bitkide normal şartlarda formononetin olmadığını tespit etmişlerdir, Çölgeçen et al. (2014)'de daha önce belirlenemeyecek seviyede olduğunu bildirsede mevcut çalışmamızda formononetin kantitatif olarak ölçülmüştür.

Coronado et al. (1995) tarafından yapılan *M. sativa* cv. Nagyszenas çalışmasında bitki farklı konsantrasyonlarda Potasyum Nitrat ( $KNO_3$ ) maruziyetine bırakılmış ve HPLC tayiniyle formononetin miktar analizleri yapılmıştır. Bitki ekstraktları 1 g taze örnekten hazırlanmış ve kolon olarak C18 3.9 x 150 mm tip kolon kullanmışlardır. Coronado et al. (1995)'in verilerine göre formononetin 1 mg'dan düşük olarak gösterilmiştir. Belirtilen veride düşük konsantrasyonda uygulanan  $KNO_3$  miktarının yüksek konsantrasyona oranla formononetin miktarını daha çok artırdığı yönde olmuştur. Bizim çalışmamızda bitki ve kallus ekstraktları 1 g liyofilizatörde kurutulmuş örnekten hazırlanırken, kullandığımız kolon C18 4,6 x 250 mm kolondur. Bizim yaptığımız çalışmada formononetin miktarının daha fazla olduğu (yaklaşık 2.5 kat) ve süspansiyon kültüründe en iyi sonucun 1000 ml'lik süspansiyon kültüründen 4.99 mg/g elde edildi.

He et al. (1998) yapmış oldukları *M. sativa* cv. Apollo çalışmasında kallus kültür ve süspansiyon ortamlarını bizim çalışmamızdan farklı olarak SH (Shenk ve Hildebrandt) ortamında hazırlamışlardır. Hücre süspansiyon kültürü ortamlarının ölçüğü 50 ml'dir.

Yetiştirdikleri kalluslardan yapılan HPLC analizlerinde formononetin olduğunu göstermişler ancak kantitatif miktar belirtmemişlerdir. HPLC metodunda yurütücü (solvan) olarak ise saf su ve tetrahidrofuran kullanmışlardır. Bizim alışmamızda ise yurütücü (solvan) olarak 70 %'lik MeOH-ultra saf su kullanılmıştır. Bizim alışmamızda MS ortamı kullanılmıştır ve kantitatif tayin yapılarak formononetin miktarı belirlendi. Formononetin miktarı en yüksek 1000 ml'lik hücre süspansiyon kültüründe 4.99 mg/g olarak tespit edildi.

*M. sativa* L. cv. Sitel'de yapılan mikorizal mantar ile flavonoid miktarlarındaki farklılıkları tespit etme çalışmasında Larose et al. (2002) tarafından bitkiye *Glomus intraradices* cinsi mantar uygulanmıştır. Herba örnekleri liyofilizatörde kurutulmuştur. Yapılan ekstraksiyonda bizim çalışmamızdan farklı olarak aseton kullanılmış ve HPLC tayin metodunda saf su ve asetonitril yurütücü (solvan) olarak kullanılmıştır. C18 4.6 mm x 150 mm kolon kullanan Larose ve arkadaşları daidzein miktarında kontrol grubuna göre artış görölürken formononetin miktarında azalma tespit etmişlerdir. Bizim alışmamızda ise doğadan toplanan örneklere kıyasla hücre süspansiyon kültürlerinde ürettiğimiz örneklerde formononetin miktarında önemli artış (yaklaşık 2.5 kat) görüldü. Formononetin miktarı en yüksek 1000 ml'lik hücre süspansiyon kültüründe 4.99 mg/g olarak tespit edildi.

Martin et al. (2006) yaptığı *M. sativa* cv. Lucerne alışmasında LC-MS yöntemiyle bazı flavonoidlerin analizleri yapılmıştır. Bizim çalışmamızdan farklı olarak analizde kullanılan cihaz LC-MS olmuştur ve ekstraktlarını 2 g kuru örnekten hazırlamışlardır ve örneklerini 260 nm dalga boyunda analiz etmişlerdir. Yurütücüler (solvan) metanol ve sodyum fosfattır Martin ve arkadaşlarının herba analizlerinde formononetin miktarı 40 mg/kg olarak tespit edilmiştir. bizim çalışmamızda analizler 254 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Bizim alışmamızda formononetinin en yüksek tespit edildiği miktar 4.99 mg/g (4.99 g/kg)'dır. Bizim alışmamızdaki mayıs ayı herba örneğimiz 2.07 mg/g (2.07 g/kg) eylöl ayı ise 1.84 mg/g (1.84 g/kg) formononetine sahiptir.

*M. sativa* dışında farklı türlerin de tartışmada yer almasının nedeni HPLC analizlerinde farklı metodları da göz önünde bulundurmak ve türler arasındaki farklılıkları görebilmek içindir. Bir başka çalışma olan Modolo et al. (2007) yaptığı *M. truncatula* (Turface'de yetiştirilmiş) araştırmasında bazı flavonoidlerin varlığı üzerinde çalışma yapılmıştır. C18 4.6 x 250 mm

kolon kullanılan çalışmada 1 ml/dk akış hızı uygulanmış ve yürütücü olarak asetonitril kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda akış hızı 0,35 ml/dk, yürütücü olarak ise %70'lik metanoldür. Formononetin tespit dakikası bizde 16 iken bu çalışmada 41. dakika olarak belirlemiştir. Formononetin varlığı bitkide tespit edilmiştir kantitatif sonuç sunulmamıştır.

Farag et al. (2007) yaptığı *M. truncatula* cv. Jemalong çalışmasında herba ile 500 ml'lik SH (Schenkand Hildebrandt) süspansiyon ortamında yetiştirdikleri örnekleri karşılaştırmışlardır. Bizim çalışmamızda ise 4 farklı hacimde MS süspansiyon kültürü kallusları, herba ile kıyaslanmıştır. Farag ve arkadaşları HPLC analizlerinde C18 4.6 x 250 mm kolonu ve 0.8 ml/dk akış hızı kullanmışlardır. Analizlerinde bitkide belirlenemeyen daidzein, genistein, biokanin A, naringenin gibi maddeler hücre süspansiyon kültüründe yetiştirdikleri örneklerde belirlenmiştir. *M. truncatula*'da 0.6 mg/g tespit edilen formononetin miktarı bizim çalışmamızda *M.sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası)'nda 1000 ml'lik hücre süspansiyon kültüründe 4.99 mg/g olarak tespit edilmiştir. Ancak süspansiyon kültüründe yetiştirdikleri örneklerde herbaya kıyasla daha düşük formononetin tespit etmişlerdir.

*M. sativa* cv. Azurara ve 6 farklı *Medicago* türünde yapılan analizlerde 1 g kuru (3 gün 65 °C'kurutulmuş) herba örneğiyle yapılan analizlerde Rodrigues et al. (2014) C18 150 mm x 4.60 mm kolon tipi kullanmışlardır. Farklı flavonoid analizleri yapan Rodrigues ve arkadaşları *M. sativa*'da sulu çözelti ile hazırlanan ve etanollü çözelti ile hazırlanan ekstraksiyonları karşılaştırmışlardır.. Sulu çözelti ile hazırlanan *M. sativa* ekstraksiyonunda formononetin ve daidzein tespit edemeyen Rodrigues et al. etanollü ekstraksiyonda formononetini 2.40 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise metanollü ekstraksiyon olarak formononetin miktarı en yüksek 1000 ml'lik hücre süspansiyon kültüründe 4.99 mg/g (4.99 g/kg) olarak tespit edildi. Yapılan literatür taramasında ekstraksiyon işleminde genellikle MeOH kullanılmaktadır.

Çölgeçen ve arkadaşlarının (2014) yapmış olduğu *M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası) çalışmasında formononetin 28. dakikada belirlenmiş, analizlerinde akış hızı 0,8ml/dk olarak yapılmıştır. Yapmış oldukları HPLC analizinde 10 µL enjeksiyon yapılmıştır. *M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası) herba analizlerinde daidzein ve formononetin varlığı HPLC'de tespit edilemezken hücre süspansiyon kültürü analizlerinde üretilebildiği görülmüştür.



Formononetin miktarı 100 ml'lik süspansiyon kültürlerinde 0.32 mg/100 mg tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda formononetin 16. dakikada belirlenmiştir ve akış hızı 0,35 ml/dk olarak yapılmıştır, HPLC analizlerinde örnekler 20 µL enjekte edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise formononetin herba analizlerinde düşük miktarda tespit edilmiştir ve 100 ml'lik süspansiyon ortamında formononetin miktarı 0.37 mg/100 mg olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak *M. sativa* L. cv. Elçi (Elçi yoncası)'nın büyük ölçekli süspansiyon kültüründe formononetin üretimi artırılmıştır. Formononetinin antioksidan etkisi olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda tıbbi önemi olan formononetinin fazla miktarda üretimi için yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışma ışığında ileride daha iyi üretim sağlamak amacıyla biyoreaktör aşamasına geçilebilir.

## KAYNAKLAR

- Akçam-Oluk E** (2006) Bitki hücre süspansiyon kültürleri ve sekonder metabolit üretimi. *Anadolu Üni. Bil. ve Tek. Der.*, 7(2): 303-310.
- Aktaş T and Çölgeçen H** (2017). Farklı Bitki Türlerinden Bitki Doku Kültürü Teknikleriyle Flavonoidlerin Üretimi *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 7(2):665-673.
- Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S** (2001) Bitki biyoteknolojisi I. Doku kültürü ve uygulamaları. *Selçuk Üniversitesi Basımevi*, 374.
- Baker C J and Mock N M** (1994) An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39: 7-12.
- Birman H** (2012) Bitkisel flavonoid bileşiklerinin biyoaktiviteleri ve muhtemel etki mekanizmaları. *İst. Tıp Fak. Derg.*, 75: 3.
- Bora K S and Sharma A** (2010) *In Vitro* Antioxidant and Free Radical Scavenging Potential of *Medicago sativa* Linn. *Journal of Pharmacy Research*, 3(6):1206-1210.
- Bora K S and Sharma A** (2011) Evaluation of Antioxidant and Cerebroprotective Effect of *Medicago sativa* Linn. against Ischemia and Reperfusion Insult. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 9 pp.
- Carpita N C** (1985) Tensile Strength of Cell Walls of Living Cells. *Plant Physiol.* 79: 485-488.
- Coronado C, Angelo J, Zuanazzi S, Sallaud C, Quirion J C, Esnault R, Husson H P, Kondorosi A, Ratet P** (1995) Alfalfa Root Flavonoid Production Is Nitrogen Regulated. *Plant Physiol.*, 108: 533-542.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Çaylak E** (2011) Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9 (1): 73-83.
- Çölgeçen H, Koca Çalışkan U, Kartal M, Büyükkartal H N** (2014) Comprehensive evaluation of phytoestrogen accumulation in plants and in vitro cultures of *Medicago sativa* L. 'Elçi' and natural tetraploid *Trifolium pratense* L. *Turkish Jour. of Bio.*, 38: 619-627.
- Dakora F D, Joseph C M, Phillips D A** (1993) Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.*, 101: 819-824.
- Delibaş N ve Özçankaya R** (1995) Serbest Radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2(3): 11-17.
- El-Beltagi H S, Ahmeda O K, El-Desouky W** (2011) Effect of low doses  $\gamma$ -irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) callus culture. *Radiation Phy. and Che.*, 80: 968–976.
- Elçi Ş** (2005) Baklagil ve buğdaygil yem bitkileri (1. Basım). *Ankara : T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı*.
- Erişen S** (2005) Yonca (*Medicago sativa* L.)'da somatik embriyogenesis aracılığıyla bitki rejenerasyonu. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 11(3), 311-315.
- Evcimen M and Aslan R** (2015) Yaygın kullanıma sahip tıbbi aromatik bitkilerdeki bazı antioksidan fitokimyasalların fizyolojik etkileri. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 8(2): 65-78.
- Farag M A, Huhman D V, Lei Z, Sumner L W** (2007) Metabolic profiling and systematic identification of flavonoids and isoflavonoids in roots and cell suspension cultures of *Medicago truncatula* using HPLC–UV–ESI–MS and GC–MS. *Phytochemistry*, 68: 342–354.
- Fritzemeier K H, Rolfs C H, Pfau J, Kindl H** (1983) Action of ultraviolet-C on stilbene formation in callus of *Arachis hypogaea*. *Planta*, 172: 238-244.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Gamborg O L, Miller R A and Ojima O** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. *Exp. Cell Res.*, 50: 151-158.
- Gamborg O L and Phillips G C** (1995) Media preparation and handling. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21-34.
- Gülen S** (2013) Asma ve Yonca Yapraklarının *In Vitro* Antioksidan Özellikleri. *Yüksek Lisans Tezi*, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Edirne, 127.
- He X Z, Reddy J T, Dixon R A** (1998) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) cDNA cloning and characterization of an elicitor inducible isoflavone 7- O-methyltransferase. *Plant Mol. Bio.*, 36: 43-54.
- Işık F E** (2005) Edirne bölgesinde yetişen *Trifolium resupinatum* L. var. *Microcephalum* bitkisinin fitokimyasal incelenmesi. *Doktora tezi*. Trakya Üniversitesi.
- Kaczmarczyk-Sedlak I, Wojnar W, Zych M, Ozimina-Kaminska E, Taranowicz J, Siwek A** (2013) Effect of Formononetin on Mechanical Properties and Chemical Composition of Bones in Rats with Ovariectomy-Induced Osteoporosis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1:10 pp.
- Kahraman A, Serteser M, Köken T** (2002) Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Der.*, 3: 01-08.
- Karadağ A, Özçelik B, Saner S** (2009) Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal. Methods*, 2: 41-60.
- Karimi E, Oskoueian E, Oskoueian A, Omidvar V, Hendra R, Nazeran H**, (2013) Insight Into the Functional and Medicinal Properties of *Medicago sativa* (Alfalfa) Leaves Extract *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(7): 290-297.
- Keller A C, Ma J, Kavalier A, He K, Brillantes A M B, Kennelly E J** (2011) Saponins from the traditional medicinal plant *Momordica charantia* stimulate insulin secretion in vitro. *Phytomedicine*, 19: 32-37.
- Kumar S and Pandey A K** (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Bio. of Plants*, 6: 34.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Larose G, Chênevert R, Moutoglis P, Gagné S, Piché Y, Vierheilig H** (2002) Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *J. Plant Physiol.*, 159: 1329-1339.
- Li S, Hartman G L, J. M. Widholm J M** (1999) Viability staining of soybean suspension cultured cells and a seedling stem cutting assay to evaluate phytotoxicity of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* culture filtrates. *Plant Cell Reports*, 18: 375–380.
- Linsmaier E M and Skoog F** (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18.
- Luczkiewicz M, Glo'd D** (2003) Callus cultures of Genista plants *in vitro* material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. *Plant Sci.*, 165: 1101-1108.
- Martin L M, Castilho M C, Silveira M I, Abreu J M** (2006) Liquid Chromatographic Validation of a Quantitation Method for Phytoestrogens, Biochanin-A, Coumestrol, Daidzein, Formononetin, and Genistein, in Lucerne. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29: 2875–2884.
- Medjakovic S and Jungbauer A** (2008) Red clover isoflavones biochanin A and formononetin are potent ligands of the human aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 108: 171-177.
- Modolo L V, Blount J W, Achnine L, Naoumkina M A, Wang X, Richard A, Dixon A** (2007) Functional genomics approach to (iso)flavonoid glycosylation in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Mol Biol*, 64: 499-518.
- Murashige T and Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15: 473-497.
- Orr J D, Edwards R, Dixon R A** (1993) Stress responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) XIV. changes in the levels of phenylpropanoid pathway intermediates in relation to regulation of i-Phenylalanine ammonia-lyase in elicitor-treated cell-suspension cultures. *Plant Physiol.*, 101: 847-856.
- Parry A D, Tiller S A, Edwards R** (1994) The Effects of heavy metals and root immersion on isoflavonoid metabolism in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.*, 106: 195-202.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Patel S, NIRAV Gheewala N, Suthar A, Shah A** (2009) In-Vitro Cytotoxicity Activity of *Solanum nigrum* Extract Against *Hela* Cell Line and *Vero* Cell Line. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*,s 1(1).
- Rodriguesa F, Almeida I, Sarmiento B, Helena M, Maria A, Oliveira B P P** (2014) Study of the isoflavone content of different extracts of *Medicago* spp.as potential active ingredient. *Industrial Crops and Products*, 57: 110-115.
- Rolfs C H, Schon H, Steffens M, Kindl H** (1987) Cell suspension culture of *Arachis hypogaea* L.: model system of specific enzyme induction in secondary metabolism. *Planta*, 172: 238-244.
- Sachdeva M, Karan M, Singh T, Dhingra S** (2014) Oxidants and Antioxidants in Complementary and Alternative Medicine: A Review. *Spatula*, 4(1): 1-16.
- Sevim D** (2011) Antioksidanlar ve Zeytinyağı. *Zeytin Bilimi*, 1(1): 43-47.
- Shanks J V and Morgan J** (1999) Plant ‘hairy root’ culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(2): 151-155.
- Silva L R,, Pereira M J, Azevedo J, Gonçalves R F, Valentão P, Guedes de Pinho P, Andrade P B** (2013) *Glycine max* (L.) Merr., *Vigna radiata* L. and *Medicago sativa* L. sprouts: A natural source of bioactive compounds. *Food Research International*, 50: 167–175.
- Singleton V L and Rossi J A** (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Singleton V L, Orthofer R and Lamuela-Raventos R M** (1999) Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
- Skoog D A and Leary J** (1992) *Principles of Instrumental Analysis*, fourth edition, Saunders College Publishing, Orlando, Florida, 102 pp.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

**Steward N Martin R Engasser J M Goergen J L** (1999) A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. *Plant Cell Reports*, 19: 171–176.

**Topçu Ş, Çölgeçen H** (2015) Bitki sekonder metabolitlerinin biyoreaktörlerde üretilmesi. *Türk Bilimsel Derl. Der.*, 8(2): 09-29.

**Visnevschi-Necrasov T, Barreira J C M, Cunha S C, Pereira G, Nunesa E, Oliveira M B P P** (2015) Advances in isoflavone profile characterisation using matrix solid-phase dispersion coupled to HPLC/DAD in *Medicago* Species. *Phytochem. Anal.*, 26: 40-46.

**Wang C K and Lee W H** (1996) *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44 pp.

**Zhao D, Huang Y, Jin Z, Qu W, Lu D** (2003) Effect of aggregate size in cell cultures of *Saussurea medusa* on cell growth and jaceosidin production. *Plant Cell Rep*, 21: 1129-1133.

**Zincă G and Vizireanu C** (2013) Impact of germination on phenolic compounds content and antioxidant activity of alfalfa seeds (*Medicago sativa* L.). *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 19(1): 105-110.

**URL-1** <<http://inovatifkimyadergisi.com/hplc-ve-ilac-sanayinde-uygulamalari>>, Ziyaret tarihi: 03.04.2018.

**URL-2** <<http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=1428>> Ziyaret tarihi: 08.05.2018.

**URL-3** <[http://www.tubives.com/index.php?sayfa=hizli\\_ara](http://www.tubives.com/index.php?sayfa=hizli_ara)> Ziyaret tarihi: 05.04.2018.

**URL-4** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=3877>> Ziyaret tarihi: 05.04.2018.

**URL-5** <<https://plants.usda.gov/java/nameSearch>> Ziyaret tarihi: 10.04.2018.

## ÖZGEÇMİŞ

Tayfun AKTAŞ 1992 senesinde Gümüşhane’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul Pendik Çamçeşme İlköğretim Okulu’nda tamamladı. Liseyi Pendik Şevket Sabancı Lisesi’nde tamamladı. 2010 senesinde Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi’nde Biyoloji bölümüne başladı. 2015 senesinde bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl Bülent Ecevit Üniversitesi’nde yüksek lisans eğitimine başladı.

### **ADRES BİLGİLERİ:**

Adres: Çamçeşme Mah. Misakı-Milli Cad. Küçük Ağa Sok. No:4/8 Pendik / İstanbul

Tel: 0(539) 895 38 26

E-posta: tayfun-aktas@hotmail.com