

T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**DEVE GÜLÜ BİTKİSİNİN *İN VİTRO* REJENERASYONU, FARKLI  
VEJETASYON DÖNEMLERİNDE VE STRES ŞARTLARINDA  
FİTOKİMYASAL İÇERİĞİNİN VE ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: Gül GÖRMEZ  
DANIŞMAN: Prof. Dr. Musa TÜRKER  
II. DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Abdulhamit BATTAL

VAN-2019



T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**DEVE GÜLÜ BİTKİSİNİN *İN VİTRO* REJENERASYONU, FARKLI  
VEJETASYON DÖNEMLERİNDE VE STRES ŞARTLARINDA  
FİTOKİMYASAL İÇERİĞİNİN VE ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN  
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: GÜL GÖRMEZ

Bu çalışma YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından **FDK-2017-6160**  
No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2019



## KABUL VE ONAY SAYFASI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Musa Türker'in danışmanlığında, Gül Görmez tarafından sunulan "DEVEGÜLÜ BİTKİSİNİN *İN VİTRO* REJENERASYONU FARKLI VEJETASYON DÖNEMLERİNDE VE STRES ŞARTLARINDA FİTOKİMYASAL İÇERİĞİNİN VE ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNİN İNCELENMESİ" isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 17/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Musa TÜRKER

İmza:



Üye : Prof. Dr. İsmail ÇELİK

İmza



Üye : Doç. Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR

İmza:



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Erdal ÖĞÜN

İmza:



Üye :Dr. Öğr. Üyesi Metin ERTAŞ

İmza:



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..28/..06../2019 tarih ve 2019/35-I sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../.....20

Enstitü Müdürü





## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Gül GÖRMEZ







## ÖZET

### DEVE GÜLÜ BİTKİSİNİN *İN VİTRO* REJENERASYONU, FARKLI VEJETASYON DÖNEMLERİNDE VE STRES ŞARTLARINDA FİTOKİMYASAL İÇERİĞİNİN VE ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNİN İNCELENMESİ

GÖRMEZ, Gül

Doktora Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Musa TÜRKER

II. Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Abdulhamit BATTAL

Haziran 2019, 153 sayfa

Deve gülü bitkisi (*Alcea spp*), halk arasında tonsilit, mide ve bağırsak ülseri, pnömoni, üriner sistem enfeksiyonları ve alopesi gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Deve gülü bitkisiyle ilk kez yapılan bu çalışmayla, *in vitro* rejenerasyonu, farklı vejetasyon dönemlerinde ve stres şartlarında fitokimyasal içeriği ve antioksidan kapasitesi incelenmiştir. Bitkinin tohum dormansisi ve kontaminasyonu engellenerek tohumlar % 86.67 oranında çimlendirilmiştir. Doku kültüründe en iyi kallus oluşumu 14 günlük kotiledonlardan 2mg/l 2,4 D içeren MS elde edilmiştir. Nod ve sürgün ucundan %100 oranında doğrudan rejenerasyon başarılmıştır. En yüksek FCR, FRAP ve ORAC değerleri Temmuz ayına ait infüzyon örneklerinde sırasıyla 16.538±0.019 GA.Eq. mg/gdrog, 225.691 µmol Fe<sup>+2</sup>/gdrog, 311.86±1.006 µmol TE/gdrog olarak tespit edilmiştir. En yüksek gallik ve klorojenik asit miktarları infüzyonu yapılan Temmuz (meyve) dönemi örneklerinde sırasıyla 0.779 mg/drog, kafeik asit ise Haziran dönemi örneklerinde 1.256 mg/drog. olarak tespit edilmiştir. Haziran ayında makro ve mikro elementler yüksek olarak belirlenmiştir. Ağır metaller ise vejetasyon dönemlerine göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Doku kültüründe 0.5 mg/l NAA+0.5 mg/l BAP uygulanan örneklerin FCR, FRAP, ORAC ve fenolik asit miktarlarının doğal ortamdakine göre yaklaşık iki katına çıktığı tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Antioksidan kapasite, Deve gülü, Fitokimyasal içerik, Rejenerasyon.



## ABSTRACT

### ***IN VITRO* REGENERATION OF HOLLYHOCK PLANT, INVESTIGATION OF PHYTOCHEMICAL CONTENT AND ANTIOXIDANT CAPACITY AT DIFFERENT VEGETATION PERIODS AND STRESS CONDITIONS**

GÖRMEZ, Gül

PhD Ths., Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Musa TÜRKER

Co-Superv. Assist. Prof. Dr. Abdulhamit BATTAL

June 2019, 153 pages

Hollyhock plant (*Alcea spp*) is used in the treatment of various diseases such as tonsillitis, stomach and intestinal ulcers, pneumonia, urinary tract infections and alopecia among public. In vitro regeneration, phytochemical content and antioxidant capacity of the plant in different vegetation periods and stress conditions were investigated for the first time in this study. The seeds were germinated at a rate of 86.67 % by preventing seed dormancy and contamination. The best callus formation in tissue culture was obtained from 14 days old cotyledons containing 2mg/l 2,4 D. 100 % direct regeneration was achieved from the nod and shoot tip. The highest FCR, FRAP and ORAC values were found to be  $16.538 \pm 0.019$  GA.Eq. mg/gdrog,  $225.691 \mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{gdrog}$ ,  $311.86 \pm 1,006 \mu\text{mol TE}/\text{gdrog}$  respectively in infusion samples in July. The highest amounts of gallic and chlorogenic acid infusions in July (fruit) samples were found to be 0.779 mg/drog, while caffeic acid in June (flowering) samples was 1.256 mg/drog respectively. Macro and micro elements were determined higher in June compared to other months. Heavy metals, on the other hand, did not show a significant difference according to the vegetation periods. It was determined that the amount of FCR, FRAP and ORAC and phenolic acid in the samples treated with 0.5 mg/l NAA+0.5 mg/l BAP almost doubled compared to those in natural environment.

**Key words:** Antioxidant capacity, Hollyhock, Regeneration, Phytochemical content,



## ÖN SÖZ

Bu tez çalışmamın her aşamasında bilgi, tecrübe ve yönlendirmeleriyle bana yardımcı olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Musa TÜRKER'e ve II. danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Abdulhamit BATTAL'a çok teşekkür ederim. Fitokimyasal içerik çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Abdullah DALAR'a, bitki teşhisindeki yardımlarından ötürü Prof. Dr. Murat Ünal'tezin deneysel çalışmalarında yardımlarından ötürü Prof. Dr. Selçuk GÜMÜŞ'e, Doç. Dr. Ayşegül GÜMÜŞ'e ve Dr. Öğr. Üyesi Yüksel AKINAY'a, laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından ötürü Araş.Gör. Neşe ERAY'a ve Dr. Muzaffer MÜKEMRE'ye teşekkür ederim.

Ayrıca bütün eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anne ve babama, eşim Aydın GÖRMEZ'e ve doktora dönemim boyunca beni sabırla destekleyen çocuklarım Betül, Hamza ve Emir'e çok teşekkür ederim.

Çalışmanın yürütülmesinde FDK-2017-6160 nolu proje ile finansal desteklerinden dolayı Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkür ederim

Gül GÖRMEZ

2019



# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
ÖN SÖZ .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xvii
1.GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ .....	7
2.1. Deve gülü .....	7
2.2. Tıbbi Bitkiler .....	9
2.3. Bitki Doku Kültürleri .....	10
2.4. Bitki Sekonder Metabolitleri .....	16
2.4. Sekonder Metabolitlerin Sınıflandırılması .....	18
2.4.1. Terpenler .....	18
2.4.2. Alkaloidler .....	19
2.4.3. Fenolik bileşikler .....	20
2.5. Serbest Radikaller (ROS) ve Oksidatif Hasar .....	22
2.6. Antioksidanlar .....	24
2.7. Serbest Radikal Toplayıcılar Olarak Fenolikler .....	25
2.8. HAT (Hidrojen Atom Transferi) ve ET (Elektron Transferi) yöntemleri .....	26
2.8.1. Orac (oxygen radical absorbans capacity; oksijen radikal absorbans kapasitesi) .....	26
2.8.2. FRAP (ferric reducing ability of plasma; demir III iyonu indirgeyici antioksidan gücü yöntemi) .....	27
2.8.3. Folin-Ciocalteu (F-C ) ayırıcı ile toplam fenolik analizi .....	28
2.9. Doku Kültürü Yoluyla Sekonder Metabolit Üretimi .....	30
2.10. Minerallerin Bitkilerdeki Etkileri .....	39
2.11. Mineral Besin Elementleri .....	42
2.11.1. Azot .....	42
2.13.2. Kükürt .....	43
2.13.3. Fosfor .....	43
2.13.4. Kalsiyum .....	43
2.13.6. Silisyum .....	44
2.13.7. Magnezyum .....	44

	<b>Sayfa</b>
2.13.8. Demir .....	45
2.13.9. Klor .....	45
2.13.10. Mangan .....	45
2.13.11. Sodyum .....	45
2.13.12. Çinko .....	46
2.13.13. Bakır .....	46
2.13.14. Nikel .....	46
2.13.15. Molibden .....	46
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	49
3.1. Materyal .....	49
3.1.1. Kimyasal ve solüsyonlar .....	49
3.1.2. Cihazlar ve ekipmanlar .....	49
3.1.3. Bitki materyali .....	50
3.2. Deneysel Dizayn .....	50
3.3. Yöntem .....	53
3.3.1. Deve gülü bitkisinin rejenerasyonu .....	53
3.3.2. Farklı vejetasyon dönemlerinde Deve gülü bitkisinin fitokimyasal içeriğinin ve antioksidan kapasitesinin tayini .....	60
3.3.3. Deve gülü bitkisinin doku kültüründe aktif bileşikleri artırma çalışmaları .....	72
3.3.5. İstatistiki analizler .....	74
4. BULGULAR ve TARTIŞMA .....	75
4.1. Deve gülü Bitkisinin Teşhisi ve Genel Özellikleri .....	75
4.2. Deve gülü bitkisinin mikroçoğaltım çalışmaları .....	76
4.2.1. Deve gülü bitkisinin <i>in vivo</i> rejenerasyonu .....	76
4.2.2. Deve gülü bitkisinin <i>in vitro</i> rejenerasyonu .....	76
4.3. Farklı Vejetasyon Dönemlerinde Deve gülü Bitkisinin Fitokimyasal İçeriğinin ve Antioksidan Kapasitesinin Tayin Bulguları .....	97
4.3.1. Deve gülü bitkisinin liyofilize etanol ekstraksiyonu ve suyla infüzyon verim bulguları .....	97
4.3.2. Deve gülü bitkisinin antioksidan aktivitesi bulguları .....	99
4.3.3. Deve gülü bitkisinin fitokimyasal içerik bulguları .....	102
4.3.4. Deve gülü bitkisinin antioksidan kapasitesinin ve fenolik asitlerinin doku kültüründe artırılması .....	118
4.3.5. Doğal ortamından getirilen ve doku kültüründe stres uygulanan örneklerin antioksidan kapasite ve fenolik asit miktarlarının karşılaştırılması .....	124
5. SONUÇ .....	127
KAYNAKLAR .....	133
EKLER .....	147







## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2. 1. Deve gülü bitkisinin genel özellikleri .....	8
Çizelge 2. 2. Bitki hücre kültürleri tarafından üretilen ve ekonomik değeri yüksek bazı sekonder metabolitler.....	18
Çizelge 2. 3. Terpen çeşitleri ve örnekleri .....	19
Çizelge 2. 4. Başlıca alkaloid tipleri, amino asit öncülleri ve her bir tipin iyi bilinen örnekleri .....	20
Çizelge 2. 5. Fenolik bileşikler .....	21
Çizelge 2. 6. Bitki Doku Kültürü yoluyla üretilen bazı bitki sekonder metabolitleri ve yetiştirildikleri kültür ortamı özellikleri. ....	34
Çizelge 2. 7. Biyokimyasal işlevlerine göre bitki mineral besin elementlerinin sınıflandırılması .....	41
Çizelge 3. 1. Deneysel Dizayn .....	52
Çizelge 3. 2. Deve gülü tohumlarının uygulama grupları .....	58
Çizelge 3. 3. HPLC analizlerinde kullanılmış olan sistemler.....	68
Çizelge 3. 4. HPLC analizlerinde kullanılan gradient programı .....	68
Çizelge 3. 5. LC-MS analizlerinde kullanılan sistemler.....	69
Çizelge 3. 6. LC-MS analizlerinde kullanılan gradient programı .....	69
Çizelge 3. 7. Atomik Absorbsiyon cihazının analiz esnasındaki optimum özellikleri... 71	
Çizelge 3. 8. Analizler esnasında ICP-OES cihazı optimum özellikleri .....	71
Çizelge 3. 9. ICP-OES cihazının analiz esnasındaki enstrümental özellikleri .....	72
Çizelge 4. 1. Deve gülü Bitkisiyle Yapılan Ön Çalışmalar .....	77
Çizelge 4. 2. Deve gülü bitkisiyle yapılan ön çalışmalar .....	78
Çizelge 4. 3. Eksplantlar çizelgede belirtilen alt kültürlerle alınmıştır. ....	78

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 4. 4. Farklı sodyum hipoklorit uygulanan Deve gülü tohumlarında 5.Gün sonunda gözlenen kontaminasyonlar .....	81
Çizelge 4. 5. Deve gülü 5. gün ve 30. gün çimlenme indeksleri .....	83
Çizelge 4. 6. 14 ve 28 günlük eksplantlarda kallus oluşumu yüzdeleri .....	87
Çizelge 4. 7. Deve gülü bitkisinin infüzyon ve etanol ekstraksiyonu % verimi.....	98
Çizelge 4. 8. Deve gülü bitkisinin infüzyon ve etanol ekstraksiyonunun farklı vejetasyon dönemlerinde FCR, FRAP, ORAC sonuçları .....	100
Çizelge 4. 9. Deve gülü bitkisinin yaprak kısmından elde edilen liyofilize ekstrelerde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yardımıyla tespit edilen fenolik bileşikler.....	104
Çizelge 4. 10. Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerinde HPLC ve LC-MS/MS ile tespit edilen fenolik asit içeriği .....	106
Çizelge 4. 11. Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerindeki makroelement içeriği .....	113
Çizelge 4. 12. Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerindeki mikroelement içeriği .....	115
Çizelge 4. 13. Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerindeki ağır metal içeriği .....	116
Çizelge 4. 14. Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerindeki protein içeriği .	117
Çizelge 4. 15. Sakkaroz uygulamasının ardından FCR, FRAP, ORAC değerleri.....	119
Çizelge 4. 16. Sakkaroz uygulamasının ardından gallik, kafeik ve klorojenik asit miktarları.....	120
Çizelge 4. 17. UV C (254 nm) uygulamasının ardından FCR, FRAP, ORAC değerleri .....	121
Çizelge 4. 18. UV C (254 nm) uygulamasının ardından fenolik asit miktarları.....	121
Çizelge 4. 19. BBD uygulamasının ardından FCR, FRAP, ORAC değerleri .....	123
Çizelge 4. 20. BBD uygulamasının ardından gallik, kafeik ve klorojenik asit değerleri.....	123

**Çizelge****Sayfa**

Çizelge 4. 21. Doğal ortamından getirilen ve doku kültüründe stres uygulanan örneklerin antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması.....	124
Çizelge 4. 22. Doğal ortamından getirilen ve doku kültüründe stres uygulanan örneklerin fenolik asit miktarlarının karşılaştırılması.....	125





## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Doğadan getirildikten sonra saksıya ekilen Deve gülü bitkisi .....	53
Şekil 3.2. Bitkinin tohumları .....	54
Şekil 3.3. Tohum kanatlarının soyulduktan sonraki hali. ....	54
Şekil 3.4. a.Tohumların ekim öncesi mikroskop altında bistüri ile çizilmesi, b. Çizilen tohumlar.....	58
Şekil 3.5. Deve gülü yaprakları; a. Kurutulmuş,.b. Öğütülmüş .....	61
Şekil 3.6. Deve gülü bitkisinin ekstraksiyon aşamaları: a.homojenizasyon, b ve c süzme, d. filtrasyon.....	62
Şekil 3.7. FCR deneyi esnasında görülen renk değişimi .....	64
Şekil 3.8. FRAP deneyi esnasında görülen renk değişimi.....	66
Şekil 4.1. Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerindeki görünümü: a.çiçeklenme (Haziran), b. meyve (Temmuz), c. Tohum (Ağustos).....	75
Şekil 4.2. Sterilizasyon sonucu gözlenen kontaminasyonlar. a. Bakteri, b. Mantar kontaminasyonu.....	80
Şekil 4.3. Doku kültüründe kullanılan in vitro çimlendirilmiş Deve gülü bitkiciklerinin kontamine olmadan büyümüş hali. a üstten görünüm. b. Kökleri.....	80
Şekil 4.4. Bistüri ile zedelendikten sonra çimlenen tohumlar .....	83
Şekil 4.5. %10 SH uygulamalarının 30. gün çimlenme durumları.....	84
Şekil 4. 6. 30. gün sonunda çimlenen Deve gülü bitkiciği .....	85
Şekil 4.7. Deve gülü bitkisinin farklı eksplantları ile kallus oluşumu. a. Sürgün ucu. b. yaprak. ....	87
Şekil 4.8. Deve gülü bitkisinin kotiledon eksplantından kallus oluşumu.....	88
Şekil 4.9. Deve gülü bitkisinin hipokotil eksplantından kallus oluşumu .....	88
Şekil 4.10. Sürgün ucundan rejenerasyon .....	93
Şekil 4 .11. Nod eksplantından oluşan yeni sürgünler. ....	92

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.12. MS besiyerinde rejenere edildikten sonra köklendirme besiyerinde köklendirilen sürgün uçları .....	95
Şekil 4.13. Toprağa aktarılan rejenere bitkicikler.....	97
Şekil 4.14. Deve gülü bitkisinin FCR değerlerinin ekstraksiyon çeşidine göre (infüzyon ve etanol) dönemsel karşılaştırılması.....	101
Şekil 4.15. Deve gülü bitkisinin FRAP değerlerinin ekstraksiyon çeşidine göre (infüzyon ve etanol) dönemsel karşılaştırılması.....	101
Şekil 4.16. Deve gülü bitkisinin ORAC değerlerinin ekstraksiyon çeşidine göre (infüzyon ve etanol) dönemsel karşılaştırılması.....	102
Şekil 4.17. Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerinde tespit edilen Gallik asit miktarının ekstraksiyon çözgenine göre değişimi.....	105
Şekil 4.18. Deve gülü bitkisinin infüzyon ve etanol ekstrelerinde tespit edilen klorojenik asidin vejetasyon dönemlerine ve ekstraksiyon çözgenine göre değişimi.....	106
Şekil 4.19. Deve gülü bitkisinin infüzyon ve etanol ekstrelerinde tespit edilen kafeik asidin vejetasyon dönemlerine göre değişimi.....	108



## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

### **Simgeler**

%

g

K

µg/g

µM

M

T

### **Açıklama**

Yüzde

Gram

Kontrol

Mikrogram/gram

Mikromolar

Molar

İz miktarda

### **Kısaltmalar**

AAPH

BA

B5

BBD

Ca

CAT

Cd

cm

Co

Cr

DNA

DPPH

ET

EtOH

FCR

Fe

FRAP

GAE

### **Açıklama**

2,2'-Azobis-2-

Benzil Aminopürin

Gamborg's Besin Ortamı

Bitki Büyüme Düzenleyici

Kalsiyum

Katalaz

Kadmiyum

Santimetre

Kobalt

Kromiyum

Deoksiribonükleik Asit

2,2-Diphenyl-1-Picrylhidrazyl

Elektron Transferi

Etil Alkol

Folin-Ciocalteu Antioksidan Kapasite

Demir

Ferrik İyon Azaltıcı Antioksidan Güç

Gallik Asit Eşdeğeri

## Kısaltmalar

## Açıklama

<b>g/l</b>	Gram/litre
<b>GPx</b>	Glutasyon Peroksidaz
<b>GR</b>	Glutasyon Redüktaz
<b>HAT</b>	Hidrojen Atom Transferi
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen Peroksit
<b>HPLC</b>	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
<b>IAA</b>	İndol Asetik Asit
<b>IBA</b>	İndol Bütirik Asit
<b>2.4-D</b>	2.4- Diklorofenoksi Asetik Asit
<b>K</b>	Potasyum
<b>kA</b>	Kuru ağırlık
<b>kHz</b>	Kilohertz
<b>kPA</b>	Kilopaskal
<b>mBAR</b>	Milibar
<b>MDA</b>	Malondialdehid
<b>Mg</b>	Magnezyum
<b>mg</b>	Miligram
<b>mg/ml</b>	Miligram/mililitre
<b>ml</b>	Mililitre
<b>mg/l</b>	Miligram/litre
<b>Mn</b>	Mangan
<b>MS</b>	Murashige ve Skoog
<b>MSK</b>	Murashige&Skoog kontrol
<b>NAA</b>	Naftelen Asetik Asit
<b>Na</b>	Sodyum
<b>NaOCl</b>	Sodyumhipoklorit
<b>ND</b>	Belirlenemedi
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Süperoksit Anyon Radikali
<b>OH</b>	Hidroksil Radikali
<b>ORAC</b>	Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi
<b>PAL</b>	Fenilalanin Amonyum Liyaz

## Kısaltmalar

## Açıklama

<b>pH</b>	Hidrojen gücü
<b>POH</b>	Fenolik Bileşikler
<b>PPO</b>	Polifenol Oksidaz
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>RNS</b>	Reaktif Nitrojen Türleri
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>rpm</b>	Devir/dakika
<b>S</b>	sakkaroz
<b>SA</b>	Salisilik Asit
<b>Se</b>	Selenyum
<b>SET</b>	Single Electron Transfer
<b>SH</b>	Sodyum Hipoklorit
<b>sn</b>	Saniye
<b>SOD</b>	Süper Oksit Dismutaz
<b>TAC</b>	Total Antioxidant Capacity
<b>TE</b>	Trolox Eşdeğeri
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>Z</b>	Zedeleme
<b>Zn</b>	Çinko



## EKLER DİZİNİ

<b>Ek</b>	<b>Sayfa</b>
Ek 1. 0.5 mg/l NAA+ 0.5 mg/l BAP uygulanmış örneğin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı .....	147
Ek 2. 45 mg/l Sakkaroz uygulanmış örneğin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı ...	147
Ek 3. 1 mg/l NAA uygulanmış örneğin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı .....	148
Ek 4. 1 mg/l BAP uygulanmış örneğin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı .....	148
Ek 5. 15 mg/l Sakkaroz uygulanmış örneğin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı ...	149
Ek 6. Sakkaroz uygulamaları için kontrol kabul edilen MS ortamındaki örneklerin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı.....	149
Ek 7. UV uygulamaları için kontrol kabul edilen MS ortamındaki örneklerin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı .....	150
Ek 8. 15 dak.UV uygulanan örneklerin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı.....	150
Ek 9. 30 dak.UV uygulanan örneklerin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı.....	151



## 1.GİRİŞ

Tıbbi bitkiler hastalıkların tedavisinde terapötik özellikleri için kullanılan bitki ve bitkisel kaynaklı ürünlerdir. Etkilerinin çoğu, dünyanın farklı bölgelerinde yaşayan insanların tedavi amacıyla kendi stratejilerini geliştirdikleri folklorik tıp aracılığıyla keşfedilmiştir (Lima ve ark., 2005). Bitkilerin ilaç olarak kullanılması, Asya, Afrika, Avrupa ve Amerika dahil dünyadaki hemen hemen her kültürde önemli bir rol oynamıştır (Wargovich ve ark., 2001). Bitkilerin tedavi amacıyla kullanımı insanoğlunun tarih sahnesine adım atmasıyla birlikte başlamıştır. Eski Mısır üzerine yapılan çalışmalarda tıbbi bitkilere papiruslarda, lahit içine çizilen resimlerde ve çok nadir de olsa çok az miktarda bitki içeren kavonozlarda rastlanmaktadır (Shovan, 2017). M.Ö. 1500 yıllarında yazılmış Mısır Ebers Papiruslarında 450 kadar hastalığın adı geçmekte ve tedavi amacıyla hayvansal ve bitkisel kökenli ilaçlardan faydalandığından bahsedilmektedir. Çin'in ilk tıbbi metinlerinden biri olan *Huangdi Neijing*'de belirtilen 224 ilacın 100 den fazlası bitkilerdir (Shovan, 2017).

Hastalıkların doğa kaynaklı olduğunu düşünen Yunan hekim Hipokrat, tedavilerinde de bitkilerden faydalanmıştır. Batı tıbbının esinlendiği Erken Roma kitabelerinde, özellikle de Dioscorides, Galena ve Avicenna (İbn-i Sina )'nın hastalıkları bitkilerle tedavi ettiklerinden bahsedilmektedir. Özellikle Dioscorides'in (M.Ö.90-40) 600 den fazla bitki türü ile ilgili bilgileri derlediği kitabı *De Materia Medica*, Ortaçağ ve Rönesans boyunca Avrupa'nın en önemli referans medikal kitabı olarak kalmıştır. Yunan doktor Galeno de Pergamo (M.Ö. 200-130) oluşturduğu bitkisel reçetelerle Avrupa tıbbına bin yıldan fazla bir süre ışık tutmuştur. Milattan sonra 980-1037 yıllarında yaşamış müslüman hekim, bilim adamı ve filozof İbn-i Sina, muhteşem zekâsının önemli bir ürünü olan *El-Kanun fi't-tıbb* adlı eserinde bitkilerden faydalanarak oluşturduğu reçetelerden bahsetmiş, tıp ve botaniğin birbiriyle bağlantılı olduğunu vurgulamıştır (Ağırakça, 2015).

Günümüzde ise batı tıbbı ürettiği birçok ilacın içine bitkisel kaynaklı hammaddeleri eklemeye devam etmektedir. Ülkemizde de halk yaşadığı çevrede bulunan bitkileri, gıda ihtiyaçlarını karşılamının yanı sıra hayvan ve insan hastalıklarına karşı teröpatik olarak kullanmaktadır. İçinde bulunduğu coğrafik konum nedeniyle

ülkemiz, kimyasal kompozisyonu belirlenmemesine rağmen halk arasında teröpatik olarak kullanılan çok sayıda bitkiye ev sahipliği yapmaktadır.

Bitkiler, ürettikleri birincil metabolitlerin yanısıra onlara teröpatik özellik kazandıran sekonder metabolitleri nedeniyle gün geçtikçe artan bir değer kazanmaktadırlar. Yüksek bitkilerin tohum ile vejetatif dokularında oldukça fazla bulunan ve bitkinin fizyolojik gelişimi için gerekli olan karbonhidratlar, proteinler, yağlar vb. bileşikler primer metabolitler olarak sınıflandırılırken, primer metabolitler kadar bitkinin yaşamsal olayları için gerekli olmayan ancak bitkinin herhangi bir stres faktörüyle karşı karşıya kaldığı (UV ışın, herbisit, kuraklık, soğuk, besin azlığı, yaralanma, viral, fungal, bakteriyel patojenler vb.) durumlarda savunma mekanizması olarak ve tozlaşma esnasında taşıyıcı böcekleri cezbetmek için sentezlenen kimyasallar da sekonder metabolit adını alırlar. Sekonder metabolitler, bitki hücrelerinin hayatta kalması için gerekli olmayan ancak bitki için bir bütün olarak yararlı olan maddelerdir. Primer metabolitlerden farklı olarak, sekonder metabolitlerin yokluğu hemen ölümle sonuçlanmaz, bunun yerine organizmanın hayatta kalma, doğurganlık ya da estetiğinin uzun vadede bozulmasına neden olabilecekleri gibi önemli bir değişikliğe de yol açmayabilirler (Tiwari, 2015). Bunlar, bitkiyi büyüme ortamındaki değişikliklerden koruyarak bitki gelişimine yardımcı olan metabolik aktiviteleri etkileyen sinyal fonksiyonlarına sahip karmaşık kimyasal maddelerdir.

Sekonder metabolit üretimi hücre kültürleriyle gerçekleştirildiğinde bitkideki kadar ya da daha fazla üretimin sağlanabilmesi için kültürlerde çeşitli müdahalelerde bulunulabilir. Kültür ortamına bu maddelerin öncüllerinin ilavesi, elisitasyon, kültürden yüksek üretkenlikteki ırkların seçimi ve metabolik mühendisliği çalışmaları bu müdahalelerin bazılarıdır.

Tıbbi bitkileri doğal olarak yetiştikleri ortamdan toplamak, buldukları habitata zarar vermekte ve genetik çeşitliliği olumsuz etkilemektedir. Bitkilerin devamlı ve yüksek kaliteli kültürlerinin doku kültüründe mikro çoğaltımı ile tıbbi bitkilerin soylarının tükenmesi ve habitat tahribatı engellenebilir (Murch ve ark., 2000). Klasik bitki ıslahı çalışmalarının temelinde ürün kalitesi ve miktarının artırılması çalışmaları yer alırken, tarımsal ürün kaybının en önemli sebepleri arasında yer alan hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık kazandırılması her zaman ikinci planda bırakılmıştır.



Bitkileri korumak amacıyla kullanılan yüksek maliyetli kimyasalların kalıntıları hem ürün hem de toprak ve suda uzun süre ayrılmadan kaldığı için insan, hayvan ve çevre sağlığını önemli ölçüde tehdit eder duruma gelmiştir. Kimyasalların kullanımı yüksek maliyeti de beraberinde getirmektedir. Doğadaki genetik çeşitlilikten faydalanan klasik bitki ıslahı çalışmaları oldukça uzun bir zaman periyodunu kapsamaktadır. Bu nedenle bitkilerin tarımsal özelliklerinin iyileştirilmesinde bitki doku kültürleri ve bitki genleri üzerine yapılacak çalışmalar, bitki ıslahının getirdiği zorlukları ortadan kaldıracaktır (Babaoğlu ve ark., 2002).

Bitki doku kültürleri, bütünlüğü bozulmamış bir bitki veya söz konusu bitkinin bir bölümü (eksplantı) kullanılarak steril şartlarda, suni besi ortamı kullanılarak elde edilen kültürlerdir. Bitki hücresinin totipotent potansiyeline ek olarak, hücrelerin metabolizmalarını, büyümelerini ve gelişimlerini değiştirebilecek kapasiteleri de tüm bitkinin yenilenmesi açısından aynı derecede önemli ve hayati öneme sahiptir. Bitki doku kültür ortamı, bitkilerin normal büyümesi ve gelişimi için gerekli olan tüm besin maddelerini içerir.

Bitkilerin tıbbi etkilerinin belirlenebilmesi için fitokimyasal içeriklerinin iyi tespit edilmesi gerekir. Özellikle bazı tıbbi bitkilerin mevsimsel olması, ihtiyaç duyulan her an elde edilememesi sorununun yanısıra sekonder metabolitlerinin kalitesinde de büyüme şartlarından kaynaklanan dalgalanmalara neden olmaktadır. Bitki doku kültürleri bu noktada önemli sekonder metabolitlerin üretiminde alternatif bir yaklaşım sunmaktadır. Biyoaktif moleküller özelleşmiş bitki hücrelerinde veya organlarında sekonder metabolit olarak birikirler ancak miktarları bitkinin kısımlarına, mevsime, iklime ve büyüme fazına göre değişiklik gösterir. Hücre kültürü teknolojisi hem sekonder metabolit üretimini hem de incelenmesini mümkün kılmaktadır. Bitki hücreleri, kültürlere eklenen doğal veya suni bileşikleri hidroksilleme, glikolizleme, hidrojenleme, dehidrojenasyon gibi çok çeşitli reaksiyonlara tabi tutarak metabolitlere dönüştürürler.

Bitki doku kültürleri yoluyla sekonder metabolitler istenen miktarda üretilebilmektedir. Özellikle bazı sekonder metabolitlerin antioksidan özellikte olmaları, üretimlerine olan ilgiyi arttırmaktadır. Bir antioksidan, diğer moleküllerin oksidasyonunu inhibe eden bir moleküldür. Oksidasyon, elektron kaybını veya

oksidasyon durumunda bir artışı içeren kimyasal bir reaksiyondur. Yükseltgenme reaksiyonları serbest radikallere neden olabilir. Sırasıyla, bu radikaller zincir reaksiyonlarını başlatabilir. Zincir reaksiyonu bir hücrede gerçekleştiğinde, hücrede hasara veya ölüme neden olabilir. Antioksidanlar, serbest radikal ara maddeleri kaldırarak bu zincir reaksiyonları sonlandırır ve diğer oksidasyon reaksiyonlarını inhibe eder (Shovan, 2017). Normal metabolik fonksiyonlar sırasında, vücutta serbest radikal denilen yüksek oranda reaktif bileşikler üretilebildiği gibi çevreden de alınabilmektedir. Bu moleküller, bir çift elektrona sahip olduklarından dolayı yüksek oranda reaktiftirler ve kararsızdırlar. Proteinler, lipitler ve karbonhidratlar gibi hücrel moleküller ile reaksiyona girerler ve bunları denatüre ederler. Bunun bir sonucu olarak, hayati hücrel yapılar ve fonksiyonlar kaybolur ve sonuçta çeşitli patolojik durumlara neden olur. Antioksidanlar, hücrel bileşenlere saldırmadan önce serbest radikalleri stabilize edebilir veya devre dışı bırakabilir. Serbest radikallerin enerjisini azaltarak veya kullanımları için bazı elektronlarından vazgeçerek hareket etmelerini sağlarlar. Son on yılda, antioksidan enzimlerin yararlı etkilerine yönelik sayısız araştırma yapılmıştır. Yaşlanma süreci, kanser, diyabet, Alzheimer hastalığı, felç, kalp krizi ve ateroskleroz dahil olmak üzere serbest radikallerle altmıştan fazla hastalık arasında önemli bir bağlantı olduğu bulunmuştur. Serbest radikallere maruz kalma oranını azaltarak ve antioksidan enzim bakımından zengin gıdalar veya antioksidan enzim takviyeleri alımını arttırarak, vücudumuzun serbest radikallere bağlı sağlık problemleri riskinin azaltılabilir (Shovan, 2017).

Fenolik bileşikler bazen bitkilerde şaşırtıcı derecede yüksek konsantrasyonda bulunan, antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerdir (Lapornik ve ark., 2005). Hidrojen veya elektron veren ajanlar olarak reaktiviteleri ile belirlenen reaktif oksijen türleri (ROS) gibi serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahiptirler (Fernandez-Pachon ve ark., 2006). Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi temel olarak serbest radikallerin adsorbe edilmesinde ve nötrleştirilmesinde, singlet ve üçlü oksijenin söndürülmesinde veya peroksitlerin ayrıştırılmasında önemli bir rol oynayabilen redoks özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Rice ve ark., 1995).

Reaktif oksijen türleri (ROS) terimi, radikal tip reaksiyonlarda (elektron alan veya veren) yer alan radikalleri veya kimyasal türleri içerir. Ancak, eşleştirilmemiş

elektronlara sahip olmadıkları için gerçek radikal değildir. Radikal olmayan ROS örnekleri, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hipokloröz asit (HOCl), ozon (O<sub>3</sub>) ve tekli oksijeni (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) içerir. ROS, mitokondriyal solunum, polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonu, arakidonik asit metabolizması, enzimatik fonksiyonlar ve demir veya bakır aracılı kataliz gibi endojen işlemlerle üretilebilir. İnsan organizması, ROS'u çeşitli fizyolojik süreçler arasındaki harmonik dengenin işlevsel bir parçası olarak üretir (Verma ve Gupta, 2010).

Doğal antioksidanların çoğu, antibakteriyel, antiviral, antienflamatuar, antialerjik, antitrombotik ve vazodilatuar faaliyetler dahil olmak üzere geniş bir biyolojik etki gösterir. Antioksidan aktivite, yaşam için önemli bir özelliktir (Velioğlu ve ark.,1998). Kronik dejeneratif hastalıkların önlenmesinde maddelerin *in vitro* antioksidan aktivitesini belirlemek için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. *In vitro* olarak düşük antioksidan aktiviteye sahip maddelerin muhtemelen *in vivo* olarak da çok az aktivite göstereceğini düşündürmesi nedeniyle antioksidan kapasite belirleme teknikleri oldukça önem taşımaktadır. (Velioğlu ve ark., 1998).

Mineraller insan vücudunun sadece % 4-6'sını oluştursalar da diyetle kritik öneme sahiptir (Özcan, 2004). Organ ve dokulardaki fazlalıkları veya eksiklikleri hastalıklara yol açar. Metallerin bitkisel infüzyonların farmakolojik özellikleri üzerindeki muhtemel etkilerini bilmek çok önemlidir (Kızıl ve ark., 2010). Enzimler gibi vücudun önemli bileşenleri kimyasal elementlerle yakından ilişkilidir. Elementler, özellikle esansiyel eser elementler, guatrda iyot, anemide demir gibi mineraller hastalıklarla mücadele etmede küratif ve önleyici rol oynarlar. Tedavi edilemez olarak kabul edilen birçok hastalık, bu elementlerin dengesizliğinin insan vücudunda dengelenmesiyle tedavi edilebilir. (Shirin ve ark., 2010). Tıbbi bitkilerin mineral içeriklerinin belirlenmesi, besin içerikleri ve farmakolojik fonksiyonlarını dikkate alarak, tedavi amaçlı kullanılmak üzere önerilen bitki dozlarının tanımlanması açısından oldukça önemlidir.

Bu çalışmada halk arasında tıbbi bitki olarak kullanılan Deve gülünün doğal ortamından farklı vejetasyon dönemlerinde (Haziran-çiçeklenme, Temmuz-meyve, Ağustos-tohum) getirilen örneklerinin, mineral ağır metal, azot ve protein oranları, toplam fenolikleri ve antioksidan kapasitelerinin (FRAP, ORAC, FCR) tespit edilmesi

amaçlanmıştır. Ayrıca *in vitro* ortamda tohum sterilizasyon protokolü oluşturulması, tohum dormansisinin kırılarak çimlenmenin sağlanması, filizlenen bitkinin vejetatif kısımlarını eksplant olarak kullanarak kallus oluşturma, mikroçoğaltım, rejenerasyon ve iklime alıştırmaya çalışmalarının yapılması hedeflenmiştir. Oluşturulan kalluslara farklı oranlarda UV, şeker ve hormon uygulanarak toplam fenolik asitleri ve antioksidan kapasitelerinin (FRAP, ORAC, FCR) miktarları belirlenerek uygulanan yöntemlerin etkisinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Son yıllarda ilaç hammaddesini oluşturacak bitki kimyasallarının araştırılması ve doku kültürü yoluyla üretilmesi çalışmaları artarak devam etmektedir. Bu çalışmalar sayesinde halk hekimliğinde kullanılan ancak üzerinde bilimsel araştırma yapılmamış onlarca bitki literatüre tanıtılmaktadır. Deve gülü bitkisinin fitokimyasal içeriğinin tespiti ve doku kültürü yoluyla üretilmesi çalışmasıyla ülkemiz topraklarında yetişmesine rağmen üzerinde daha önce böyle bir çalışma yapılmamış bu bitkinin, gelecekte kimya, kozmetik, eczacılık, ve tıp alanında *in vitro* arttırılabilir hammadde kaynağı olarak kullanılması çalışmalarına öncülük etmesi hedeflenmiştir. Bu nedenle, ekonomik kullanım ve son ürünlerin performansının arttırılması için Deve gülü bitkisinin kimyasal özelliklerini bilmek önemlidir. Aynı şekilde bitkinin antioksidan kapasite, sekonder metabolitleri, mineral ve protein miktarlarının tespitinin, bitkinin gelecekteki detaylı terapötik karakterizasyon araştırmaları için temel veri niteliğinde bir basamak oluşturacağı düşünülmektedir.

## 2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

### 2.1. Deve gülü

Çalışmada kullanılan Deve gülü (*Alcea kurdica* Schlecht Alef.st.Bot.Zeitschr.12:253. 1862) Malvacea ailesine ait olup, Türkiye, Kuzey Irak, Kuzeybatı İnan'da yayılım gösteren, çok yıllık, otsu bir bitkidir. Ülkemizde Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde yayılım gösteren Deve gülü, vejetasyon dönemini Haziran-Temmuz-Ağustos aylarında tamamlamaktadır. Halk arasında toprak üstü kısımları analjezik ve antiseptik amaçla kullanılmaktadır.

Anadolu'da tıbbi bitkiler olarak kullanılan 1500'e yakın türü olan *Malvacea*, kutuplar dışında dünyaya yayılmış geniş bir bitki ailesidir. *Malvacea* familyası yeleri tek veya çok yıllık otsu, çalı veya ağaçlardır. Yapraklar palmat damarlı, tam ya da palmat loblu, küçük stipulalıdır. Yeryüzünde 80 cins, 1500 kadar tür ile temsil edilir. Hatmi (*Alcea*) türlerine nemli, tuzlu topraklarda, ekilmemiş arazilerde rastlanır. Kurak toprakta yetişenler ise müsilaj bakımından daha zengindir (Tanker ve ark., 2007). Bu familyanın en tanınmış yeleri pamuk (*Gossypium*), bamya (*Hibiscus*) ve iekilik sektöründe ekonomik değere sahip glhatmi (*Alcea rosea* L.)' dir. Yüksek musilaj içeriği nedeniyle Malvacea familyası yeleri mide ve boğaz ağrıları ile öksürük ve astım rahatsızlığı için halk arasında kullanılmaktadır (Uzunhisarcıklı ve Vural, 2012). Malvacea familyası çiçekleri boya sanayinde de kullanılmaktadır. Bu familyaya ait olan *A. rosea*'nın emenagog (adet hızlandırıcı) (Dudek ve ark., 2006), ekspektoran (Shome ve ark., 1992) olarak kullanıldığı bildirilmiştir. *A.rosea* dan izole edilen flavonoidler, farmostik preparatların ham maddesini oluşturmaktadır (Matlawska, 1992). Bu bitki türünden elde edilen antosiyaninlerin anti-enflamatuar ve anti-mikrobiyal etkiye sahip doğal ilaç eldesinde kullanıldıkları bildirilmiştir. (Iauk ve ark., 2003). Malvacea'nın topraküstü kısımları analjezik, diüretik olarak (Elçi ve Erik, 2006), böbrek taşı mesane taşı ve artrit için dekoksasyon şeklinde; haşlanmış yaprakları apse ve kaşıntılı kısımları tedavi etmek için harici olarak 2-3 saat uygulayarak, apsenin olgunlaşmasını desteklemek için dıştan lapa şeklinde kullanılmaktadır (Güner ve ark., 2000).

Malvacea familyasının önemli bir cinsi olan *Alcea*'nın 70'e yakın türü vardır

(Pakravan ve Ghahreman, 2002). *Alcea* narin, soluk sarı, koyu kırmızı kökleri ve grimsi yeşil yaprakları olan narin bir bitkidir. Geleneksel olarak *A. kurdica*, tonsillit, mide ülseri, duodenal ülserler, pnömoni, üriner sistem enfeksiyonları ve alopesi gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için halk arasında kullanılmaktadır (Mati ve de Boer, 2011). Çok yıllık, otsu bir bitki olan Deve gülü, 20-80 cm yükseklikte, dik, tabandan itibaren dallanmış görünümündedir. Gövde çapı 2-7 mm, silindirik, tüysüz veya nadiren seyrek yıldızsı tüylü, taban yaprakları palmatilobat, yaprak sapı 3-10 cm. yıldızsı tüylüdür. Çiçek rengi pembe, beyaz, sarı olabilmektedir Çiçek sapı 5-20 mm ve yıldızsı tüylüdür. 1750-2500 m yükseklerde yayılış gösteren Deve gülü bitkisine kalkerli kayalıklar, yamaçlar, step ve yol kenarında rastlanmaktadır (Uzunhisarcıklı ve Vural, 2012). Deve gülü bitkisinin genel özellikleri Çizelge 2.1' de verilmiştir. Vejetasyon dönemini Haziran-Eylül aylarında tamamlayan bitki halk arasında çeşitli tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır.

Çizelge 2.1. Deve gülü bitkisinin genel özellikleri

Deve gülü bitkisinin genel özellikleri	
Alem:	Plantae (Bitkiler)
Altalem:	Tracheobionta ( Damarlı Bitkiler)
Üstbölüm:	Spermatophyta (Tohumlu Bitkiler)
Bölüm:	Magnoliophyta ( Çiçekli Bitkiler)
Sınıf:	Magnoliopsida- Dicotyledonae (Çift çenekliler)
Alt sınıf:	Dilleniidae
Ordo:	Malvales
Familya:	Malvaceae (Ebegümeçigiller)
Cins:	<i>Alcea</i> (Gülhatmi)
Tür:	<i>Alcea kurdica</i> (Hollyhock-Deve gülü)
Ömür :	çok yıllık
Yapı :	Ot
Yetiştirme ortamı :	Kalkerli kayalıklar, yamaçlar, step, yol kenarı
Habitat :	750-2500m

Çizelge 2.1. Deve gülü bitkisinin genel özellikleri (devam)

Deve gülü bitkisinin genel özellikleri	
Lokalitesi :	C9-Van:Çatak,Eski Konalga köyünün güney yamaçları, step, 38°S-033'1814", 41°91'773, 1961 m, 26.05.2010, MM79
Vejetasyon dönemi :	Haziran-Temmuz-Ağustos
Yöresel adı :	Hero, hiro
Toplanma dönemleri :	Haziran-Temmuz-Ağustos
Kullanılan kısım :	toprak üstü kısımlar
Kullanım amacı :	tedavi (analjezik,antiseptik)
Kullanım şekli:	herbal infüzyon
Endemizm durumu ve yayılışı :	Endemik değil.Türkiye, Kuzey Irak, Batı ve Kuzey-batı İran.

## 2.2.Tıbbi Bitkiler

Bitkilerin tedavi amacıyla kullanımı insanoğlunun tarih sahnesine adım atmasıyla birlikte başlamıştır. 1961 yılında başlayan arkeolojik kazılar sonucu Şanidar mağarasında insan iskeleti yanında bulunan polenler, M.Ö. 50.000 yıllarından kalan Yontma Taş devrine ait kitabeler ve arkeolojik materyaller bitkilerin en az 60.000 yıl öncesine kadar Orta Paleolitik dönemden beri ilaç olarak kullanıldığını göstermektedir (Fabricant ve Farnsworth, 2001).

Günümüzde ise batı tıbbi ürettiği birçok ilacın içine bitkisel kaynaklı hammaddeleri eklemeye devam etmektedir. Yüzyıllar boyu dünya genelinde olduğu gibi Anadolu'da da halk bulunduğu çevrede var olan bitkileri yiyecek içecek, kozmetik ve kimya sanayinin yanısıra tedavi edici olarak da kullanmıştır. Bu gün bile tıbbi bitkilerin halk hekimliğinde kullanımı hemen her ülkede yaygın bir şekilde devam etmektedir. Bitkisel kaynaklara olan talebin son yıllarda artarak devam etmesinin en büyük nedeni, sentetik olarak üretilen ilaçların sözkonusu hastalığı iyileştirirken vücudun farklı organlarına zarar verecek olumsuz etkileri de beraberinde getirmesidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), yaklaşık dünya nüfusunun %80'inin hastalıklardan korunma ve iyileşme amacıyla öncelikle tıbbi bitkilerden faydalandıklarını ve tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin sayısının 20.000 civarında olduğunu bildirmektedir

(Faydaloğlu ve Sürücü, 2011). Çağdaş dünyada teknoloji ve tıptaki gelişmelere rağmen şıfalı bitkilere olan talep gün geçtikçe artarak devam etmektedir.

Ülkemizin yer aldığı coğrafik bölge nedeniyle sahip olduğu muazzam bitkisel zenginlik, şıfalı bitki olarak halk arasında kullanılmasına rağmen bilim insanlarınca henüz araştırılmamış ve fitokimyasal yapısı aydınlatılmamış çok sayıda bitkiyi de beraberinde getirmektedir.

### **2.3. Bitki Doku Kültürleri**

Artan dünya nüfusu beraberinde insanları, çevresindeki canlıları nasıl daha verimli kullanabiliriz sorusuna yanıt aramaya itmiştir. Günümüzden 10 yıllar öncesine kadar modern ıslah yöntemlerinin uygun yetiştirme teknikleri ile kullanılması sonucunda tarımsal verim elde edilebilmiştir. Ancak dünya nüfusundaki hızlı artış karşısında elde edilen verim artışı yetersiz kalmıştır. Klasik bitki ıslahı yöntemleriyle bitkilerin genetik kodlarının değiştirilerek iyileştirilmesi çalışmalarının, istenilen bütün özelliklerin bir genotipte toplanması için yeterli olmadığı sonucunu ortaya çıkarmıştır. Klasik bitki ıslahı çalışmalarının temelinde ürün kalitesi ve miktarının artırılması çalışmaları yer alırken, tarımsal ürün kaybının en önemli sebepleri arasında yer alan hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık kazandırılması her zaman ikinci planda bırakılmıştır. Bitkileri korumak amacıyla kullanılan yüksek maliyetli kimyasalların kalıntıları hem ürün hem de toprak ve suda uzun süre ayrışmadan kaldığı için, insan, hayvan ve çevre sağlığını önemli ölçüde tehdit eder duruma gelmiştir. Kimyasalların kullanımı yüksek maliyeti de beraberinde getirmektedir. Doğadaki genetik çeşitlilikten faydalanan klasik bitki ıslahı çalışmaları oldukça uzun bir zaman periyodunu kapsamaktadır. Bu nedenle bitkilerin tarımsal özelliklerinin iyileştirilmesinde bitki doku kültürleri ve bitki genleri üzerine yapılacak çalışmalar, bitki ıslahının getirdiği zorlukları ortadan kaldıracaktır (Babaoğlu ve ark., 2002).

Bitki doku kültürleri, bütünlüğü bozulmamış bir bitki veya söz konusu bitkinin bir bölümü (eksplantı) kullanılarak steril şartlarda, suni besi ortamı kullanılarak elde edilen kültürlerdir. Bitki hücresinin totipotent potansiyeline ek olarak, hücrelerin metabolizmalarını, büyümelerini ve gelişimlerini değiştirebilecek kapasiteleri de tüm



bitkinin yenilenmesi açısından aynı derecede önemli ve hayati öneme sahiptir. Bitki doku kültür ortamı, bitkilerin normal büyümesi ve gelişimi için gerekli olan tüm besin maddelerini içerir. Temel olarak katı besiyerinde makro besin maddeleri, mikro besinler, vitaminler, diğer organik bileşenler, bitki büyüme düzenleyicileri, karbon kaynağı ve jelleştirici maddelerden oluşur. Murashige ve Skoog ortamı (MS ortamı) çoğu bitki türünün *in vitro* vejetatif yayılımı için en yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ortamın pH'ı, hem bitkilerin büyümesini hem de bitki büyüme düzenleyicilerinin aktivitesini etkileyen önemli bir faktördür, 5.7-5.8 arasındaki değere ayarlanır. Hem katı hem de sıvı ortam kültürleme için kullanılabilir. Ortamın bileşimi, özellikle bitki hormonları ve azot kaynağının, başlangıç eksplantının cevabı üzerinde derin etkileri vardır. Bitki büyüme düzenleyicileri (BBD), kültür ortamındaki bitki hücrelerinin ve dokularının gelişim yolunun belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Oksinler, sitokininler ve gibberellinler en çok kullanılan bitki büyüme düzenleyicileridir. Kullanılan hormonların türü ve konsantrasyonu esas olarak bitkinin türüne, doku veya organına ve deneyin amacına bağlıdır. Oksinler ve sitokininler, bitki doku kültüründe en yaygın olarak kullanılan bitki büyüme düzenleyicileridir ve miktarı, kurulan veya yenilenen kültür türünü belirler. Hem oksin hem de sitokinin dengesi, kallus olarak bilinen farklılaşmamış hücrelerin gelişmesine yol açar.

Bitki doku kültürlerinde kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonudur. Bitki rejenerasyonu genellikle üç alt başlıkta incelenmektedir:

1. Meristematik hücrelerden oluşmuş somatik dokulardan rejenerasyon; bu sistemde uç ve yan meristemlerden bitki çoğaltıldığı için meristem kültürü yoluyla klonal çoğaltım diye adlandırılır. Elde edilen hücreler tamamen donör bitkiye benzer.
2. Meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon: bir bitki eksplantının kesilmiş yüzeyindeki bir kısım somatik hücrenin bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi ile bölünerek ve organize olarak bitkiyi oluşturmasıdır. Bölünen ve organize olan somatik hücreler önce organları daha sonra bitkiyi oluşturursa direkt organogenez, sürekli bölünerek embriyo ve daha sonra da tam bir bitkiyi oluşturursa direkt somatik embriyogenez diye adlandırılır. Eğer her iki durum da belirli bir kallus, proto-kallus veya

hücre süspansiyonu durumundan sonra ortaya çıkarsa indirekt rejenerasyon adını alır.

3. Mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon. Bu durumda donör bitkinin kromozom sayısının yarısına sahip, genellikle steril haploid bitkiler elde edilir (Babaoğlu ve ark., 2002).

### Mikroçoğaltma

“Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen tanesi vb.) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanabilir” (Babaoğlu ve ark., 2002). Mikroçoğaltma, sağlıklı bitki dokularının (eksplant) seçilmesiyle başlar. Sağlıklı ana bitkinin yaprak, apikal meristem, tomurcuk ve kök gibi herhangi bir parçası eksplant olarak kullanılır. Mikroçoğaltım sadece bitkilerden elde edilebilen birçok sekonder metabolitin üretimi için önemli bir teknolojidir, çünkü birçok ikincil bitki metaboliti kimyasal olarak sentezlenemez ve sadece bitkilerden elde edilebilir. Bitki doku kültüründeki ilerlemeler, gelecek kuşaklar için şifalı bitkilerin hızlı çoğalmasını ve sürdürülebilir kullanımını sağlayacaktır. Tüm süreç, aşağıdaki aşamalarla özetlenebilir:

#### i. Donör bitkinin hazırlanması

Ana bitkinin *in vitro* kültürdeki kontaminasyonunu en aza indirmek için optimal koşullar altında bitkinin tohumdan çimlendirilerek *in vitro* yetiştirilmesi başarı olasılığını arttırmaktadır.

#### ii. Başlangıç aşaması

Bu aşamada bir eksplant yüzey sterilizasyonuna tabi tutulur ve besin ortamına aktarılır. Genel olarak sterilizasyon için, bakterisit ve fungusit ürünlerinin kombine uygulaması önerilmektedir. Ürün seçimi, uygulanacak eksplant tipine bağlıdır.

Eksplantın kimyasal çözeltilerdeki yüzey sterilizasyonu, kirletici maddelerin bitki hücrelerine minimum düzeyde zarar vermemesi için önemli bir adımdır. En çok kullanılan dezenfektanlar sodyum hipoklorit, kalsiyum hipoklorit, etanol ve cıva klorürdür. Kùltürler, çoğalma yöntemine göre, iklim odasında ya ışık ya da karanlık koşullar altında inkübe edilir (Husain ve Anis, 2009).

### iii. Çoğaltım aşaması

İstenen (veya planlanan) bitki sayısına ulaşılan kadar tekrarlanan alt kùltürler ile çoğaltılır.

### iv. Köklenme aşaması

Köklendirme aşaması, eksplantların çoğaltılması için kullanılan aynı kùltür ortamında eşzamanlı olarak meydana gelebilir. Bununla birlikte, bazı durumlarda köklenme ve güçlü kök büyümesinin gelişimini indüklemek için besin modifikasyonu ve bitki büyüme düzenleyicileri dâhil olmak üzere medyanın değiştirilmesi gerekir.

### v. İklimlendirme aşaması

Alıştırma, *in vitro* ile *ex vitro* koşullar arasında bir geçiş aşamasıdır ve *in vitro* koşullardaki anormalliklerin alıştırma aşamasında düzeltilerek normal bitki büyümesinin sağlanması gerekir. Bu aşamada, *in vitro* bitkiler kontrollü olarak buldukları laboratuvar şartlarından uzaklaştırılırlar. İklimlendirme yavaş yavaş yüksek nemden düşük neme ve düşük ışık yoğunluğundan yüksek ışık yoğunluğuna doğru yapılır. Bitkiler daha sonra uygun bir substrata aktararak (kum, turba, kompost vb.) serada kademeli olarak alıştırılır.

Bitki hücre sayısında ve hücre hacmindeki artış bitki hücrelerindeki büyümeyi gösterir. Bitki hücre kùltürlerindeki büyüme-zaman grafiği, mikroorganizmalarda olduğu gibi sigmoidal bir eğridir. Bitki doku kùltürlerinde hücre gelişimi beş büyüme fazından oluşarak sigmoidal bir davranış gösterir:

- 1.Lag Faz: Hücrelerin bölünmeye hazırlandığı aşama.
- 2.Log veya üstel Faz: Hızla bölünen hücreler üstsel artışa neden olur.
- 3.Lineer Faz: Hücre sayısında doğrusal artışla birlikte kültürün yaş ve kuru ağırlıklarının arttığı safha.
- 4.Yavaşlama Fazı: Bitki doku kültüründe besin içeriğinin azalması ve hücre atıklarının ortamda birikmesi nedeniyle hücre bölünmesinin aşamalı olarak azalması. (Güven ve Gürsul, 2014).

Gelişmekte olan bir teknoloji olarak, bitki doku kültürü, giderek artan dünya talebini karşılamak için gerekli bitkileri sağlayarak, hem tarım hem de endüstri üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Son zamanlarda tarım bilimlerinin ilerlemesine önemli katkılar sağlamış ve günümüzde modern tarımın önemli bir alanı haline gelmiştir. Biyoteknoloji, emsalsiz bir hızla tarımsal uygulamaya sokulmuştur. Doku kültürü, genetik olarak homojen, hastaliksız bitki materyalinin üretimini ve çoğalmasını sağlar. Literatürde *Deve gülü*'nün doku kültürü ile ilgili çalışmalarına rastlanmamıştır. Bu nedenle *Malvacea* familyasından farklı cinslerin doku kültürü çalışmalarını içeren kaynaklar incelenmiştir. *Deve gülü* ile yapılan bu çalışma doku kültürü çalışması alanında ilk olma özelliğini taşımaktadır.

Jenderek ve ark. (1998), endojen kontaminasyonu ve inatçı sürgün oluşumu nedeniyle mikroçoğaltımı oldukça zor olan *Hibiscus syriacus (Malvacea)*'un farklı eksplantları (kök, hipokotil ve yaprak petiolü) ile doku kültürü çalışması yapmışlardır. McCown's woody plant basal salt medyumu ve 0.5, 1.0, 2.2, 4.4 ve 10 mM TDZ (Thidiazuran) veya 2İP (izopentil adenin) veya BA (Benzi adenin) içeren MS kullanarak eksplantları kültüre almışlardır. Adventif tomurcuklar, TDZ içeren medyumlarda üç farklı eksplant türünde de gözlemlenirken, en bol tomurcuğa sahip kallus oluşumu 1 mM TDZ içeren medyumda kültüre alınan hipokotil eksplantında görülmüştür. Petiol eksplantında kallus oluşturmadan sürgün oluşurken, kök ve hipokotil eksplantlarının %70'i kallus oluşturmadan yaprak oluşturmuştur.

Mujeera ve Balasubramanian (2006), bitki büyüme düzenleyicilerinin *Hibiscus sabdariffa (Malvacea)*'dan elde edilen lif kalitesi ve miktarı üzerine etkilerini incelemek üzere bir çalışma yapmışlardır. Giberellikasit (GAA) ve Naftalan asedik (NAA) asit farklı konsantrasyonlarda denenmiştir. En iyi sonuç GA100+NAA 50µg/ml eklenen

tohumların mahsulünde gözlemlenmiştir. Bu çalışma tekstil endüstrisi için önemli bir lif kaynağı olan Kerkede (*H.sabdariffa*)'den elde edilen fibrillerin kalitesinin artırılması açısından kayda değer bir çalışma olarak kabul edilmektedir.

Sodyum hipoklorit (NaOCl), etanol, cıva klorür (HgCl<sub>2</sub>) ve Tween-20 gibi sterilize edici maddelerin kullanılması, tohum yüzeyi sterilizasyonu için yaygın olarak tavsiye edilir (Ramakrishna ve ark. 1991; Balyeri ve Mbah, 2006). Younesikelaki ve ark. (2016), *Althaea officinalis* (Malvaceae)'in tohumlarını *in vitro* çimlendirmek için üç farklı yöntem denemişlerdir:

- 1) Sterilize distile su Kontrol olarak 20 dakika;
- 2) 0.1, 0.2, 0.3 HgCl<sub>2</sub> (w / v) 1, 3, 5, 7 dakika;
- 3) % 70 etanol + 100 µL tween-20, 5 ve 10 dakika,

% 4 NaOCl (w/v) 5 ve 10 dakika olacak şekilde tohumlara uygulamışlardır. Maksimum kontaminasyon kontrol grubunda gözlenirken, minimum kontaminasyon 10 dakika %4 NaOCl de bekletilen tohumlarda görülmüştür.

Özyiğit ve ark., (2007) pamuk (*Gossypium hirsutum* L. (Malvacea)) doku kültüründe eksplant yaşı ile total fenolik içeriği ve rejenerasyon cevabı arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Kültüre aldıkları (*G. hirsutum* L) var. Nazilli 84S pamuk kök, hipokotil, kotiledon ve yaprak eksplantlarını çimlenmenin 7., 14., 21. ve 28. günlerinde toplam fenol içeriği bakımından değerlendirmişlerdir. Eksplant yaşına ve total fenol içeriğine göre farklı rejenerasyon oranları tespit etmişlerdir. Rejenere sürgünler daha sonra 1 mg/l indol-3-bütirik asit (IBA) içeren Woody Plant Medium (WPM)'da köklendirilmiştir. Yapılan çalışmada en düşük fenol miktarı çimlenmeden sonraki ilk 7 günde görülmüştür. Total fenol miktarının köklerde 7-28. günler ve yapraklarda 14-28. günler arasında sürekli artarken hipokotil, kotiledon ve MS medyada ise 7-21. günler arasında artış gösterip 21. günden sonra düştüğü gözlemlenmiştir. Hücre bölünmesinin en fazla görüldüğü germinasyonun ilk 3 haftasında solunumun arttığı dolayısıyla fenol miktarının da artış gösterdiği sonucuna varmışlardır. 3. haftadan sonra fenol miktarının ilk günlere göre ciddi miktarda azaldığını tespit etmişlerdir.

Raoul ve ark. (2010), *Hibiscus sabdariffa* (Malvacea) ile kallus indüksiyonu ve somatik embriyogenezis üzerine önemli bir çalışma gerçekleştirmiştir. Yaptıkları çalışmada doku kültürü için iki farklı genotip (*Hibiscus sabdariffa* var. *sabdariffa* ve

*Hibiscus sabdariffa* var. *altissima*), üç farklı konsantrasyonda (%1, %2, %3), iki şeker (sakkaroz ve glukoz) ve üç eksplant tipi (kök, hipokotil, kotiledon) kullanmışlardır. Hipokotil ve kotiledondan kallus ve somatik embriyo oluşumu için MS besi ortamında ve Driver ve Kuniyuki (DKW) besi ortamında BBD'lerinin farklı kombinasyonlarını denemişlerdir. Her iki genotip için de bütün eksplant tiplerinde kullanılan şeker ve BBD'lerin tüm konsantrasyonlarında kallus oluşumu gözlenmiştir. Kallus için en başarılı sonuç %3 sakkaroz içeren hipokotil ve kotiledon eksplantlarında görülürken somatik embriyo için ise 4 mg/l 2.4-D+1 mg/l TDZ ve 1 mg/l 2.4-D+0,5 mg/l TDZ içeren DKW medyumunda görülmüştür.

Mubashrah ve ark., (2012) *Alcea rosea* (Malvacea) kotiledon eksplantlarını kullanarak organogenez ve kallus oluşumu için protokol oluşturmaya çalışmışlardır. IAA, NAA, 2-4 D, IBA, BAP ve Kinetin gibi oksin ve sitokininleri tek başına veya kombinasyon halinde kullanarak kallus kalitesini incelemişlerdir. Tek başına kullanılan oksinler arasında en iyi sonuç 0.03 mg/l 2.4-D'nin eklenmesinden 10 gün sonra tesbit edilmiştir. Tek başına kullanılan sitokininler içinde ise 8 mg/l ve 10 mg/l BAP kullanımından sonra en iyi sonuç belirlenmiştir.

Samanthi ve ark. (2013), Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L. (Malvacea)) bitkisinin yaprak eksplantlarından *in vitro* sürgün rejenerasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada *Hibiscus cannabinus* L.'nin V36 ve G4 varyetelerinden alınan yaprak eksplantları, N6 Benzyl adenine (BA) ve Indole-3-butyric acid (IBA)'in üç farklı kombinasyonu ile muamele edilmiştir. En fazla sağlıklı kallus yüzdesi 1.5 mg/l BA ve 0.5 mg/l IBA eklenmiş MS besi ortamında görülmüştür. Aynı şekilde 0.3 mg/l GA<sub>3</sub> eklenmiş MS ortamında da % 68.7 oranında bitki rejenerasyonu gözlemlenmiştir. BBD siz besiyerinde büyütülen bütün bitkilerin köklendiği kaydedilmiştir. Kallus indüksiyonu (kallus sayısı) ve bitki rejenerasyonu bakımından varyeteler arasında anlamlı bir farkın olmadığı belirtilmiştir.

#### **2.4. Bitki Sekonder Metabolitleri**

Zengin bitki çeşitliliği nedeniyle ülkemiz, gelişmiş ülkelerin bitkisel hammaddeye dayalı gıda, kimya, ilaç v.b gibi birçok alanına da kaynak sağlamaktadır.

Bu bitkiler doğal şifa kaynağı olarak organik asitler, antioksidan maddeler, polifenoller, vitaminler ve mineraller gibi bazı temel bileşikler içerir. Bitkiler primer ve sekonder metabolitler olarak iki çeşit temel kimyasal sentezler. Primer metabolitler vitaminler, proteinler, yağlar, karbonhidratlar ve mineraller gibi bitki metabolizmasında oluşan ve metabolik faaliyetlerde kullanılan maddelerdir. Organların işlevlerini destekleyerek vücudun savunma gücünü artırır ve iyileşmeyi hızlandırır. ADP, ATP ve diğer nükleotid trifosfatlar ile enerji transferi; proton ve elektron alıcıları; glikoliz ve sitrik asit döngüleri; solunum zinciri; karbonhidrat döngüsü; enzim tepkimeleri; lipid, nükleotid biyosentezi gibi hücrenin canlılığını sürdürebilmesi için gereken tüm metabolik yollar birincil metabolizmanın ana unsurlarıdır. Birincil metabolizmadaki tüm temel metabolik süreçler, hücre bileşenlerinin enerji üretimi ve büyüme sırasındaki dönüşümleriyle ilgilidir. İkincil metabolizmada ise bitki savunmasından sorumlu bileşenler üretilir. Sekonder metabolitler alkaloidler, izoprenoidler/terpenler, kauçuk benzeri polimerler/poliizoprenler, fenolik bileşikler, ender aminoasitler, bitki aminleri ve glikozitler olarak sınıflandırılabilir (Güven ve Gürsul, 2014). Bunlar, bitkiyi büyüme ortamındaki değişikliklerden koruyarak bitki gelişimine yardımcı olan metabolik aktiviteleri etkileyen sinyal fonksiyonlarına sahip karmaşık kimyasal maddelerdir. Çizelge 2.2’de bitki hücre kültürleri tarafından üretilen ve ekonomik değeri yüksek bazı sekonder metabolitler verilmiştir.

Sekonder metabolitler, bitkisel yaşamın olmazsa olmazı değildir ancak bitkilerin hayat siklusu içinde karşılaşılabilecekleri, optimum yaşam şartlarının dışında kalan ve kendilerini savunmayı gerektiren her durumda (kuraklık, tuzluluk, herbisit, vb.) üretilen organik bileşiklerdir (Güven ve Knorr 2011). Sekonder metabolizmanın stres koşullarında ortaya çıkıyor olması bitkiler açısından olumsuzluk gibi görünse de sekonder metabolit üretimini teşvik ettiği için pozitif etki olarak algılanmaktadır.

Çizelge 2.2. Bitki hücre kültürleri tarafından üretilen ve ekonomik değeri yüksek bazı sekonder metabolitler (Sökmen, 2001).

<b>Kimyasal Sınıf</b>	<b>Metabolitin adı</b>	<b>Elde edildiği bitki</b>
Tropan alkaloidleri	Atropin	<i>Atropa bellodina</i>
İndol alkaloidleri	Aymalisin, Vinblastin	<i>Catharanthus roseus</i>
Kinolin alkaloidleri	Kinin, Kinidin,	<i>Cinchona ledgeriana</i>
İzokinolin alkaloidleri	Kodein, Morfin	<i>Papaver somniferum</i>
Fenilpropanoidler	Antosiyaninler	<i>Daucus carota</i>
İzoprenoidler	Piretrin, Yasmolin Digoksin, Digitoksin	<i>C. cinerariaefolium</i> <i>Digitalis lanata</i> ve <i>Digitalis purpurea</i>
Terpenoidler	Saponinler	<i>Ginseng panax</i>

## 2.4. Sekonder Metabolitlerin Sınıflandırılması

Sekonder metabolitler, kimyasal yapılarına (halkaya sahip olmasına veya şeker içermesine), bileşimine (azot içerip içermemesine), çeşitli çözücülerdeki çözünürlüklerine veya sentezlendiği metabolik yola göre sınıflandırılırlar (Harborne ve Williams, 2000). Üç büyük molekül ailesi genel olarak kabul edilir: Terpenler, Azotlu Bileşikler (Alkaloidler) ve Fenolik Bileşikler (Bourgaud ve ark., 2001).

### 2.4.1. Terpenler

Bitki sekonder metabolitlerinin en geniş sınıfını oluşturan terpenler, asetil-CoA veya glikolitik yol üzerinden sentezlenirler. Genellikle suda çözünmezler. Beş karbonlu izopren birimlerinin birleşmesiyle oluşurlar. Bazı terpenler büyüme ve gelişmede önemli rol oynarlar. Örneğin büyüme hormonlarının önemli bir grubunu oluşturan giberellinler diterpendir. Terpenler toksik olmaları nedeniyle bitki ile beslenen canlılara karşı bitki savunmasında görev alırlar. Birçok bitki türü kendine has kokusu olan uçucu yağ veya eterik yağ olarak bilinen mono ve seskiterpen karışımı molekülleri sentezler (Taiz ve Zaiger, 2008). Terpenler, aynı zamanda önemli kimyasallar olan ve farklı bitki kısımlarından elde edilen, uçucu ya da eterik yağlar olarak da adlandırılan esansiyel yağları oluşturur. Uçucu yağlar gıda muhafaza, aromaterapi ve koku endüstrisinde kullanılmaktadır. Doğada, uçucu yağların bitkileri korumada önemli bir rolü vardır. Antibakteriyel ajanlar, antiviraller, antifungaller ve böcek öldürücüler olarak ve ayrıca herbivorların etkisine karşı hizmet ederler. Bazen polenlerin yayılmasına yardımcı olan



veya diğ er istenmeyen böcekleri kovan böcekleri ç ekerler. Sıvı, uçucu, saydam, nadiren renkli, organik ç özücülerde ç özünür ve sudan daha düşük yoğunlukludurlar. Tomurcuklar, çiçekler, yapraklar, saplar, tohumlar, meyveler, kökler ve kabuklar gibi bitkinin tüm organları tarafından sentezlenir ve salgı hücreleri, boşluklar, kanallar, epidermal hücreler ve salgı trikomlarında depolanırlar (Nunes ve ark., 2012). Ç izelge 2.2’de terpen ç eşıtleri ve örnekleri verilmiştir.

Ç izelge 2. 3. Terpen ç eşıtleri ve örnekleri

TERPENLER	
Terpen sınıfı	Örnek
Monoterpen	Mentol
Seskiterpen	Limonen
Diterpen	Taksol
Triterpen	Digitanin
Tetraterpenler	Karoten
Politerpenler	Dolikol

#### 2.4.2. Alkaloidler

Alkaloidler farmakolojik olarak aktif, azot içeren bitki kökenli temel bileşikler olarak tanımlanır. İyon kanallarını ve nörotransmisyonu engelleyebilir, enzimleri inhibe edebilir, halüsinasyon, koordinasyon kaybı, kasılma, kusma ve ölüme neden olabilirler. Genellikle bitkilerin yapısında malik, tartarik, sitrik, limonik vb. asitlerle tuzlar şeklinde bulunur. Alkaloid tuzları; beyaz, kristalik, suda iyi ç özünen, organik ç özücülerde iyi ç özünmeyen veya az ç özünen maddelerdir. Azot taşımaları nedeniyle bitkilerde azot kaynağı olarak kullanılırlar. Ot yiyen hayvanlara karşı bitkileri korurlar. Organik asitlerle bağ yaparak oluşturdukları tuzlar sayesinde hücrenin pH ve iyon dengesini düzenlerler (Mammadov, 2014). Alkaloidler, karbon, hidrojen ve azota ek olarak, oksijen, kükürt, nadiren klor, brom ve fosfor gibi diğ er elementleri de içerebilir. Ç izelge 2.3.’de başlıca alkaloid tipleri, amino asit öncülleri ve her bir tipin iyi bilinen örnekleri verilmiştir.

Çizelge 2. 4. Başlıca alkaloid tipleri, amino asit öncülleri ve her bir tipin iyi bilinen örnekleri (Taiz ve Zaiger, 2008).

Alkaloid sınıfı	Biyosentetik öncül	Örnekler	Yararlanma şekilleri
Pirolidin	Ornitin( aspartat)	Nikotin	Uyarıcı, sakinleştirici,yatıştırıcı
Tropan	Ornitin	Atropin	Bağırsak spazmlarını önleyici,panzehir, gözbebeği büyütücü
		Kokain	Merkezi sinir sistemi uyarıcı, lokal anestetik
Piperidin	Lizin	Koniin	Zehir (motor nöronları felç etme)
Pirolizidin	Ornitin	Retrorsin	İnsanlara yönelik yararlanma şekli bulunmamaktadır.
Kinolizidin	Lizin	Lupinin	Kalp atışının düzenlenmesi
İndol	Triptofan	Psilosibin	Halisünasyon yapıcı
		Rezerpin	Yüksek tansiyon tedavisi,psikoz tedavisi
		Striknin	Uyarıcı, sakinleştirici
İzokinolin	Tirozin	Kodein	Analjezik(ağrı kesici), öksürük tedavisi

### 2.4.3. Fenolik bileşikler

Fenolik bileşikler sentez edildikleri dokuları boyarlar ayrıca sebze ve meyvelerin kendine özgü buruk tadını ve rengini verirler. Bir kısım fenolikler sadece organik çözücülerde çözünürken, bir başka grubu karboksilik asit ve glikolizitleri sayesinde suda çözünebilir. Üçüncü grup fenolikler ise büyük polimerlerdir ve suda çözünmezler. Fenolik bileşikler bitkilerde yüksek konsantrasyonda bulunarak antioksidan aktiviteye neden olabilir (Laporinik ve ark., 2005).

Hidrojen veya elektron vererek reaktif oksijen türleri (ROS) gibi serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahiptirler (Fernandez-Pachon ve ark., 2006). Fenolik

bileşiklerin antioksidan aktivitesi temel olarak serbest radikallerin adsorbe edilmesinde ve nötürleştirilmesinde, singlet ve üçlü oksijenin söndürülmesinde veya peroksitlerin ayrıştırılmasında önemli bir rol oynayabilen redoks özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Rice ve ark., 1995).

Bitki fenolikleri hücre duvarı komponentleri arasında moleküler köprüler oluşturarak hücre duvarına sertlik kazandırmaktadır. Lignin ve fitoaleksinin öncülleridir. Mikroorganizmaların parçalanması sonucu toprağın nitrojen ve humus içeriğini etkilerler. Işığın etkisiyle kloroplastlarda sentezlenerek vakuollerde depolanırlar. Bir kısmı da sekonder hücre duvarında ligninleri oluşturur. Işık sentezlerini etkilediği için ilkbahar yapraklarında sonbahardakine oranla daha fazla fenolik içerik bulunur. Sinamik asit, kumarin ve naringenin gibi fenoliklerin derivatları büyümeyi inhibe etme özelliğindedirler. Bazı bitkilerde fenolik derivatlar allelopatik özellik taşıyor (örn. *Salix rubra* ve *Salix viminalis* in ürettiği naringenin derivatı izosalipurposid gibi). Tütün bitkisinde ise kendi ürettiği fenolikler tohuma sızdığı zaman çimlenmeyi inhibe edebilmektedir. Aynı şekilde farklı bitkilerde herbisit olarak etki gösterebilen fenolikler de vardır. Bitki kök sisteminden atıldıklarında, komşu rizosferde inhibitör büyüme işlevi göstererek toprağın bakteri florasını etkilerler (Kefeli ve ark., 2003). Çizelge 2.5’de fenolik bileşikler verilmiştir.

Çizelge 2.5. Fenolik bileşikler

SINIFLANDIRMA	SPESİFİK BİLEŞİK
<b>Flavonoid Bileşikler (polifenoller)</b>	
Flavonoller (Flavon-3-oller)	Kampferol, kuersetin
Flavonlar	Apigenin, luteolin
Flavanonlar	Naringenin, hesperedin
Flavanoller	Kateşinler, gallokateşinler
Antosiyanidinler	Pelargonidinler, siyanidin, malvidin
Kondanse tanenler veya proantosiyanidinler	Trimerik prosiyanidinler
İsoflavonlar	Daidzein, genistein, glycitein
Hidroksisinnamik asitler	Kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit

Çizelge 2.5. Fenolik bileşikler (devam)

SINIFLANDIRMA	SPESİFİK BİLEŞİK
<b>Flavonoid olmayan Fenolik bileşikler (Fenolik Asitler)</b>	
Benzoik asitler	Gallik asit, para-hidroksi benzoik asit
Hidroksisnnamik asitler	Kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit
Hidrolize tanenler	Pentagalloyilglukoz
Ligninler	

## 2.5. Serbest Radikaller (ROS) ve Oksidatif Hasar

Canlılar hayatsal faaliyetlerin sürdürebilmek için glukolizis ile organik moleküllerin parçalanması sonucu oluşan enerjiyi kullanırlar. Oksijen metabolizması hücreler tarafından potansiyel olarak zararlı reaktif oksijen türleri (ROS) üretir. Hücrede artan ROS/RNS seviyeleri, bozuk hücre işlevine, yaşlanmaya ya da hastalığa yol açmaktadır. Fizyolojik koşullar altında, oksitleyici ajanlar ve antioksidan savunmaları dengededir. Canlı hücreler, katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon gibi enzimleri ve C ve E gibi enzim olmayan antioksidan savunma moleküllerini üretebilir veya dışarıdan alabilir. Serbest radikallerin üretimi, canlı bir sistemin antioksidan kapasitesini aşarsa, bu reaktif oksijen ve azot türleri lipitler, proteinler ve DNA ile reaksiyona girerek hücrenin enzimleri ve genetik malzemesinde yapısal ve fonksiyonel hasara neden olabilir (Nunes ve ark., 2012). Oksitleyicilerin baskınlığı ve sonuçta ortaya çıkan hasar oksidatif stres olarak adlandırılır (Magder, 2006). Canlı organizmalarda, serbest radikallerin ve diğer reaktif türlerin seviyeleri, biyomoleküllere olan oksidatif hasarı tam olarak ortadan kaldırmaya da minimize eden kompleks bir antioksidan savunma mekanizması ile kontrol edilir. Oksidant-antioksidant dengesinin reaktif türler lehine işlemesi sonucu oksidatif hasar seviyeleri yükselerek bazı kronik hastalıklarda doku harabiyetine neden olur (Halliwell, 2001).

Reaktif oksijen türleri (ROS) arasında hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hipokloröz asit (HOCl), ozon ( $O_3$ ) tekli oksijen ( $^1O_2$ ), süper oksit anyon radikalleri ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksil

radikal türleri ( $\bullet\text{OH}$ ), nitrik oksit (NO) ve azot dioksit ( $\text{NO}_2$ ) gibi reaktif azot türleri de vardır (Magder, 2006).

### Serbest radikallerin üretilmesi

Serbest radikaller, kendilerini nötralize etmek için diğer maddelerden elektronları yakalamalarına neden olan eşleşmemiş bir elektrona sahiptirler. İlk saldırı serbest radikalın nötralize edilmesine neden olsa da, işlemde bir başka serbest radikal oluşur ve bu da zincirleme bir reaksiyon oluşmasına neden olur. Müteakip serbest radikaller devre dışı bırakılmaya kadar, ilk reaksiyonun saniyelerinde binlerce serbest radikal reaksiyonu meydana gelebilir. Oksijen, genellikle serbest radikal veya reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan potansiyel olarak zarar veren moleküllerin bir parçası haline gelebilen yüksek derecede reaktif bir atomdur.

$\text{O}_2$ 'nin redüksiyona uğradığı ardışık tek değerlikli işlemde, süperoksit ( $\text{O}_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve aşırı reaktif hidroksi radikal ( $\bullet\text{OH}$ ) gibi birçok reaktif ara madde oluşur. İşlem “Eş.2.1” de gösterildiği şekilde temsil edilebilir:



Hücreye alınan  $\text{O}_2$ 'nin yaklaşık %5'i, süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi ROS'a dönüştürülür. Aerobik koşullar altındaki hücreler, ROS'un saldırısıyla her zaman tehdit altında olmasına rağmen, hücrenin oldukça güçlü antioksidan sistemleri sayesinde, etkisiz hale getirilir. SOD (Süper Oksit Dismutaz), GPx (Glutasyon Peroksidaz) GR (Glutasyon Redüktaz), CAT (Catalaz), vb., gibi antioksidan enzimler, askorbik asit, tokoferoller ve tokotrienoller, karotenoidler, glutasyon ve lipoik asit gibi besin türevli antioksidanlar, ferritin, laktoferrin, albümin, ve seruloplazmin gibi metal bağlayıcı proteinler ve çok sayıda bitki fenolikleri gibi antioksidanlar, ROS u etkisiz hale getirmektedir (Shovan, 2017).

## 2.6. Antioksidanlar

Okside edilebilir substratların konsantrasyonlarıyla karşılaştırıldığında düşük miktarlarda bile söz konusu substratın oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen herhangi bir madde biyolojik antioksidan olarak tanımlanır (Halliwell, 2001). Bir antioksidan, diğer moleküllerin oksidasyonunu inhibe eden bir moleküldür. Oksidasyon, elektron kaybını veya bir artışı içeren kimyasal bir reaksiyondur. Yükseltgenme reaksiyonları serbest radikallere neden olabilir. Antioksidanlar serbest radikale elektronlarını vererek kendilerini okside ederken, serbest radikali kararlı hale getirerek oksidasyon reaksiyonlarını inhibe eder (Shovan, 2017). Antioksidanlar, serbest radikallerin saldırısına bağlı patolojilere karşı organizmanın savunma mekanizmasından sorumludur, bu nedenle, bitki kaynaklı antioksidanların alınması, kanser, Parkinson, Alzheimer veya ateroskleroz gibi oksidatif stresin neden olduğu dejeneratif hastalıkların önlenmesinde rol oynar (Pisoschi ve Negulescu, 2012).

Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize etmek için etkileşimli ve sinerjik olarak çalışan, endojen ve eksojen kökenli çeşitli bileşenleri içerir (Percival, 1998).

Bu bileşenler şunları içerir:

### a. Endojen Antioksidanlar

- Bilirubin
- Tioller, örneğin, glutation, lipoik asit, N-asetil sistein
- NADPH ve NADH
- Ubiquinone (koenzim Q10)
- Ürik asit
- Enzimler: Bakır/çinko ve manganez bağımlı süperoksit dismutaz, demir bağımlı katalaz, Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz

### b. Diyet antioksidanları

- C vitamini
- E vitamini
- Beta karoten ve diğer karotenoidler ve oksikarotenoidler, örneğin, likopen ve lutein
- Polifenoller, örneğin flavonoidler, flavonlar, flavonoller ve proantosiyanidinler

c. Metal bağlayıcı proteinler

- Albumin (bakır)
- Seruloplazmin (bakır)
- Metallothionein (bakır)
- Ferritin (demir)
- Miyogloblin (demir)
- Transferrin (demir)

## 2.7. Serbest Radikal Toplayıcılar Olarak Fenolikler

Fenolik bileşikler, sahip oldukları hidroksil gruplarında içerdikleri bir hidrojen atomunu veya bir elektronu bir serbest radikale bağlama yeteneğine sahiptir (Dai ve Mumper, 2010). Bir hidrojen atomunun hızlı bir şekilde radikallere (R): R ile bağlanmasıyla lipidlerin ve diğer moleküllerin oksidasyonuna müdahale ederler (Eş 2.2).



Fenoksi radikal ara ürünleri (PO), rezonansa bağlı olarak nispeten stabildir ve bu nedenle yeni bir zincir reaksiyonu kolaylıkla başlatılmaz. Fenolik maddeler, benzen halkasındaki çift bağları nedeniyle rezonans özelliği kazanmaktadır. ROS'la karşılaştıklarında, radikali kararlı hale getirmek için kendi elektronlarını verirler. radikal stabil hale geçince bu kez kendileri kararsız duruma düşebilirler. Ancak halkasal yapıya sahip oldukları (benzen) ve bu yapının içinde de çift bağları olduğu için tek kalan elektronlarını benzen halkası içinde dolaştırarak kendilerini kararlı hale getirirler.

Meyve ve sebze alımı ile kardiyovasküler hastalıklar, kanser veya osteoporoz gibi oksidatif stres ile ilişkili hastalıklar arasındaki ters ilişki, kısmen fenoliklere atfedilmiştir (Dai ve Mumper, 2010). Cotelle (2001), Fenolik bileşiklerin antioksidan özelliğinin aşağıdaki mekanizmalarla işlerlik gösterebileceğini belirtmiştir:

- (1) ROS / RNS gibi radikal türleri temizleyerek,
- (2) bazı enzimleri inhibe ederek veya serbest radikal üretiminde rol oynayan metalleri şelatlayıp ROS / RNS oluşumunu baskılayarak;
- (3) antioksidan savunmayı arttırarak.

## **2.8. HAT (Hidrojen Atom Transferi) ve ET (Elektron Transferi) yöntemleri**

Bitkilerin toplam antioksidan kapasitesinin (TAC; Total Antioxidant Capacity), belirlenmesinde hidrojen atomu transferi (HAT) ve elektron transferi (ET) reaksiyonlarına dayanan yöntemler kullanılmaktadır (Huang ve ark.,2005). Oksijen radikal absorban kapasitesi (ORAC: Oxygen Radical Absorbans Capacity), Folin-Ciocalteu antioksidan kapasite deneyi (F-C analizi veya toplam fenolik deneyi) ve ferrik iyon azaltıcı antioksidan güç (FRAP) gibi çeşitli antioksidan analizler, bitkilerden alınan fenolik örneklerin antioksidan kapasitesinin nicelleştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

ET temelli deneylerde, antioksidanın (substratın) indirgeme gücü ölçülürken, HAT temelli deneylerde ise antioksidanın (substratın) hidrojen verebilme gücü ölçülür. ORAC gibi HAT temelli deneylerde substratın (antioksidanın), lipid peroksidasyonu radikal zincirlerini hidrojen vererek kırma kapasitesi ölçülmektedir. Bu analizler, serbest radikalleri hidrojen atomu vererek kararlı hale getiren bir antioksidanın kapasitesini ölçer. HAT-temelli analizlerin çoğunluğu, antioksidan ve substratın, azo bileşiklerinin ayrışmasıyla termal olarak üretilen peroksil radikalleri için yarıştığı bir rekabetçi reaksiyon şemasını içerir (Huang ve ark., 2005). ET temelli yöntemlerde kullanılan proplar oksidan özellik taşımaktadır. Ortama eklenen bitkisel kaynaklı antioksidanlar proba elektron vererek, probda renk değişimine neden olur. Antioksidan kapasitesine bağlı olarak renk değişmektedir. F-C ve FRAP testi, ET bazlı analizlerdir. Bu deneyler, azaltılarak renk değiştiren bir oksidan probun azaltılmasında bir antioksidanın kapasitesini ölçer (Awika ve ark., 2003) Sonuçlar ise Trolox eşdeğeri (TE) veya gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilir.

### **2.8.1. Orac (oxygen radical absorbans capacity; oksijen radikal absorban kapasitesi)**

HAT-temelli analizlerin bir örneği olarak ORAC testi (Cao ve ark., 1995), 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorürün (AAPH) ayrışmasıyla üretilen peroksil radikalleri için örnek antioksidan ile rekabet etmek üzere bir biyolojik flüoresan prob



(örn., Flüoresin) kullanır. Öncelikle termal bozunmayla AAPH, peroksi radikallerine dönüşür. Ortama eklenen flüoresanın peroksil radikaliyle reaksiyona girmesinin ardından ölçüm yapılır. Daha sonra antioksidan içeren bitki ekstraları AAPH ve flouresin içeren ortama eklendiğinde bitkisel antioksidanlar peroksil radikallerine H<sup>+</sup> vererek kararlı hale gelmesini sağlar. Böylece kararlı hale gelen peroksil radikalının floresin proteinine bağlanması engellenmiş olur. Floresan yoğunluğu, fizyolojik koşullarda (pH 7.4, 37°C) her dakika ölçülür ve floresan bozunmasının kinetik bir eğrisi elde edilir. Boşluğun AUC (AUC; Area Under the Curve) 'sinin veya numunenin TAC'sinin (örn., Trolox) ve numunenin TAC'sinin çıkarılmasıyla hesaplanan eğri altındaki net alan (AUC), standart bir eğriye dayanan Trolox eşdeğeri olarak hesaplanır (Huang ve ark., 2005). ORAC yönteminin biyolojik sistemlerde fenollerin antioksidan aktivitesini diğer yöntemlerden daha iyi taklit ettiği düşünülmektedir, çünkü biyolojik olarak ilgili serbest radikalleri kullanır ve antioksidanların hem zaman hem de aktivite derecesini entegre eder (Ou ve ark., 2002). Bununla birlikte, yöntem genellikle pahalı ekipman kullanımını gerektirir ve genellikle zaman alıcı bir süreçtir. ORAC yöntemi ile peroksil radikallerine karşı hidrofilik ve lipofilik zincir kırma antioksidan gücü doğrudan ölçülebilmektedir (Wu ve ark., 2004). Bu yöntemle, su ve lipitte çözünebilir maddeler ile reaksiyon verebilen ve biyolojik sistemlerde en fazla bulunan radikal olan peroksil tarafından oluşturulan oksidasyonun, antioksidan tarafından engellenmesi, flüoresan yoğunluğundaki azalma ile belirlenmektedir (Albayrak ve ark., 2010).

### **2.8.2. FRAP (ferric reducing ability of plasma; demir III iyonu indirgeyici antioksidan gücü yöntemi )**

FRAP testi, pH 3.6 gibi asidik pH'da suda çözünebilir antioksidanların ferrik demirli redüksiyon kapasitesini ölçer (Pulido ve ark., 2000). Ortamda düşük miktarlarda bulunan Fe(III) ve tripiridiltriazin (TPTZ) reaksiyona girerek [Fe(III)-TPTZ] kompleksini oluşturur. Bu kompleks daha sonra ortama eklenen antioksidanların etkisiyle Fe(II)-tripiridiltriazin [Fe(II)-TPTZ] kompleksine indirgenmektedir. Sonuçta 593 nm'de absorban veren koyu mavi renkli Fe(II)-TPTZ kompleksi oluşmaktadır (Okan ve ark., 2013). Bu deneyde, test çözeltisinin sarı rengi, antioksidan numunelerin

indirgeme gücüne bağlı olarak çeşitli yeşil ve mavi tonlarına dönüşür. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi, potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesi olarak görev yapabilir. Antioksidan numunelerdeki antioksidan maddeler gibi indirgeyicilerin varlığı,  $Fe^{3+}$ / ferrisiyanit kompleksinin demir forma indirgenmesine neden olur.  $Fe^{2+}$ 'nın liganda bağlanması çok yoğun lacivert bir renk oluşturur. Renk değişimi durduğunda reaksiyon tamamlanır. Renk değişiminin derecesi, antioksidan konsantrasyonuyla orantılıdır. Emilim azaltılan demir miktarını test etmek için ölçülebilir ve antioksidan miktarı ile korelasyon kurulur. Referans olarak Trolox (Pellegrini ve ark., 2003) veya askorbik asit (Gil ve ark., 2003) kullanılır.

### 2.8.3.Folin-Ciocalteu (F-C ) ayırıcı ile toplam fenolik analizi

F-C analizi, yaklaşık 760 nm'de spektroskopik olarak belirlenen mavi bileşikler oluşturmak için alkalın ortamda fenolik bileşiklerden fosfomolibdik ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) ve fosfotungstik ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) asit komplekslerine elektronların aktarılmasına dayanır. Singleton ve ark. (1999), tarafından geliştirilen bu metotla antioksidanların toplam fenol miktarı ölçülmektedir. Gallik asit, karşılaştırma standardı olarak yaygın bir şekilde kullanılır. Gallik asidin yerine ferrulik asit, vanilik asit, protokateşik asit, klorojenik ve tannik asitler de kullanılmaktadır. Engelleyici etkiler, numune alkalın hale getirildikten sonra F-C reaktifi ve/veya hava oksidasyonu ile rekabet eden oksidantlara bağlı olabilir. Bu nedenle F-C reaktifi alkali numuneden önce eklenir. Katkı maddeleri, beklenmedik fenollerden, aromatik aminlerden, yüksek şeker seviyelerinden veya örneklerde askorbik asitten meydana gelir. Katkı etkileri, alkali eklenmeden önce veya bilinen bir enterferansın daha spesifik bir analizi ile ölçülebilir ve daha sonra F-C değerinden çıkarılabilir (Dai ve Mumper, 2010).

Kalibrasyon eğrisi için standart olarak gallik asit kullanılır. Toplam fenolik içeriği mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilir. FCR deneyinde "Eş 2.3" deki hesaplamalar kullanılır:

$$C = (c \times V)/m \quad (2.3)$$

C = GAE'de fenolik bileşiklerin toplam içeriği, mg/g bitki ekstresi;

c = Kalibrasyon eğrisinden oluşturulan gallik asit konsantrasyonu, mg/ml;

V = ekstraktın hacmi, ml;

m = saf bitki metanolik ekstraktının ağırlığı, g.

Dogan ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, bazı tıbbi bitkilerin a-tokoferol,  $\beta$ -karoten, ferulik asit ve gallik asit gibi antioksidan içerikler ve toplam fenolik ve protein içeriklerini sırasıyla Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve UV-görünür spektrofotometre ile belirlemişlerdir. Bitki türlerine göre antioksidan, fenolik ve bitki proteinlerinin içeriklerinin değiştiği, en fazla a-tokoferol,  $\beta$ -karoten, ferulik asit ve gallik asit içeriğine sahip olan bitkilerin sırasıyla *Rosmarinus officinalis* L., *Mentha piperita* L., *Mentha piperita* L. ve *Equisetum hyemale* L. olduğu sonucuna varmışlardır. Genel olarak, incelenen bitkiler arasında en yüksek antioksidan içeriğe sahip olan bitkinin ise *E. hyemale* L. olduğunu bildirmişlerdir.

Bouayed ve ark. (2007), İran 'ın Hamadan bölgesinde halk hekimliğinde kullanılan 5 tıbbi bitki olan *Deve gülü* (*Malvaceae*) ve *Stachys lavandulifolium* (*Lamiaceae*)'un çiçeklerini, *Valeriana officinalis* (*Valerianaceae*)'in köklerini, *Lavandula officinalis* (*Lamiaceae*) ve *Melissa officinalis* (*Lamiaceae*)'in yapraklarını total fenolik ve total flavonoid açısından incelemişlerdir. Bu çalışmada, aynı coğrafik orjinli ve aynı doğal şartlarda büyüyen ancak farklı familyalara ait bitkilerin farklı organları kullanılarak fenolik içerikleri, dolayısıyla antioksidan kapasiteleri incelenmiştir. Fenolik bileşiklerin miktarıyla antioksidan aktivite arasında önemli bir ilişki olduğu, antioksidan kapasite ve flavonoid içeriğin kullanılan farklı bitki parçaları arasında büyük farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir.

Razavi ve arkadaşları (2011), yaptıkları çalışmada İran'da tıbbi bitki olarak kullanılan *Malva sylvestris* L. (*Malvaceae*) bitki ekstraktının biyoaktivitelerini değerlendirdikleri çalışmalarında, bitkinin kurutulmuş olan çiçek ve yapraklarını n-hexane, dichloromethane ve metanol ile muamele ettikten sonra çeşitli metodlar kullanarak bitki ekstraktının antimikrobiyal, sitotoksik ve fitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Metanolla ekstre edilen *M.sylvestris* yaprak ve çiçeklerinin bir bitki patojeni olan *Erwinia carotovora*'ya ve *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis* gibi insan patojeni bakteri strainlerine karşı güçlü antimikrobiyal etkiler gösterdiğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, *Malva sylvestris*'in antiseptik, kemopreventif ya da kemoteröpatik bir ajan olarak kullanılabileceğini

belirtmişlerdir.

Veshkurova ve ark. (2006), *Malva sylvestris* (Malvaceae) bitkisinden bir fitoaleksinin olan malvon A (2-methyl-3-methoxy-5,6-dihydroxy-1,4-naphthoquinone)'yı izole ederek, MS ve NMR spektroskopisi ve X-Işını kristalografik analizi ile yapısını incelemişlerdir. *Malva sylvestris*'i seçmelerinin nedenini de bir bitki patojeni olan *Verticillium dahliae* karşı üretmiş olduğu fitoaleksinin malvon A ile direnç göstermesi olarak açıklamışlardır.

Dudonné ve ark. (2009), 30 bitkinin sulu ekstralarını, oksijen radikal süpürme kapasitesi (ORAC) deneyi, ferrik indirgeyici antioksidan potansiyeli (FRAP) deneylerinin de içinde olduğu bir dizi deneyle antioksidan özellikleri açısından ve Folin-Ciocalteu yöntemiyle de toplam fenolik açısından değerlendirmişlerdir. Antioksidan özellikler ve toplam fenolik içerik, seçilen bitkilerde önemli ölçüde farklılık göstermiştir. Meşe (*Quercus robur*), çam (*Pinus maritima*) ve tarçın (*Cinnamomum zeylanicum*) sulu ekstralarının, kullanılan yöntemlerin çoğunda en yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu ve bu nedenle potansiyel olarak doğal antioksidan kaynakları olabileceği belirtilmiştir. Antioksidan kapasite ile toplam fenolik içerik arasında anlamlı bir ilişki olduğunu tespit etmişlerdir.

Zakizadeh ve ark. (2011), *Alcea hyrcana* Grossh (Malvaceae)'un yaprak, çiçek ve tohumlarının metalonik ekstralarının antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Bu çalışmada total fenolik ve total flavonoid içerikleri de ayrıca belirlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, yaprak ve tohum ekstralarının diğer ekstralara göre en yüksek antioksidan güce sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca tohum ekstralarının önemli ölçüde yüksek fenol (68.9 +/-3.7 mg gallik asit eşdeğeri/g ekstrakt) içerdiği, yaprakların ise diğer kısımlara göre daha fazla flavonoid (28.3 +/-2.6 mg quersetin eşdeğeri/g ekstre) içerdiği görülmüştür.

## 2.9. Doku Kültürü Yoluyla Sekonder Metabolit Üretimi

Modern kentleşmeyle birlikte artan çevre kirliliği, bitkilerin yaşam alanlarının kısıtlanmasına, artan pazar ihtiyacının karşılanamaz hale gelmesine ve nesillerinin tükenme tehlikesine neden olmuştur. Tıbbi bitkiler gün geçtikçe daha fazla herbisit,

insektisit ve ağır metal kontaminasyonunu yan etki olarak insan ve hayvanlara taşımaktadır. Tıbbi bitkisel materyalden sekonder metabolitlerin uygun bir şekilde doku kültürleri yardımıyla üretiminin araştırılması, tüm dünyada ilaç endüstrisinin gelişimi için gittikçe önemli hale gelmiştir (Tiwari, 2015). Mikroorganizmalardan elde edilenden dört kat daha fazla farmasötik ve pigment dâhil birçok madde bitkiler tarafından üretilmektedir. Bu kimyasalların bir kısmının kimyasal olarak sentezlenmesi veya genetik mühendisliği yoluyla mikroorganizmaların ürettiği miktarları üretmek oldukça zordur. Bitki hücre kültürü çevresel, ekolojik veya iklimsel şartlarla sınırlı değildir ve bu nedenle hücreler, kültüre alınan bitkilere göre daha yüksek büyüme hızlarında çoğalabilirler (Zhong, 2001).

Sekonder metabolitlerin bitkilerden doğrudan elde edilmeye çalışılması bir dizi sorunu da beraberinde getirmektedir. Özellikle bitkilerin doğal ortamlarından toplanmalarının maliyetli ve güç olması, soylarının giderek azalması, sekonder metabolit kalite ve miktarının mevsime göre değişmesi, fitokimyasal maddelerin belirli gelişim evrelerinde oldukça az üretilmesi, hedef bitkinin kültüre alınma zorlukları, istenilen sekonder metabolit üretimi için oldukça geniş ekilebilir tarım arazilerine gerksinim duyulması, bunlardan bazılarıdır. Bu gibi zorluklardan ötürü kısıtlı olan üretim, sekonder metabolitlere olan ilgiden kaynaklanan tüketici taleplerini karşılayamamaktadır. Bitki etken maddelerinin eczacılık, kimya, kozmetik, boya ve gıda alanlarındaki talepleri yeteri miktarda karşılayabilmesi için klasik tarım yöntemlerinin yetersizliği beraberinde doku kültürleri yoluyla sekonder metabolit üretim ve arttırımı üzerindeki çalışmalara da kapı aralamıştır (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015).

Aktif sekonder metabolitleri üretmek için alternatif bir seçenek olarak, tıbbi bitkilerin hücre ve doku kültürüne alınmasının belirgin avantajları vardır:

1. Kültür sistemi, ürün yetiştirmek için kullanılabilecek çok fazla alana ihtiyaç duymaz;
2. Sistem, mevsim ile sınırlı değildir. Faydalı bileşikler iklimsel değişikliklerden veya toprak koşullarından bağımsız olarak kontrollü koşullar altında üretilebilir
3. Sekonder metabolizma, hedef bileşiklerin üretimini en üst düzeye çıkarmak için düzenlenebilir.
4. Sistemin bakımı sırasında hiçbir herbisit ve böcek ilacı kullanılmadığı için insan sağlığına zararlı bir etki göstermeyecektir. Bu nedenle de doku kültürünü çevre dostu

olarak tanımlayabiliriz.

5. Sistem kurulduktan sonra, yararlı bileşiklerin içeriği, kalite kontrolünü kolaylaştıracak şekilde farklı alanlardan toplanan bitkilerden daha kararlı olacaktır (Twari, 2015).

Bir bitkinin metabolizmasını, büyümesini veya gelişmesini etkileyen veya engelleyen herhangi bir olumsuz durum veya madde stres olarak kabul edilmelidir (Lichtenthaler, 1995). Sekonder metabolit biyosentezini etkileyen faktörlerden birisi de çevresel strestir. Ancak hedef sekonder metabolit hücre içinde olduğu için elde edilmesi oldukça zordur. Bitki doku kültürlerinde sekonder metabolitlerin sürekli üretimini sağlamak için sekonder metabolit aktivitesini indüklemek yeterli değildir. Hücre içi sekonder metabolitlerin aynı anda hücrelerden geri kazanılması gerekir. Bu nedenle, pratikte, sekonder metabolit biyosentezini indükleyen stres faktörleri ideal olarak hücre içi ürün geri kazanımını da geliştirmelidir (Güven ve Knorr, 2011).

Doku kültürüne alınan bitkiler normal şartlarda üretmedikleri kimyasalları üretebilirler. Bunun nedenlerinden biri olarak Fowler (1982), bitki hücrelerinin normal işlevleri için gerekli DNA miktarından çok daha fazlasını içerdiğini ve bu fazla DNA'nın sadece "yapısal" işlev gören gen ve gen gruplarını taşıyarak normalde ana bitkide bulunmayan enzimleri kodlayabileceğini öne sürmüştür. Doku kültürüne alınan bitkilerde üretilen bu enzimlerin katalizleyeceği biyosentetik yollar da yeni metabolitlerin sentezlenmesine yol açabilir. Sökmen (2001) ise, doku kültürü ortamında bulunan farklılaşmamış ve organize olmamış bazı hücrelerin, ana hücreyle aynı genotipte olmalarına rağmen ana bitkiden farklı fenotipe sahip olabileceğini belirtmektedir. Kültür besi ortamının bileşenlerinden herhangi biri veya daha fazlasının herhangi bir sekonder metabolitin biyosentez yolunu baskılayarak öncül maddenin bir başka yola kaymasına ve yeni biyosentetik ürünlerin üretilmesine neden olacağını belirtmektedir. *Picralima nitida* da normal şartlarda bulunmayan ancak doku kültüründe elde edilen merkezi sinir sistemi aktivatörü perisin, *Morinda citrifolia*' dan elde edilen lusidin ve *Linum flavum*'un kültüre alınmasıyla elde edilen sitotoksik lignan ve  $\beta$ -peltatin, ana bitki tarafından normal şartlarda üretilmeyen ancak kültür ortamında varlığı tespit edilen metabolitlere örnek olarak gösterilebilir (Sökmen, 2001).

Literatür incelendiğinde bugüne dek tıbbi bitkilerden faydalanmak için kallus

kültürü, hücre süspansiyonu kültürü, tüylü kök kültürü ve adventif kök kültürü gibi çok sayıda kültür ortamları kullanıldığı görülmüştür. Tıbbi bitkiler arasında, nesli tükenmekte olan türler ve pozitif anti-kanser, nörolojik koruma, anti-sıtma ve anti-oksidatif aktiviteleri olan bitkiler daha fazla dikkat çekmiştir. Doku kültürlerinde sekonder metabolitlerin arttırılması için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir:

1. Biyosentez yolunda yer alan anahtar gen(ler)i aşırı ifade etmek;
2. Biyosentezleyici hedef bileşiklerin rekabetçi dallarının bloke edilmesi;
3. Bozunma yollarının bloke edilmesi veya hedef bileşiklerin taşınmasının arttırılması;
4. Bitkilerin reproduktif gelişimini engelleyip vejetatif gelişimini arttırarak hedef bileşiğin biyokütlesinin arttırılması.
5. Anahtar genleri taşıyan mikroorganizmalar yardımıyla hedef bileşikler veya önemli ara ürünlerin üretilmesi.
6. Bitkilere stres uygulayarak sekonder bileşiklerin arttırılması, bunlardan bazılarıdır.
7. Bitkiye biyotik ve abiyotik elisatörlerin uygulanması.

Tıbbi bileşiklerin üretimi için hücre kültürleri alanındaki ilerlemeler, alkaloidler, terpenoidler, steroidler, saponinler, fenolikler, flavanoidler ve amino asitler gibi çok çeşitli farmakolojik ürünlerin üretimini mümkün kılmıştır. Bu değerli farmasötiklerin bazılarını nispeten büyük miktarlarda hücre kültürleri ile üretmeye yönelik başarılı çalışmalar yapılmıştır (Çizelge 2.5). Bitki hücre kültürü sistemleri, kimyasal sentez ile üretilmeyen, potansiyel yenilenebilir önemli bileşikler, tatlar, kokular ve renklendiricilerin kaynağıdır (Vanishree ve ark., 2004).

Taxus ağacının kabuğunda bulunan karmaşık bir diterpen alkaloid olan taksol (paklitaksel), mikro tübüler hücre sistemi üzerindeki benzersiz etki şekli nedeniyle bilinen en umut verici antikanser ajanlarından biridir (Vanisree ve ark.,2004). Günümüzde, taksonların yüksek ticari değeri, Taxus ağacının nadir ve pahalı olması nedeniyle, çeşitli Taxus türleri tarafından kültürlerde taksol üretimi yapılmaktadır. Bu kültürlerde taksol üretimini arttırmak için kültür ortamına farklı amino asitler eklenmiş ve *T. cuspidata* kültürlerinde fenilalaninin maksimum taksol üretimine yardımcı olduğu bulunmuştur (Fett-Neto ve ark., 1994). Yukimune ve ark., (1996), ise biyotik ve abiyotik faktörlerin doku kültüründe taksol üretimi ve birikimini araştırmıştır.

Çizelge 2. 6. Bitki Doku Kültürü yoluyla üretilen bazı bitki sekonder metabolitleri ve yetiştirildikleri kültür ortamı özellikleri. Vanisree ve ark.'ndan (2004) alıntılanmıştır

Bitki adı	Etken madde	Yetiştirilen doku kültürü ortamı	Kültür tipi	Referans
<i>Anchusa officinalis</i>	Rosmarinic acid	B5 + 2.4-D (1.0 mg/l), Kinetin (0.1 mg/l)	Suspension	De-Eknamkul ve Ellis, 1985
<i>Capsicum annuum L.</i>	Capsaicin	MS + 2.4-D (2 mg/l), Kinetin (0.5 mg/l), Sucrose (3%)	Suspension	Johnson et al., 1990
<i>Citrus sp.</i>	Naringin, Limonin	MS + 2.4-D (0.66 mg/l), Kin.(1.32mg/l)	Callus	Barthe et al., 1987 Coconut milk (100 ml
<i>Eucalyptus tereticornis SM.</i>	Steroller ve Fenolik bileşikler	MS + 2.4-D (2 mg/l)	Callus	Venkateswara et al., 1986
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgolide A	MS + NAA (1 mg/l), Kinetin (0.1 mg/l), Sucrose (3%)	Suspension	Carrier et al., 1991
<i>Papaver somniferum L.</i>	Alkaloids	MS (glisinsiz) + Kinetin (0.1 mg/l)	Callus	Furuya et al., 1972
<i>Taxus spp.</i>	Taxol	B5 medium + 2.4-D (0.2 mg/l), BA (0.5 mg/l), Casein hydrolysate (200 mg/l), Sucrose (3%)	Suspension	Wu et al., 2001

Kısaltmalar: B5 = Gamborg's (1968) medium; BA = 6-Benzyladenine; 2.4-D = 2.4-dichlorophenoxyacetic acid; GA3 = Gibberellin acid; IAA = Indole-3-acetic acid; IBA = Indole-3- butyric acid; 2iP = N6-[2-isopentenyl]-adenine; LS = Linsmaier and Skoogs (1965) medium; MS = Murashige and Skoog (1962) medium; NAA = Napthaleneacetic acid.

Aynı şekilde *Papaver somniferum*'dan elde edilen Latex, analjezik etkiye sahip morfin ve kodeinin ticari bir kaynağıdır. *P. somniferum*'un kallus ve süspansiyon kültürleri, bu bileşiklerin üretimi için alternatif bir araç olarak araştırılmıştır. Morfolojik olarak farklılaşmamış kültürlerde morfin ve kodeinin üretilmeye başlanmıştır (Siah and Doran 1991). İlaç endüstrisi için son derece önemli bir sekonder metabolit olan diosgenin, steroidal ilaçların kimyasal sentezi için bir öncüdür. 1983'te Tal ve ark. *Dioscorea deltoidea* hücre kültürlerinde karbon ve nitrojen düzeylerinin tek bir hücre hattında büyük ölçüde diosgenin birikimini etkilediğini bildirmiştir.

L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), yüksek bitkilerde betain ve melaninin bir öncüsü olan önemli bir ikincil metabolizma aracıdır. Aynı zamanda, hayvanlarda



katekolaminlerin bir öncüsüdür ve beyindeki dopamin eksikliği ile ilişkili ilerleyici bir sakatlık bozukluğu olan Parkinson hastalığı için güçlü bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu tedavinin yaygın olarak uygulanması, ekonomik fiyat seviyesinde büyük miktarlarda L-DOPA için bir talep oluşturarak zenginleştirilmiş üretim için alternatif bir araç olarak hücre kültürlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Brain (1976), *Mucuna pruriense* kallus dokusunun, nispeten yüksek 2.4-D konsantrasyonları içeren ortamda 25 mg/l DOPA biriktirdiğini bildirmiştir. Teramoto ve Komamine (1988), *Mucuna hassjoo*, *Pruriense* ve *M. deeringiana*'nın kallus kültürü oluşturarak ve kültür koşullarını optimize etmiştir. En yüksek DOPA konsantrasyonu, *M. hassjoo* hücreleri, 0.025 mg/l 2.4 -D ve 10 mg/l kinetin ile MS ortamında yetiştirildiğinde elde edilmiştir.

Giri ve ark., (2012) nadir bir Himalaya şifalı orkidesi olan *Habenaria edgeworthii*'nin kallus süspansiyon kültürlerinden fenolik bileşiklerin üretimi için doku kültürü çalışmaları yapmışlardır. Tohumlar 1 mM-naftalenilsetik asit (NAA) ile takviye edilmiş ½ MS ortamı üzerinde kültüre alındığında sekiz hafta içinde, kırılğan ve açık sarı renkli kallus oluşumu gözlemlenmiştir toplam fenolik muhtevası, BA üzerinde büyütülen kallusta 10.33 ve 14.30 mg gallik asit eşdeğeri arasında değiştiği kaydedilmiştir. Antioksidan aktivite, üç *in vitro* deneyle ölçülerek (ABTS, DPPH, FRAP), 3.0µM BA içeren ortamda büyütülen kallusta maksimum aktivite gözlemlenmiştir. HPLC analizi ile, doğal ortamında yetişen orkide ile karşılaştırıldığında kültür ortamında yetiştirilende yüksek gallik asit tespit edilmiştir.

North ve ark. (2012), *Strelitzia reginae* bitkisinin, doku kültürüne alınan örneklerinde bitki büyüme düzenleyicilerinin, antioksidan uygulamalarının (askorbik asit ve aktif kömür) ve doku yaralanmalarının toplam fenolik içerik üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sonuçlar, çeşitli 1-naftalen asetik asit (NAA) ve 6-benzilaminopurin (BAP) konsantrasyonlarının fenolik üretimini önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir. En yüksek bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonunu içeren ortam (yani, 0.5 mg/l NAA ve 6 mg/l BAP), kontrol ortamına göre en yüksek fenol içeriğiyle sonuçlanmıştır. Aktif kömürün (AC), askorbik asit (AA) ile karşılaştırıldığında, ortamın toplam fenol içeriğini %53 oranında azaltırken, eksplantların yaralanmasının fenolik miktarını önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir.

Madhavi ve ark. (1998), *Vaccinium myrtillus* meyvelerinden ve hücre

kültürlerinden biyoaktif bileşenlerin izolasyonunu incelemişlerdir. Ekstre edilen kallus kültürleri ve meyve fraksiyonlarının analizleri sonucu bazı flavonoidleri belirlemişlerdir. Kallus'ta antosiyanin birikimi meyveden daha düşük bulunmuştur. Hem kallus hem de doğal otamında yetişen meyve ekstralarında proantosiyanidinler birikmesine rağmen meyvedekinin kallusdan yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Dias ve ark. (1998) *Hypericum perforatum var. angustifolium* kallusundan luteolin-5,3'-dimetil eter, luteolin-5-glukozit ve luteolin-3'-glukozit ile birlikte doğal olarak oluşan yeni bir bileşik 6-C-prenil luteolin tespit etmişlerdir. Kallusun toplam flavonoid içeriği, yabancı büyüyen *H. perforatum* bitkilerinin içeriğinden çok daha düşük olarak bulunmuştur.

Bitki sekonder metabolitlerini doku kültürü yoluyla arttırmanın bir başka yolu da elisatör kullanımıdır. Elisatörler hedef canlı organizmanın savunma sistemini aktif hale getirebilecek çeşitli kaynaklardan kimyasallar veya biyo-faktörlerdir. Elisatörler bitkilerde veya hücre kültürlerinde savunma reaksiyonuna neden olarak sekonder metabolit birikimini tetiklerler. Elisatörler, plasma membranının iç ve dış yüzeyinde bulunan reseptörler tarafından tanınabilirler. Aktive olan reseptörler ise sırasıyla iyon kanallarını, GTP-bağlı proteinleri ve protein kinazlar gibi efektörlerini aktive ederler. Aktive efektörler ise elisatör sinyallerini genlere taşıyarak sekonder metabolitlerin biyosentezini sağlayacak olan sinyal moleküllerinin (salisilik asit, jasmonik asit, nitrik oksit v.b) sentezine öncülük ederler (Wang ve ark., 2017).

Kültür ortamındaki kimyasalların kompozisyonu, hem yoğun bir şekilde biyokütle artışını sağlamak hem de istenilen metabolitlerin birikmesi amacı ile optimize edilmelidir. Oksin ve sitokoninler biyosentetik yolların uygun bir şekilde teşvik edilmesi amacıyla oldukça önemlidir. Sekonder metabolit birikimi, besin ortamının bileşimi, inorganik azot ve fosfatın konsantrasyonu, karbon kaynağı, bitki büyüme düzenleyicileri ve bu değişikliklerin yapıldığı kültürün büyüme aşaması değiştirilerek arttırılıp azaltılabilir (Collin, 2001). Bitki doku kültürlerinde sekonder metabolitler genellikle büyümenin yavaşladığı ve fazla karbonhidrat ve azotun sekonder metabolik yoluna yönlendirildiği büyüme siklusunun son evresinde birikirler.

Cilt problemleri için özel olarak kullanılan bir ilaç olan ve *Coleus blumei*'den elde edilen Rosmarinik asit, özellikle bu konudaki çalışmalara konu olmuş bir sekonder

metabolittir. Petersen ve ark. (1995), *Coleus blumei* (kolyoz) bitkisinin ürettiği rosmarinik asidi doku kültüründe arttırmak için yaptıkları çalışmada doku kültüründeki konsantrasyonunu, büyüme fazının sonunda kültürün % 20'lik bir kuru ağırlığına kadar yükseltebilmiştir. Ortama artan miktarlarda eklenen sükrozun Rosmarinik asit miktarını arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca ortamda fosfat veya nitrat gibi bir mikro besin elementinin azalmasının da fenolik bileşiklerin daha hızlı sentezine neden olduğu sonucuna varmışlardır.

Doku kültürü yoluyla sekonder metabolit arttırımının bir başka yolu da metabolik yolda görevli enzimlerin aktivasyonunun arttırılmasıdır. Fenolik metabolizmasında bileşiklerin sentez ve oksidasyonunda görevli bir dizi enzim rol oynar. Fenoliklerin biyosentezinde anahtar rol oynayarak özellikle transsinnamat üretimi için L-fenilalanin deaminasyonunu katalizleyen PAL( fenilalanin amonyum liyaz) bir dizi faktörden etkilenmektedir. Ayrıca fenolikler dikuinonlara peroksidaz( POD) ve polifenol oksidaz (PPO) yardımıyla dönüşmektedirler. Birçok çalışmada biyotik ve abiyotik stresin bu enzimlerin miktarında artışa neden olduğu belirlenmiştir (Kwak ve ark. 1996; Ruiz ve ark., 2003). Bitkiler için önemli bir besin olan  $Ca^{+2}$ , tohum formasyonu, polar büyüme, gaz değişim regülasyonu, sekresyon, hareket, ışık ve hormon bağımlı büyüme ve gelişme gibi önemli olaylarda rol oynar. Ayrıca bitkiler için hayati önemli olan nitrojen metabolizmasında da işlev görür (Hepler ve Wayne 1985).

Ruiz J.M. ve arkadaşları 2003 yılında, kalsiyumun farklı uygulama oranlarının, strese karşı birçok direnç yanıtında temel rol oynayan, fenol metabolizmasının metabolik sürecini nasıl etkileyebileceğini belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. Tütün bitkilerinin yetiştirildiği besin çözeltilisine artan miktarlarda kalsiyum ekleyerek, yapraklardaki fenolik bileşiklerin ve fenolik metabolik yolunda işlev yapan fenilalanin amonyum-liyaz (PAL), polifenol oksidaz (PPO) ve peroksidaz (POD) konsantrasyonunu ölçmüşlerdir. Buna göre kalsiyumun, fenolik metabolizmasında yer alan enzimlerin aktiviteleri üzerinde olumlu bir etki yaptığını, ancak uygulamış oldukları yüksek dozda kalsiyumun (5 mM), fenolik bileşiklerin sentezinden daha fazla oksidasyonunu teşvik ettiğini ve böylece fenoliklerin daha düşük konsantrasyonda ölçüldüğünü belirlemişlerdir.

Elisatörlerin kombine kullanımı, bitki hücresi, doku ve organ kültürlerinde

ikincil metabolitlerin (SM) üretimini arttırmanın etkili bir yolu olabilir. Sarmadi ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada, bir *Taxus baccata* kallus kültüründe salisilik asit (SA) ön-muamelesinin ve farklı glukoz düzeylerinin büyüme, biyokimyasal özellikler ve taksol üretimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla SA (5µM) ile muamele edilmiş üç aylık kalluslar farklı konsantrasyonlarda glikozla güçlendirilmiş B5 ortamında kültüre alındıktan sonra sadece glukoz ile desteklenmiş B5 ortamında yetiştirilen kalluslarla karşılaştırılmıştır. 21. günde hasat edilen kalluslarda daha yüksek glukoz konsantrasyonlarına geçildikçe yaş ağırlık (g), kuru ağırlık (g) ve hücre canlılığı (%) açısından önemli ölçüde azalma dikkat çekmiştir. Glikoz miktarındaki artış, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) içeriğini arttırarak oksidatif strese neden olmuştur. SA ile ön-muamele edilmiş örneklerde düşük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği ve oksidatif stres, artan bir antioksidan enzim aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında artan miktarda glikoz uygulanan kalluslarda daha az membran hasarı ve gelişmiş büyüme ve hücre canlılığı ile sonuçlanmıştır. SA ön uygulamasının glukoz uygulanan örneklerde fenilalanin amonyum liyaz (PAL) ve polifenol oksidaz (PPO) aktivitesini düşürerek fenolik bileşiklerin üretim ve oksidasyonunu düşürdüğü tespit edilmiştir. SA ön uygulamasına tabi tutulduktan sonra % 2 glukoz içeren ortamda kültüre alınan kalluslarda, kontrolle karşılaştırıldığında taksolün (5.1 kat) artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle SA ve glukoz uygulamasının *T. baccata* kallus kültüründe taksol üretiminde önemli bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.

Bitkisel *in vitro* kültürlerde farmasötik fitokimyasalların birikimini arttırabilecek uygun maliyetli stratejilerin araştırılması için birçok çalışma yapılmaktadır. İlk kez, Jiao ve ark. (2018), *Isatis tinctoria* L. tüylü kök kültürlerini, farmakolojik olarak aktif flavonoidlerin üretimini teşvik etmek amacıyla ultraviyole radyasyona (ultraviyole-A, ultraviyole-B ve ultraviyole-C) maruz bırakmışlardır. Sonuçlar, 108kJ/m<sup>2</sup> dozda UV-B radyasyonuna maruz bırakılan *I. tinctoria* tüylü kök kültürlerinde maksimum flavonoid birikiminin, kontroldekine kıyasla 16.51 kat arttığını göstermiştir. Ek olarak, uygulamaya tabi tutulan *I. tinctoria* tüylü kök kültürlerinde antioksidan aktivite artışı ve hücre duvarının güçlenmesi ultraviyole-B radyasyonunun aracılık ettiği oksidatif strese karşı olumlu geri besleme tepkileri olarak yorumlanmıştır.

Golkar ve Taghizadeh (2018), antioksidan bileşikler açısından zengin bir tıbbi

bitki olan *Carthamus tinctorius* L. (aspir) bitkisiyle bir çalışma yapmıştır. Aspirlerde tuzluluk stresine uyumun biyokimyasal mekanizmalarının hücresele düzeyde daha iyi anlaşılması amacıyla, dört farklı genotipin aspir kültürü kullanılarak tuzluluk stresi altındaki biyokimyasal içeriği (iyonik içerik, prolin ve glisin betain), toplam fenolik madde içeriği (TPC), toplam flavonoid içeriği (TFD), antioksidan yanıtları, lipid peroksidasyonu değerlendirilmiştir. Hipokotillerden elde edilen kalluslar, farklı sodyum klorür konsantrasyonlarında *in vitro* tuz stresine maruz bırakılmıştır. NaCl konsantrasyonu arttıkça K<sup>+</sup> ve karotenoid rezervlerinde bir azalma eğilimi gözlenirken, Na<sup>+</sup> içeriği, prolin, MDA, TPC, TFD ve DPPH aktivitesinde de aynı koşullar altında artış eğilimi gözlenmiştir. Antioksidan aktivite ve toplam fenolik içerikleri arasında pozitif ve anlamlı korelasyonlar, fenoliklerin aspirin hücresele düzeyde potansiyel antioksidan aktivitesine katkıda bulunduğunu göstermektedir.

## 2.10. Minerallerin Bitkilerdeki Etkileri

Bitkisel materyaller gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ilaç endüstrisi için reçetesiz satılan ilaç ürünleri ve hammaddeler olarak kullanılmakta ve küresel ilaç pazarının önemli bir bölümünü temsil etmektedir. Dünya sağlık örgütüne göre, dünya nüfusunun yaklaşık % 80'i bitki bazlı ilaçlar kullanmaktadır (WHO, 1998). Genellikle ciddi yan etkilere sahip olmayan bitkilerin terapötik aktivitesi, içeriğindeki yağlar, proteinler, sekonder metabolitler, mineral ve vitaminler gibi biyolojik olarak aktif organik bileşikler ile ilişkilidir. Elementlerin topraktan insana aktarıldığı bir kanal işlevi gören bitkilerin içerdiği temel elementler, toprağın jeokimyasal yapısından, toprak içeriğindeki gübreden, bitki koruyucu maddelerinden, bitkilerin toprak muhtevasıyla olan ilişkilerine göre değişen bazı elementleri seçme yeteneklerinden etkilenir (Pytlakowska ve ark., 2012). Tıbbi bitkilerin mineral içeriklerinin belirlenmesi, besin içerikleri ve farmakolojik fonksiyonlarını dikkate alarak, tedavi amaçlı kullanılmak üzere önerilen bitki dozlarının tanımlanması açısından oldukça önemlidir (Queralt ve ark., 2005). Tıbbi bitkiler, teröpatik özelliklerinin yanı sıra aynı zamanda hem insanlara hem de hayvanlara potansiyel bir metal toksisitesi kaynağı olarak (Dwivedi, 2002) bildirilmiştir. Dokularında yüksek miktarda ağır metal içeren bitkiler, kontamine

toprakların fitoremidasyonu için önemli birer monitor olarak düşünülmektedir (Gisbert ve ark., 2006). Bu nedenle, dünya sağlık örgütü, bitkisel ilaçlar için hammaddeleri oluşturan tıbbi bitkilerin, ağır metallerin varlığı için kontrol edilmesini önermektedir (FAO/WHO 1984). Daha önce Deve gülü bitkisinin mineral içeriğinin belirlendiği bir çalışma yapılmamıştır.

Annan ve ark. 2013 yılında farklı coğrafik bölgelerden toplanan tıbbi bitkilerin ağır metal içeriklerini karşılaştırmışlardır. Bölgenin bitkinin mineral içeriği üzerindeki etkisini belirlemek için 5 farklı coğrafi konumdan örneklenen 10 tıbbi bitkide kurşun, arsenik, cıva, kadmiyum ve alüminyum olmak üzere toplam 5 mineral seviyesi değerlendirilmiştir. Atomik absorpsiyon cihazıyla yapılan ölçümler sonucunda bulgular, farklı ortamlarda yetişen tıbbi bitki türlerinin farklı seviyelerde ağır metaller biriktirdiğini göstermiştir. Ağır metallerin seviyeleri aynı yerden toplanan farklı bitkiler için de değişmiştir.

Enzimler gibi vücudun önemli bileşenleri kimyasal elementlerle yakından ilişkilidir. Elementler, özellikle esansiyel eser elementler, guatrda iyot, anemide demir gibi mineraller hastalıklarla mücadele etmede küratif ve önleyici rol oynarlar. İnsan deneklerinde eser elementlerin eksikliği çoğu pratik diyet koşullarında ortaya çıkabilir. Artık tedavi edilemez olarak kabul edilen birçok hastalık, bu elementlerin dengesizliğinin insan vücudunda dengelenmesiyle tedavi edilebilir (Shirin ve ark., 2010). Antioksidan enzimler, bakır, çinko, manganez ve demir gibi kofaktörlerin varlığında çok aşamalı bir işlemde tehlikeli oksidatif ürünleri hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve sonra suya dönüştürür (Nimse ve ark., 2015). Tıbbi bitkilerin mineral içeriklerinin belirlenmesi, besin içerikleri ve farmakolojik fonksiyonlarını dikkate alarak, tedavi amaçlı kullanılmak üzere önerilen bitki dozlarının tanımlanması açısından oldukça önemlidir.

Mineral besinler, biyosfere bitkilerin kök sistemleri ile girerek bütün organizmalar arasında sürekli bir döngü halinde aktarılırlar (Epstein, 1999). Bitkiler, mineralleri kökleri ile aldıktan sonra çeşitli biyolojik görevlerde kullanmak için bitkinin farklı organlarına taşır. Mineral besin, eksikliği durumunda bitkinin yaşam döngüsünü olumsuz etkiliyorsa mutlak gerekli element olarak adlandırılır (Taiz ve Zeiger, 2008). Taiz ve Zeiger, mutlak gerekli elementleri dört grupta incelemiştir (Çizelge 2.7). Birinci

grup, organik (karbon) bileşiklerin parçası olan besin elementleridir. Bitkiler tarafından indirgenme yükseltgenme reaksiyonları esnasında özümlenir. İkinci grupta yer alan besin elementleri ise, yapısal bütünlüğün korunması ve enerji depolanmasında önem arz eder. Bunlar genellikle bir organik molekülün hidroksil grubuna bağlı, fosfat, borat ve silikat ester olarak bitki dokularında bulunurlar. Üçüncü grupta yer alan besin elementleri bitki dokusunda serbest iyonlar şeklinde bulunabildikleri gibi, hücre çeperinde pektin gibi maddelere de bağlı iyonlar halinde bulunurlar. Enzim kofaktörleri ve ozmotik potansiyel düzenleyicileri olarak işlev görürler. Dördüncü grup ise elektron transferi reaksiyonlarında rol oynar.

Çizelge 2. 7. Biyokimyasal işlevlerine göre bitki mineral besin elementlerinin sınıflandırılması (Taiz ve Zeiger, 2008)

Mineral besin maddesi	İşlevleri
Grup 1 N S	<b>Karbon bileşiklerinin parçası olan besin elementleri</b> Aminoasitlerin, amidlerin, proteinlerin, nükleik asitlerin, nükleotidlerin, koenzimlerin, hekzoaminlerin vb. yapı maddesi. Sistein, sistin, metiyonin ve proteinlerin bileşeni. Lipoik asit, koenzim A, tiyamin pirofosfataz, glutatyon, biotin, adenzin-5'-fosfosülfat ve 3-fosfoadenozinin yapı maddesi.
Grup 2 P Si B	<b>Enerji depolanması ve yapısal bütünlük bakımından önemli besin elementleri</b> Şeker fosfatların, nükleik asitlerin, nükleotidlerin, koenzimlerin, fosfolipidlerin, fitik asidin vb. bileşeni ATP nin bulunduğu reaksiyonlarda anahtar rolü vardır. Hücre çeperinde amorf silikat olarak birikir. sertlik ve esneklik gibi hücre çeperi mekanik özelliklerine yardımcı olur. Mannitol, mannan, polimannuronik asit ve hücre çeperlerinin diğer yapı maddeleri ile kompleksler oluşturur. Hücrenin uzamasında ve nükleik asit mekanizmasında yer alır.
Grup 3 K Ca Mg	<b>İyon formunda kalan besin elementleri</b> 40'dan fazla enzimin kofaktörü olarak gereksinim duyulur. Hücre turgor basıncını belirleyen ve hücrenin elektronötürlüğünü ayarlayan esas katyondur. Hücre çeperinin orta lamelinin yapı maddesidir. ATP ve fosfolipidlerin hidrolizinde yer alan bazı enzimler kofaktör olarak gereksinim duyar. Metabolizmanın düzenlenmesinde ikinci haberci olarak görev alır. Fosfat transferinde görevli birçok enzim için gereklidir. Klorofil molekülünün yapı taşıdır.

Çizelge 2.7. Biyokimyasal işlevlerine göre bitki mineral besin elementlerinin sınıflandırılması (Taiz ve Zeiger, 2008) (devam)

Mineral besin maddesi	İşlevleri
Mg	Fosfat transferinde görevli birçok enzim için gereklidir. Klorofil molekülünün yapı taşıdır.
Cl	O <sub>2</sub> üretiminde yer alan fotosentetik reaksiyonlar için gereklidir.
Mn	Bazı dehidrogenazların, dekarboksilazların, kinazların, oksidazların, peroksidazların aktiviteleri için gereklidir. Diğer katyonla aktifleştirilen enzimler ve fotosentetik O <sub>2</sub> üretimi için gereklidir.
Na	C4 ve CAM bitkilerinde fosfoenolpürivatın yeniden oluşturulmasında görevlidir. Bazı durumlarda potasyumun yerini alır.
Grup 4	<b>Redoks reaksiyonlarında yer alan besin elementleri</b>
Fe	Fotosentezde, N <sub>2</sub> fiksasyonunda ve solunumda görevli hem olmayan demir proteinlerinin ve sitokromların yapı maddesi
Zn	Alkol dehidrogenaz, glutamik dehidrogenaz, karbonik anhidraz vb. yapı maddesidir.
Cu	Askorbik asit peroksidaz, trozinaz, monoamin oksidaz, urikaz, sitokrom oksidaz, fenolaz, lakkaz ve plastosiyaninin bileşeni
Ni	Ureazın yapı maddesi, N <sub>2</sub> fikse eden bakterilerde hidrogenazların yapı maddesi.
Mo	Nitrogenaz, nitrat reduktaz ve ksantin dehidrogenazın yapı maddesi.

## 2.11. Mineral Besin Elementleri

Bitkiler, büyüyüp gelişmelerini sağlayan farklı besin elementlerine ihtiyaç duyarlar. Besin elementlerinin başlıcaları azot, kükürt, fosfor, kalsiyum, potasyum, silisyum, magnezyum, demir, klor, mangan, sodyum, çinko, bakır, nikel ve molibdendir.

### 2.11.1. Azot

DNA, RNA ve Koenzim A gibi bitki için oldukça önemli olan bileşiklerin yapısında bulunması nedeniyle eksikliğinde büyüme durur. Azot eksikliğinde amino asit veya diğer azotlu bileşiklerin sentezinde kullanılmayarak depolanan karbonhidratlar bitkinin cılızlaşmasına ve odunsu gövde oluşumuna neden olurlar. Aynı şekilde azot metabolizmasında kullanılmayan karbonhidratlar antosiyanin sentezinde kullanılarak antosiyanin birikimine dolayısıyla yapraklarda mor renk oluşumuna neden olurlar (Epstein, 1999; Taiz ve Zeiger, 2008; Kadioğlu, 2011).



### 2.13.2. Kükürt

Kükürt sistein ve metionin gibi proteinik aminoasitlerin yapısında bulunduğu gibi solunum ve yağ asidi metabolizmasının önemli bir bileşiği olan koenzim A, biyotin ve tiamin gibi vitaminlerin yapısında da bulunur. Proteinlere üç boyutlu dizilim sağlayan disülfüt (S-S) bağlarını oluşturur.

### 2.13.3. Fosfor

Organizmaya enerji sağlayan ATP nin, hücre zarının temel yapı taşı olan fosfolipidlerin ve fotosentez, solunum, yağ asidi sentezi gibi olaylarda oksidasyon-redüksiyon olaylarını düzenleyen NAD ve NADP koenzimlerinin temel yapı taşıdır. Fosfor eksikliğinde de azot eksikliğindeki gibi antosiyanin birikiminden dolayı mor yapraklar oluşurken gövdeler cılızlaşır ancak odunsulaşmaz.

### 2.13.4. Kalsiyum

Kalsiyum iyonları ( $Ca^{+2}$ ), mitoz bölünme sırasında iğ ipliklerin oluşumunda kullanıldığı gibi bölünme sonrasında oluşan iki kardeş hücre arasındaki orta lameli de oluşturur. Ayrıca bitkinin hem çevresel hem de hormonal uyarılara karşı verdiği sekonder cevapların habercileri olarak, sitosolde bulunan kalmodulin proteinine bağlanıp birçok metabolik süreci düzenlemektedir (Sanders ve ark., 1999). Kalsiyum ayrıca arjinin kinaz, adenil kinaz ve ATPaz enzimlerinin aktivatörüdür. Kalsiyum eksikliğinde bitkide karbonhidrat taşınımı yavaşlar. Ayrıca kalsiyum aktif transport sistemlerinin çalışması ve membranın yapısal özelliklerini sürdürmesi için önemlidir. Kalsiyum eksikliğinde kök ve gövde uçlarındaki meristematik dokular canlılığını kaybettiğinden, bu organlarda büyüme durur ve bitkiler bodur kalır.

### **2.13.5. Potasyum**

Potasyum, hayvan hücrelerindeki sodyuma benzer olarak bitki hücrelerinde osmoregülasyonun düzenlenmesinde rol oynar. Potasyum iyonu stomaların açılıp kapanması, uyku hareketleri, yaprakların konumlarının değişmesi gibi bitki hareketlerinde rol oynadığı gibi enzimlerin aktivatörü olarak da işlev görür. Bitkide en fazla meristematik dokularda bulunması nedeniyle, peptid bağlarının oluşumunda ve karbonhidrat metabolizmasında rol oynayan enzimlerin aktivatörü olarak iş gördüğü düşünülür. Çünkü potasyum eksikliğinde bitkideki karbonhidrat metabolizması düzensizleşir ve bitkilerde fazlaca karbonhidratın depo edildiği gözlenir. Bunun nedeni potasyum eksikliğinde protein sentezi yapılamadığı için proteinlerin yapısına girecek olan karbonlar, karbonhidratların yapısına girerler. Potasyum eksikliğinde bitkilerde kısa internodyumlu ve zayıf gövdeler meydana gelir.

### **2.13.6. Silisyum**

Bitkiler silisyumu topraktan absorblar ve hücre çeperine bağlarlar. Hücre çeperine esneklik verir. Silis bütün otların çiçek braktelerinde, yaprak ve gövde hücre çeperlerinde silikajel halinde önemli miktarda bulunur. Yeterli miktarda silisyumun besin çözeltilisine eklenmesi ile bitkilerin büyüme ve üreme yetenekleri ile stres dayanıklılıkları artmıştır. Ayrıca silisyum eksikliği olan bitkilerin fungal enfeksiyonlara daha duyarlı oldukları ve dış etkilere karşı daha dayanıksız ve kırılğan oldukları saptanmıştır.

### **2.13.7. Magnezyum**

Klorofilin yapısını oluşturan porforin halkasının merkezinde yer alır. Karbonhidrat metabolizması ve nükleik asit sentezinde rol alan enzimlerin çoğunun, fotosentezin karbon fiksasyon safhasında rol alan ribuloz difosfat karboksilaz ve fosfoenol pirüvat karboksilaz enzimlerinin aktivatörüdür. Magnezyum ribozom yapısının kararlılık kazanmasında rol oynar. Eksikliğinde klorozis ve absisyon görülür.

### 2.13.8. Demir

Demir, bitkiler tarafından ferrik ( $Fe^{3+}$ ) veya ferrous ( $Fe^{2+}$ ) formlarında alınabilmelerine rağmen bitkiler daha çok çözünebildiği için ferrous formunu tercih ederler.  $Fe^{2+}$  formu klorofin sentezinde önemli rol oynar. Eksikliğinde klorozis görülür. Demir, sitokrom oksidaz, katalaz ve peroksidaz gibi çeşitli enzimlerin aktivatörüdür (Taiz ve Zeiger, 2008; Kadıoğlu, 2011).

### 2.13.9. Klor

Klor elementi bitkilerde klor iyonu ( $Cl^-$ ) olarak bulunur. Fotosentezde suyun parçalanarak oksijen üretildiği reaksiyonda klora ihtiyaç duyulur (Clark ve Eaton-Rye, 2000). Ayrıca yaprak ve köklerde hücre bölünmesi için klora ihtiyaç duyulur (Harling ve ark., 1997). Klor iyonları kolay çözülebilen ve deniz suyunun rüzgar tarafından havaya karıştırılması ve yağmurla toprağa karışması nedeniyle genellikle toprakta bulunabilir durumdadır.

### 2.13.10. Mangan

Mangan iyonları ( $Mn^{+2}$ ), özellikle krebs döngüsünde görevli dekarboksilazlar ve dehidrogenazları aktive eder. fotosentez esnasında sudan oksijenin üretildiği reaksiyonda görev alır.

### 2.13.11. Sodyum

Sodyum C4 ve CAM metabolik yollarındaki ilk karboksilasyonun substratı için fosfoenol pürivatın yeniden oluşturulmasında önemli rol oynar. Ayrıca hücre genişlemesini arttırarak büyümeyi teşvik eder.

### **2.13.12. Çinko**

Alkol dehidrogenaz, glutamik dehidrogenaz, karbonik anhidraz vb. enzimlerin yapı maddesidir. Bazı bitkilerde klorofil sentezi için de gerekli olabilmektedir.

### **2.13.13. Bakır**

Fotosentezin ışık reaksiyonlarında elektron taşıyan plastosiyanin gibi redoks reaksiyonlarında görev alan enzimlerle ilişkilidir.

### **2.13.14. Nikel**

Azot fikse eden mikroorganizmalar fiksasyon sırasında ortaya çıkan hidrojen gazının yeniden işleme girmesi için gerekli olan enzim için nikel ihtiyacı duyar. Ayrıca yüksek yapılı bitkilerde üreazın yapı maddesidir. Toprakta yetişen bitkiler nikel az miktarda gereksinim duyduğu için çok nadir nikel noksanlığı gösterir.

### **2.13.15. Molibden**

Bitki azotunun bitki hücresi tarafından özümlemesi sırasında nitratın nitrite indirgenmesini katalize eden nitrat reduktaz ve azot fikse eden mikroorganizmalarda azotu amonyağa çeviren nitrogenaz da dahil olmak üzere birçok enzimin bileşenidir.

Toprağın kök sistemi içerisinde bitkilerin çeşitli elementlerinin alınması, belirli bir bitkinin, belirli dokunun botanik yapısına, toprak tipine ve elementin de değişmesine bağlı olduğu gibi mikro elementler bitkiye dış çevreden de kontamine olabilir. Ayrıca, canlı organizmalardaki temel elementlerin içeriği, elementleri toksik seviyenin altında tutabilen düzenleyici mekanizmaların bir parçası olan fizyolojik süreçlere bağlıdır. Bitkilerin mineral içeriği toprağın fiziksel ve kimyasal özellikleri, suni gübre uygulamaları, bölgenin iklimsel şartları gibi farklı faktörlerin etkisi altındadır (Pytlakowska ve ark., 2012). Bitkilerdeki elementlerin içeriği hem bitkinin büyüdüğü toprağın jeokimyasal özellikleri hem de bitkilerin seçici olarak element biriktirme

yetenekleri tarafından yönetilir. Ayrıca bitkilere çevre, hava veya su ortamından elementlerin kontamine olması bazı bitkilerin çevre kirliliği için biyometreler olarak kullanılmalarını sağlar (Queralt ve ark., 2005).

Ağır metallerin insan yaşamında önemli olumlu ve olumsuz rolleri vardır. Ağır metallerin bazıları demir, çinko ve bakır dahil olmak üzere “temel” olarak kabul edilir. Kadmiyum, kurşun ve civa gibi bazı metal iyonları vücudumuzdaki biyokimyasal reaksiyonlarda toksik rol oynar. Bitkiler için yağmur, trafik yoğunluğu, ısınma için yağ veya fosil yakıtların kullanılması, yapraklarla adsorbe edilen atmosferik tozlar, bitki koruma maddeleri ve gübreler ek ağır metal kaynakları olarak kabul edilebilir. Bitkiler çok çeşitli konsantrasyonlarda ağır metal iyonları içerir. Her elementin, bitkide bir veya daha fazla spesifik yapısal veya fonksiyonel rolü olduğu için, bu elementin yokluğunda, bitkinin bu eksikliğe ait belirli morfolojik veya biyokimyasal belirtiler göstermesi beklenir. Bu elementlerin bazıları, insanlar için oldukça düşük seviyelerde bile toksiktir. Özellikle, kadmiyum ve kurşun gibi ağır metallerin toksik izlerinin, kanser, mutasyonlar veya düşükler gibi çeşitli sağlık riskleri oluşturduğu bilinmektedir (Divrikli ve ark., 2006).

Queralt ve ark. (2005), beş tıbbi bitkinin (*Eucalyptus globulus* Labill., *Matricaria chamomilla* L., *Plantago lanceolata* L., *Mentha piperita* L. ve *Taraxacum officinale* Weber) makro ve mikro element içeriklerini (Na, Mg, Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn, As, Rb, Sr ve Pb), x-ışını floresanı (XRF) ve indüktif eşleşmiş plazma (ICP) cihazları ile analitik yöntemleri kullanarak belirlemeye çalışmışlardır. XRF tekniğinin işlenmemiş bitkisel malzemelerin hızlı kalite kontrolü için birçok etkenli yaklaşım sağladığını, ICP tekniklerinin ise, tıbbi bitkilerin günlük diyet alımında besinsel rolünü belirlemek için çok uygun olduğunu iddia etmişlerdir.

Korkmaz ve ark. (2010), 21 farklı kenevir tohumunun Cu, Zn, Fe, Mn, B, Mo miktarlarını ICPOES ile analiz etmişlerdir. İzlenen iz elementlerden, bulunan en yüksek konsantrasyon demir (98-121 mg/kg), ardından manganez (70-102 mg/kg) ve çinko (46-72 mg/kg) olarak tespit edilmiştir.

Gelişmekte olan ülkelerde insanlar, diyetlerinde çoğunlukla bitki protein kaynaklarına bağımlıdır. Bitki proteinleri fonksiyonel bileşenler olarak kullanılabilir yüksek kaliteli protein kaynağıdır, Tıbbi bitkiler, farklı hastalıkların iyileştirilmesinde

hayati bir rol oynayan biyoaktif bileşiklere sahiptir. Nitrojen, protein molekülünün oluşumunda ve DNA yı oluşturan azotlu bazların yapısında, canlıların temel yapıtaşını oluşturan amino asitlerin ve strese karşı savunma görevi gören sekonder metabolitlerin ve metabolik olaylarda rol alan enzimlerin yapısında bulunması nedeniyle önem taşır.



### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Kimyasal ve solüsyonlar**

Bu çalışmada Duchefa Biochemie B.V.(2003 RV Haarlem, Hollanda) firması tarafından toz halinde üretilen Murashige & Skoog Medium Including Vitamins (M 0222), Murashige & Skoog Medium Including B5 Vitamins (including Gamborg B5 vitamins) (M 0231) ve Murashige & Skoog Medium doku kültürü ortamı olarak (M 0221), Plant Agar katılaştırıcı olarak (P1001), farklı konsantrasyonlarda farklı hormonlar (2.4D, IAA, IBA, BAP, NAA) bitki büyüme düzenleyicileri olarak kullanılmıştır. Etanol olarak Emsure absolute EMO Millipore, USA kullanılmıştır. Ayrıca Inorganic Ventures IV-Stock-8 solution multi standardı, BBOT standardı, Dumatherm marka EDTA (Ethane-1,2-diyldinitrilo tetraacetic acid) standardı kullanılmıştır.

##### **3.1.2. Cihazlar ve ekipmanlar**

Çalışmalarımızda Osram/Puritec HNS 30W G13 UV kaynağı, Nüve MN 120 Mikrobiyolojik Emniyet Kabini, Qiatek mikrotest mci55 inkübatör, Precisa XB22A terazi, Hanna edge ph metre, Nüve OT 40L otoklav, GBS-5000A cam boncuklu sterilizatör, POLARstar Omega, BMG Labtech marka floresens spektrofotometre, Telstar LyoQuerst marka liyofilizatör, Thermoscientific ICAP 6300 Duo marka ICP-OES (indüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi) cihazı (USA), Milestone Ethos Easy Microwave digestion system (mikro dalga yaş yakma), Thermo Scientific CHNS-O Analyser (Elementel Analiz) Flash 2000 cihazı, (Thermo Scientific, USA) ve ICP-OES (Thermo scientific, USA), Gerthard Dumatherm (Dumas, Germany) azot protein cihazı, atomik absorpsiyon spektrometresi (AAS) (Thermo Scientific, USA), Agilent 1100 HPLC DAD (yüksek basınçlı sıvı kromatografi ) (Thermo Scientific,

USA) cihazları, balon jojeler, pensler, cam petriler, mesürler, erlenler, cam kavanozlar kullanılmıştır.

### 3.1.3. Bitki materyali

Çalışmada kullanılan Deve gülü, *Malvacea* ailesine ait olup, Türkiye, Kuzey Irak, Kuzeybatı İran'da 1750-2200m yükseklikteki steplerde yayılım gösteren, çok yıllık, otsu bir bitkidir. Ülkemizde Doğu ve Güneydoğu *Anadolu* Bölgelerinde görülen Deve gülü, vejetasyon dönemini Haziran-Temmuz-Ağustos aylarında tamamlamaktadır. Bitki, vejetasyon dönemi ve yöre halkının tıbbi amaçlar için bitki topladığı aylar dikkate alınarak Haziran-Temmuz ve Ağustos aylarında bitkinin doğru teşhisi ve çalışmaların aksamadan yürütülebilmesi için yeterli miktarda ve farklı dönemlerde toplanmıştır. Bitkinin lokalitesi; ·C9·Van:·Çatak,·Eski Konalga köyünün·güney yamaçları, ·step,·38°·S·033'·1814",·41°·91'·773, ·1961·m, 26.05.2010,·MM79, koordinatlarıdır. Araziden toplanarak bez torbalar içerisinde Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbariyumu'na getirilen bitki örnekleri, bitki sistematigi uzmanı Prof. Dr. Murat Ünal tarafından teşhis edilmiştir.

### 3.2. Deneysel Dizayn

Bu çalışma üç ana bölümden oluşmaktadır (Çizelge 3.1):

#### 1. Doku kültürü çalışmaları

Çalışmalar öncesinde doğadan getirilen bitki tohum ve eksplantlarında kontaminasyonun kırılması için farklı sterilizasyon yöntemleri uygulanarak Deve gülü için standart bir sterilizasyon protokolü oluşturulmaya çalışıldı. Aynı şekilde bitkiyi tohumdan çimlendirmek için farklı yöntemler uygulandı. Çimlenen tohumlardan farklı tip eksplantlar alınarak farklı BBD içeren ortamlarda mikroçoğaltım çalışmaları yapıldı. Kallus oluşturma uygulamaları ve rejenerasyon çalışmaları yapılarak rejenerasyon bitkiciklerin toprağa alıştırılması sağlandı.



2. Farklı vejetasyon dönemlerinde Deve gülü bitkisinin fitokimyasal içeriğinin ve antioksidan kapasitesinin tayini

Bu amacıyla bitkinin öncelikle liyofilize etanol ekstraksiyonu ve su ile infüzyonu yapıldı. Elde edilen ekstraktlar antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla FCR, FRAP ve ORAC deneylerine tabi tutuldu. Fitokimyasal içeriğin belirlenmesi için ekstreler LC-MS/MS ve HPLC-DAD ile analiz edilirken; mineral, ağır metal ve protein içeriklerinin tespiti için ise ICP, AAS ve Azot-Protein cihazları ile analizleri yapıldı.

3. Deve gülü bitkisinin doku kültüründe aktif bileşiklerinin tayini.

Farklı oranlarda UV, sakkaroz ve BBD uygulandıktan sonra örnekler hasad edilerek liyofilize etanol ekstraksiyonları yapılmıştır. Elde edilen ekstreler HPLC-DAD ile analiz edilerek fenolik bileşikleri tespit edilmiştir.

## Çizelge 3. 1. Deneysel Dizayn

Uygulama çeşidi	Uygulama Basamakları
1 Deve güllü Bitkisinin Doku Kültüründe Rejenerasyonu:	<i>a) Kullanılan besiyerler</i> <i>b) Sterilizasyon</i> <i>c) Tohumdan bitki çimlendirme ve bitki tohumlarının sterilizasyonu</i> <i>d) Farklı tip eksplanlar kullanılarak Deve güllü bitkisinin mikroçoğaltımı</i> <i>e) Rejenerasyon çalışmaları</i>
2 Farklı vejetasyon dönemlerinde Deve güllü Bitkisinin Fitokimyasal İçeriğinin ve Antioksidan Kapasitesinin Tayini:	<i>a) Bitki Materyalinin Analizler için Hazırlanması</i> Liyofilize etanol ekstraksiyonu Su ile infüzyonu <i>b) Elde edilen Ekstrelelerle Bitkinin Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi</i> FCR deneyi FRAP deneyi ORAC deneyi <i>c) Bitkinin Fitokimyasal İçeriğinin Belirlenmesi</i> Fenolik bileşiklerin HPLC-DAD ve LC-MS/MS ile analizi Asit hidroliz analizi Mineral madde ve protein miktarının tayini
3 Deve güllü Bitkisinin Doku Kültüründe Aktif Bileşiklerinin Tayini	<i>a) Aktif Bileşikleri Artırma Çalışmaları</i> UV Stresi Uygulama Sakkaroz Stresi Uygulama Bitki büyüme düzenleyicilerinin uygulanması <i>b) Doku Kültüründe Stres Uygulanan Örneklerin Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi</i> Doku Kültürü Örneklerinin Liyofilize Etanol Ekstraksiyonu FCR Deneyi FRAP Deneyi ORAC Deneyi <i>c) Doku Kültüründe Stres Uygulanan Örneklerin Aktif Bileşiklerinin Tayini</i> Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD ve LC-MS/MS ile tespiti <i>d) İstatistik Analizler</i>

### 3.3. Yöntem

#### 3.3.1. Deve gülü bitkisinin rejenerasyonu

Deve gülü bitkisinin rejenerasyon çalışmaları için *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere iki yöntem denenmiştir.

##### 3.3.1.1. Deve gülü bitkisinin *in vivo* rejenerasyonu

Deve gülü bitkisi doğal ortamından getirildikten sonra laboratuvar çalışmalarında bitki organlarının eksplant olarak kullanılması için saksıya ekilmiştir (Şekil 3.1.). Saksı yaz boyunca açık havada bekletilmiş, sonbaharda laboratuvara alınmıştır.



Şekil 3.1. Doğadan getirildikten sonra saksıya ekilen Deve gülü bitkisi.

Eş zamanlı olarak, sürekli bir eksplant kaynağı için bitkinin tohumları (Şekil 3.2) hem laboratuvar dışında hem de laboratuvar içinde saksılara ekilerek çimlendirilmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.2. Bitkinin tohumları.

Ayrıca doğadan getirilen tohumlar iki ay boyunca  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir. İki ay sonunda tohumların dışını çevreleyen kanatları soyularak (Şekil 3.3) dormansi kırma çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 3.3. Tohum kanatlarının soyulduktan sonraki hali.

Yapılan dormansi çalışmaları şu şekildedir;  
 $40^{\circ}\text{C}$  etüve yerleştirilen 500 ml içi steril deiyonize su dolu beher üzerine basit bir çay süzgeci yerleştirilmiştir. Süzgeç içine sığacak şekilde kesilmiş pamuklu bez üzerine

tohumlar bırakılmıştır. Pamuklu bez her 24 saatte bir kez suyla iyice ıslatılarak süzgeçte bekletilmiştir. Etüv 72 saat boyunca sabit ısıyla (40°C) çalıştırılarak ortamın nemli kalması sağlanmıştır. 72 saat sonunda 1 gece +4°C 'de buzdolabında pamuklu bezde bekletildikten sonra bir kısmı MS besiyerine geri kalanları da toprağa ekilmiştir.

Dormansi kırmak için uygulanan diğer bir yöntemde; kapağı açık petri içine yerleştirilen kurutma kağıdı ıslatıldıktan sonra tohumlar içine bırakılmıştır. Oda sıcaklığında 72 saat bu şekilde nemli tutulan tohumlara 24 saatte bir kağıdı ıslatacak kadar su eklenmiştir. 72 saat sonunda bir kısmı MS besiyerine bir kısmı da toprağa ekilmiştir.

Dormansi kırmak için uygulanan başka bir yöntem olarak; tohumlar oda sıcaklığında 3 gün ıslak pamuk içinde bekletildikten sonra steril edilerek besin ortamına ekilmiştir. Ayrıca farklı bir yöntem olarak da tohumlar +4°C'de buzdolabında 2 ay bekletildikten sonra MS besiyerine ve toprağa ekilmiştir.

### **3.3.1.2. Deve gülü bitkisinin *in vitro* rejenerasyonu**

#### Ön çalışmalar

Sterilizasyon protokolü oluşturulmadan önce sterilizasyon ve kallus oluşturma ile ilgili bir dizi ön çalışma yapılmıştır. Yapılan ön çalışmalardan elde edilen bilgiler sonucu aşağıdaki sterilizasyon ve çimlendirme protokolleri oluşturulmuştur.

#### Sterilizasyon

##### i. Alet, ekipman ve çalışma ortamının sterilizasyonu

Doku kültürü çalışmalar laminar hava akımlı steril çalışma kabini (Nüve MN 120 Mikrobiyolojik Emniyet Kabini) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce kabinin iç ve dış kısmı önce %70'lik etil alkol (EtOH) ile silinmiştir. Ardından kabin içerisinde bulunan UV lambası bir saat süre ile çalıştırılmıştır. Tohum ve eksplant sterilizasyonu ve ekimi sırasında kullanılan bütün malzemeler alimünyum

folyo ile sarılarak 1,5 kPa basınç altında 121 °C'ta 20 dakika boyunca otoklavda sterilize edilmiş ve otoklavlama sonrası malzemeler hızlı bir şekilde laminar hava akımlı kabin içerisine alınmışlardır. Kabinde çalışmaya başlamadan önce el ve kolların kabin içerisine giren kısımları %70'lik alkol ile de yıkanmıştır. Eksplantların sterilizasyonu ve ekimi sırasında kullanılan pens, bistüri, makas gibi metal malzemeler çalışma süresince cam boncuklu sterilizatör içinde bekletilmiştir.

#### Kullanılan besiyerler ve sterilizasyonu

Doku kültürü çalışmalarında en iyi sonucu alabilmek için Murashige & Skoog, Vitamin içeren MS, Murashige & Skoog Medium Including B5 Vitamins (including Gamborg B5 vitamins) ve Murashige & Skoog Medium ortamları denenmiştir (4,40g/l). Karbonhidrat kaynağı olarak sakkaroz (30g/l), katılaştırıcı olarak Plant Agar otoklavlanmadan önce eklenmiştir (7g/l). Ortam pH düzeyleri 1M NaOH ve 1M HCl kullanılarak 5.7-5.8 olarak ayarlanmıştır. Besin ortamları 1.5 atmosfer basınç altında 120°C sıcaklıkta 20 dakika tutularak steril edilmiştir. BBD'lerin 1 mg/ml konsantrasyonlarında stok çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler koyu renkli şişelerde +4 °C'ta karanlıkta saklanmıştır. Kullanılacak bitki büyüme düzenleyicilerinden ortamlara ilave edilmiştir. Steril edilen besin ortamlarına BBD'lerin istenilen miktarı mikropipet yardımı ile çekilerek 0.45µm'lik steril filtreden geçirilerek eklendikten sonra 90x15 mm steril petri kutularına dökülmüştür. Kontrol amaçlı BBD içermeyen MS besiyeri kullanılmıştır.

Rejenere olan bitkicikler ½MS besiyerine alınarak köklendirilmeye çalışılmıştır. Ayrıca köklendirmeyi teşvik etmek için 1mg/l IBA içeren besi ortamlarına alınmıştır. Eksplant ekimi yapıldıktan sonra 24±2 °C de 16/8 ışık/karanlık fotoperiyodunda %50-60 nem içeriğine sahip iklim odasında inkübasyona bırakılmıştır. Her çalışma en az üçer petri olacak şekilde ve üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Kültüre alınan eksplantlar her iki hafta sonunda alt kültüre alınmıştır.

i. Bitki eksplantlarının sterilizasyonu

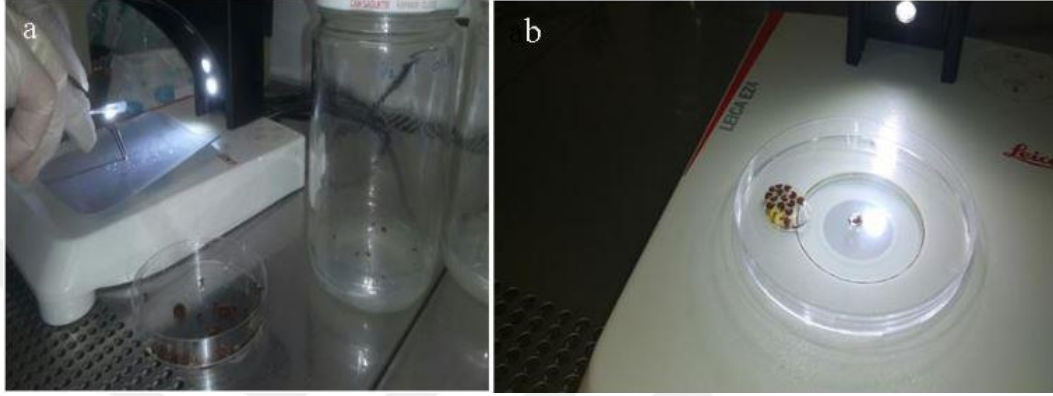
Doğal ortamından saksı içinde getirilen Deve gülü (Hollyhock) bitkisinin yaprak ve yaprak sapları eksplant olarak kullanılmadan önce steril edilmiştir. Bu amaçla yaprak ve yaprak sapları akan çeşme suyunun altında 20dk boyunca toz ve kirden arındırılması amacıyla yıkanmıştır. Yaprak ve yaprak sapları altışar gruba ayrılmıştır. Üç grup sırasıyla % 5 ticari çamaşır suyunda 20 dk., % 10 ticari çamaşır suyunda 20 dk., % 20 ticari çamaşır suyunda 15 dk. olacak şekilde bekletildikten sonra steril sdH<sub>2</sub>O ile 4-5 kez yıkanarak %70 lik EtOH içinde 10 sn. tutulduktan sonra tekrar sdH<sub>2</sub>O ile 4-5 kez yıkanarak ekime hazır hale getirilmiştir Diğer üç grup ise sırasıyla % 0.01 HgCl<sub>2</sub>'de 15 dk., % 0.02 HgCl<sub>2</sub>'de 15 dk. ve % 0.05 HgCl<sub>2</sub>'de 15 dk. bekletildikten sonra steril sdH<sub>2</sub>O ile 4-5 kez yıkanarak % 70'lik EtOH içinde 10 sn. tutulduktan sonra sdH<sub>2</sub>O ile 4-5 kez yıkanarak ekime hazır hale getirilmiştir.

ii. Bitki tohumlarının sterilizasyonu ve tohumdan bitki çimlendirme

Tohumlar sterilizasyona tabi tutulmadan önce etrafındaki kanatlar el ile çıkarılarak uzaklaştırılmıştır. Tohumların sterilizasyonu için sodyum hipokloritin (NaOCl) farklı konsantrasyonları (%5, %7,5 ve %10) kullanılmıştır. 20 dakika bu konsantrasyonlarda çalkalamalı inkübatörde 25°C de 200 rpm hızda bekletilen tohumlar, daha sonra steril distile su ile biyogüvenlik kabini içerisinde 4-5 kez yıkandıktan sonra %70 etil alkol ile 30 saniye muamele edilmiştir. Steril distile su ile 4-5 kez tekrar yıkanmıştır. 42°C lik inkübatörde 24 saat bekletildikten sonra suyu süzölmüş ve 10 dakika da farklı konsantrasyonlardaki (%5, %7,5 ve %10) NaOCl içinde inkübe edilmiştir. Steril distile su ile biyogüvenlik kabini içerisinde 4-5 kez yıkandıktan sonra %70 etil alkol ile 30 saniye muamele edilmiştir. Steril distile su ile 4-5 kez tekrar yıkanmıştır. Ardından tohumlara bistüri ile çentik atılmıştır (Şekil 3.4) 42°C sıcaklıkta inkübasyonun ve tohum kabuğunun çentiklenerek zedelenmesinin Deve gülü tohumlarının bitki doku kültüründe çimlenmesine olan etkisinin araştırılması için tohumlar her bir sodyum hipoklorit konsantrasyonu (%5, %7.5 ve %10) için 3 gruba ayrılmıştır; sadece steril edilenler, steril edilerek 42°C' de bekletilenler ve steril

edilerek 42°C’de bekletildikten sonra bistüri ile çizilerek ekilenler (Çizelge 3.2). Yüze sterilizasyonu uygulanan tohumların çimlenmeleri sırasında bakteri ve mantar üremesi takip edilmiştir. Tohumların çimlenme yüzdeleri “Eş 3.1”deki şekilde hesaplanmıştır:

$$\text{Tohum çimlenme indeksi} = \frac{\text{Çimlenen tohum sayısı}}{\text{ekilen tohum sayısı}} \times 100 \quad (3.1)$$



Şekil 3.4. a. Tohumların ekim öncesi mikroskop altında bistüri ile çizilmesi, b.Çizilen tohumlar.

Çizelge 3. 2. Deve gülü tohumlarının uygulama grupları

Grup Adı	Uygulama
<b>5-SH</b>	% 5 Sodyum hipoklorit ile yüze sterilizasyonu yapılmış tohumlar.
<b>5-SH+42°C</b>	% 5 Sodyum hipoklorit ile yüze sterilizasyonu yapılmış ve 24 saat 42°C de inkübe edilmiş tohumlar.
<b>5-SH+42°C+Z</b>	% 5 Sodyum hipoklorit ile yüze sterilizasyonu yapılmış, 24 saat 42°C de inkübe edilmiş ve tohum kabuğu bistüri yardımıyla çentiklenmiş tohumlar. İnkübasyon sonrası çentiklenmeden önce tohumlar aynı sodyum hipoklorit ile 10 dakika yüze sterilizasyonu uygulanmıştır.
<b>7.5-SH</b>	% 7.5 Sodyum hipoklorit ile yüze sterilizasyonu yapılmış tohumlar.
<b>7.5-SH+42°C</b>	% 7.5 Sodyum hipoklorit ile yüze sterilizasyonu yapılmış ve 24 saat 42°C de inkübe edilmiş tohumlar.
<b>7.5-SH +42°C+Z</b>	% 7.5 Sodyum hipoklorit ile yüze sterilizasyonu yapılmış, 24 saat 42°C de inkübe edilmiş ve tohum kabuğu bistüri yardımıyla çentiklenmiş tohumlar. İnkübasyon sonrası çentiklenmeden önce tohumlar aynı sodyum hipoklorit ile 10 dakika yüze sterilizasyonu uygulanmıştır.
<b>10-SH</b>	% 10 Sodyum hipoklorit ile yüze sterilizasyonu yapılmış tohumlar.



Çizelge 3.2. Deve gülü tohumlarının uygulama grupları (devam)

Grup Adı	Uygulama
10-SH +42°C	% 10 Sodyum hipoklorit ile yüzey sterilizasyonu yapılmış ve 24 saat 42°C de inkübe edilmiş tohumlar.
10-SH +42°C+Z	% 10 Sodyum hipoklorit ile yüzey sterilizasyonu yapılmış, 24 saat 42°C de inkübe edilmiş ve tohum kabuğu bistüri yardımıyla çentiklenmiş tohumlar. İnkübasyon sonrası çentiklenmeden önce tohumlar aynı sodyum hipoklorit ile 10 dakika yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır.

### 3.3.1.3. Farklı tip eksplant kullanılarak Deve gülü bitkisinin mikroçoğaltımı

Doku kültürü ortamında çimlendirilen 14 günlük fidelerden kotiledon, kotiledon sapı, yaprak ve hipokotil eksplant olarak kullanılırken, 28 günlük fidelerden kotiledon, hipokotil, sürgün ucu ve nod eksplant olarak kullanılmıştır. Eksplantlar çeşitli konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS, ortamlarına direkt ve indirekt organogenez için ekilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinden 2.4-D ve IBA kullanılmıştır. Her çalışma en az üçer petri olacak şekilde ve üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Kültüre alınan eksplantlar her iki hafta sonunda alt kültüre alınmıştır.

Çimlendirilen bitkilerden alınan eksplantlar için 2,4 D'nin farklı konsantrasyonları (1 mg/l ve 2 mg/l) bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanılmış ve kallus oluşturulmaya çalışılmıştır. Kontrol amaçlı BBD içermeyen MS besiyeri kullanılmıştır. Düzenli aralıklarla kontrol edilmiştir. Her çalışma üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Kültüre alınan eksplantlar her iki hafta sonunda alt kültüre alınmıştır. Eksplant ekimi yapıldıktan sonra 24±2 °C de 16/8 ışık/karanlık fotoperiyodunda inkübe edilmiştir.

### 3.3.1.4. Rejenere fidelerin doğal ortama alıştırılması

28 günlük çimlendirilen bitkilerden alınan nod ve sürgün uçları altı hafta boyunca MS ortamında inkübe edilmiştir. Rejenere olan bitkiler altı hafta sonra BBD içermeyen köklendirme besiyerine (2.2 g/l MS +20 g/l şeker+4 g/l agar) alındılar. Steril cam kavanozlar içinde 24±2°C de 16/8 ışık/karanlık fotoperiyodunda iklim odasında

inkübe edilerek köklendirilmeye çalışılmıştır. ½MS de köklenmeyen bitkicikler köklenmeyi teşvik amacıyla 1mg/l IBA içeren besi ortamına alınmıştır. Köklenen sürgün uçlarından rejenere olan bitkicikler doku kültüründeki ortamlarından alınarak köklerine zarar vermeden akan çeşme suyu altında doku kültürü kalıntılarından temizlenmiştir. Temizleme işleminden sonra hızlı bir şekilde Klasmann-Deilmann (Almanya) marka organik madde içeren bitki toprağı içeren viallere ekildi. Üç gün boyunca viallerin üzerine streç film geçirilmiş halde 24±2°C de 16/8 ışık/karanlık fotoperiyodunda iklim odasında inkübe edilmiştir. Üç günün sonunda streç film üzerinde delikler açılarak aynı ortam şartlarında bir gün daha bekletildikten sonra streç film çıkarılmıştır. Daha sonra 24±2 °C de 16/8 ışık/karanlık olacak şekilde oda koşullarında büyütülmeye çalışılmıştır. Bitkicikler iki günde bir yarım kuvvet Hoagland solüsyonuyla sulanmıştır. Viallerde gelişen fideler saksılara aktarılmıştır.

### **3.3.2. Farklı vejetasyon dönemlerinde Deve gülü bitkisinin fitokimyasal içeriğinin ve antioksidan kapasitesinin tayini**

Fitokimyasal çalışmalar için kurutularak öğütülen bitki örnekleri, etanol ekstraksiyonu ve suyla infüzyonu yapıldıktan sonra liyofilize edilerek çalışmalar yapılana dek -20C° de saklanmıştır. Deve gülünün farklı vejetasyon dönemlerindeki antioksidan kapasitesini belirlemek için FRAP (Ferrik indirgeme antioksidan gücü), FCR (Folin-Ciocalteu indirgeme gücü), ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) deneyleri yapılmıştır. İçerdiği fenolik asitler tespit edilmiştir. AAS, ICPOES, Elementel analiz ve azot- protein cihazlarıyla mineral, ağır metal, azot ve protein miktarları tespit edilmiştir.

#### **3.3.2.1. Bitki materyalinin analizler için hazırlanması**

Bitki örnekleri toz, kir, zararlılar ve kontaminasyonlardan arındırılmak amacıyla uygun bir şekilde temizlenmiştir. Herbaryum hazırlık odasına serilen kurutma kağıtları üzerine yerleştirilen bitki materyalleri, yöre halkının bitkisel tedavi için kullandığı gölgede havayla kurutma yöntemi ile kurutulmuştur (Şekil 3.5.). Bitkilerin

kurutulmasında kullanılan kurutma kağıtları gün aşırı değiştirilmiştir. 14-21 gün boyunca gölgede kurutulan bitki materyalleri kauçuk eldiven kullanılarak küçük parçalara ayrıştırılmıştır. Bitkisel materyalin çözücü ile daha iyi bir şekilde etkileşmesini sağlayan geniş ekstraksiyon alanı elde etmek amacıyla bitki parçacıkları, öğütücü yardımı ile toz materyal haline getirilerek plastik kaplara konulmuş ve kapak parafilm ile kapatılmıştır. Bitki materyalleri HPLC, AAS, ICP ve Azot-Protein cihazında yapılacak analiz işlemlerine başlanana kadar, +4°C'de saklanmıştır. Analizler için gereken miktarlarda tartılarak analize hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.5. Deve gülü yaprakları; a Kurutulmuş, b Öğütülmüş.

#### Deve gülü bitkisinin liyofilize etanol ekstraksiyonu

Liyofilize ekstre Dalar ve Konczak (2013) metodunun modifiye edilmiş şekline göre hazırlandı. Her üç vejetasyon dönemine ait kurutulmuş ve öğütülmüş bitki örneklerinden 15'er gr tartılarak, ayrı ayrı cam beherlere konuldu ve 1/20 v/v olacak şekilde 300 ml asidifik etanol (%80 etanol+ %1HCl+ % 19 ultra saf su) ile ekstre edilerek, beherin üzeri alüminyum folyo ile kapatıldı. +4°C'de, 2 saat süreyle çalkalayıcıda homojenize edildi. Homojenize karışım 20 dk. boyunca, 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen supernatant enjektör yardımı ile 0.45 µm'lik hidrofilik filtreden geçirilerek evaporatör yardımıyla +37°C'de çözücünden arındırıldı. Supernatanttan arta kalan topak aynı işlemlere yine tabi tutulduktan sonra elde edilen yoğunlaştırılmış fraksiyonlar, -51 °C sıcaklık ve 50 millitor basınç altında liyofilizatör cihazında 3 gün süreyle bekletildi. Elde edilen liyofilize hidrofilik ekstreler, analiz

işlemlerine başlanana kadar,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Liyofilize ekstrere  $1\text{mg/ml}$  oranında kendi çözücüsü ile muamele edilip tekrar çözdürüldü.  $20\text{ml}$  lik cam tüpler, içinde daha iyi çözünmesi için  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  sonikasyon cihazında 15 dakika bekletildi. Ardından  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  lik filtreden süzülerek analizlere hazır hale getirildi (Şekil 3.7. a,b,c,d).



Şekil 3.6. Deve gülü bitkisinin ekstraksiyon aşamaları: a.homojenizasyon, b ve c süzme, d. Filtrasyon.

#### Deve gülü bitkisinin su ile infüzyonu

Her üç vejetasyon dönemine ait kurutulmuş ve öğütülmüş bitki örneklerinden  $15\text{ gr}$  tartılarak, ayrı ayrı cam beherlere konuldu ve  $1/20\text{ v/v}$  olacak şekilde  $300\text{ ml}$

kaynamakta olan su eklendi. Üzerine kapak kapatılarak 15 dakikada bir karıştırıldı. Soğuduktan sonra nuçe erleninde süzöldü ve evaporatör yardımıyla +37°C’de suyu uçuruldu. Elde edilen yoğunlaştırılmış fraksiyonlar, -51°C sıcaklık ve 50 millitor basınç altında liyofilizatör cihazında 3 gün süreyle bekletildi. Elde edilen liyofilize ekstreler 1mg/ml oranında kendi çözücüsü ile muamele edilip tekrar çözdüröldü. 20ml’lik cam tüpler, içinde iyice çözünməsi için 37°C lik sonikasyon cihazında 15 dakika bekletildi. Ardından 0,45 µm lik filtreden süzölerek analizlere hazır hale getirildi.

#### Deve gülü bitkisinin ekstraksiyon veriminin hesaplanması

Ekstraksiyonu yapılan bitki örnekleri liyofilizasyon öncesi ve sonrası tartılarak % verimi “Eş 3.2” deki gibi hesaplanmıştır. Liyofilize edilecek örnekler tartıldıktan sonra, ağırlığı belirlenen plastik tüpler içinde liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonrası kuru bitki tüple birlikte tartıldıktan sonra başlangıçtaki yaş ağırlık+tüpün ağırlığından çıkarılarak bitkinin kaybettiği ağırlığı hesaplanmıştır. Aradaki fark % olarak hesaplanarak % verimi belirlenmiştir:

$$\text{Liyofilizasyon öncesi yaş ağırlık} - \text{Liy. sonrası kuru ağırlık} = \text{verim} \quad (3.2)$$

$$\% \text{ verim} = \text{verim} \times 100 / \text{yaş ağırlık}$$

#### **3.3.2.2. Deve gülü bitkisinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi**

Deve gülü bitkisinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için Folin-Ciocalteu indirgeme (FCR) deneyi, Ferrik indirgeme antioksidan gücü (FRAP) deneyi ve Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) deneyi yapılmıştır.

#### Folin-Ciocalteu indirgeme (FCR) deneyi

Folin-Ciocalteu indirgeme (FCR) metodu, Dalar ve ark., (2012)’ye göre belirlenmiştir. Saf su ile seyreltilmiş bitki ekstrelerinden 25 µl, 96 havuzlu mikrotablaya eklendikten sonra (Şekil 3.6.) üzerine daha önceden saf su ile seyreltilmiş (1:10 h/h) Folin-Ciocalteu reaktif solüsyonundan 125 µl eklenerek 3 dk. süreyle çalkalayıcıda

bekletilmiştir. Bunu müteakip, askorbik asit tashihi/düzeltilmesi (ekstredeki askorbik asit değerinin, total indirgeme değerinden düşülmesi) için, spektrofotometre kullanılarak 600 nm’de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, mikrotablaya 125 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sodyum karbonat) eklenerek 12 dk. süreyle çalkalayıcıda bekletilmiştir. 600 nm’de absorbans ölçümü yapıldıktan sonra, gallik asit standart eğrisi ve standardize edilmiş kontrol kullanılarak, bitki ekstrelerindeki Folin-Ciocalteu indirgeme gücü, mg Gallik asit eşdeğeri mg/g drog ağırlık olarak hesaplanmıştır. Analiz işlemleri en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elektron transfer reaksiyonu indirgeyiciler ve Mo (VI) arasında “Eş 3.3” deki gibi gerçekleşir:



Şekil 3.7. FCR deneyi esnasında görülen renk değişimi.

Fenolik bileşiklerin gallik asit eşdeğerlerinde (GAE) bitki özütlerindeki toplam içeriği “Eş 3.4” formül denklemiyle hesaplandı.

$$C = (c \times V)/m \quad (3.4)$$

C = GAE'de fenolik bileşiklerin toplam içeriği, mg/g bitki ekstresi;

(bitkinin ekstrede kullanılan tozunun gram başına düşen miktarı olarak)

c = Kalibrasyon eğrisinden oluşturulan gallik asit konsantrasyonu, mg/ml;

V = ekstraktın hacmi, ml;

m = saf bitki metanolik ekstraktının ağırlığı, g.

### Ferrik indirgeme antioksidan gücü (FRAP) deneyi

Bitki ekstralarının ferrik indirgeme kapasitelerinin belirlenmesi işlemi, Dalar ve ark., (2012) metoduna göre yürütülmüştür. Öncelikli olarak; 300 mmol/l'lik asetat tamponundan 10 ml, 20 mmol/l'lik FeCl<sub>3</sub>'ten (Ferric clorid) 10 ml ve 10 mmol/l'lik TPTZ solüsyonundan 1 ml içeren FRAP reaktif solüsyonu hazırlanmıştır. FRAP reaktif solüsyonunda kullanılan kimyasal maddeler aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

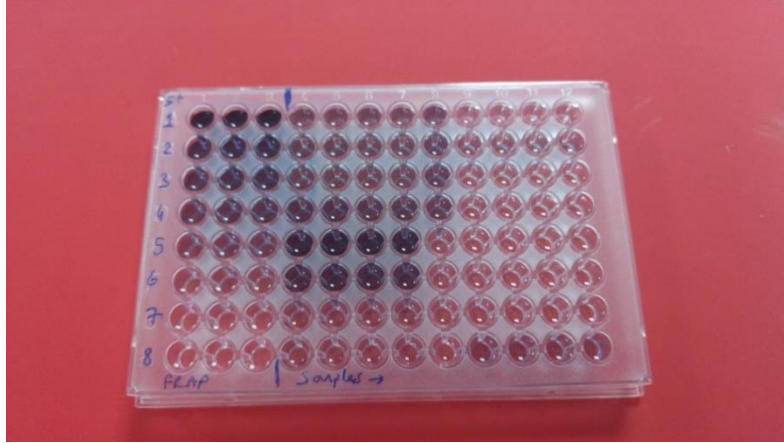
*Asetat tamponu:* 1 litre ultra saf suya, 3.1 g sodyum asetat ve 16 ml asetik asit eklenerek pH'ı 3.6'ya ayarlanmıştır.

*TPTZ (2,4,6-Tripiridil-s-triazin) solüsyonu:* 10 ml hidroklorik aside, 31.2 mg TPTZ eklenmiştir. Saf su kullanılarak seyreltilen bitki ekstralarından 10 µl, 96 havuzlu mikrotabluya eklendikten sonra (Şekil 3.7) üzerine 200 µl FRAP reaktif solüsyonu eklenmiştir. 15-20 sn. kadar çalkalayıcıda bekletildikten sonra, 8 dk. boyunca inkübe edildikten sonra, spektrofotometre kullanılarak 600 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bitki ekstralarının total indirgeme kapasitesi, Fe<sup>2+</sup>'nin standart eğrisi ve standardize edilmiş kontrol kullanılarak, µmol Fe<sup>2+</sup>/g (bitkinin ekstrede kullanılan tozunun gram başına düşen miktarı) kuru ağırlık olarak hesaplanmıştır. Analiz işlemleri en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımının artan absorbansı, indirgeyici gücü arttırdığını göstermiştir. Yöntemin hesaplanması "Eş.3.5" de verilmiştir.

Yüzde (%) Azaltma kapasitesi aşağıdaki denklemden hesaplanmıştır:

$$\{(A_m - A_b)/A_b\} \times 100 \quad (3.5)$$

A<sub>m</sub>, reaksiyon karışımının absorbansı ve A<sub>b</sub>, blankın (kör) absorbansı.



Şekil 3.8. FRAP deneyi esnasında görülen renk değişimi.

### Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) deneyi

Oksijen radikal süpürme kapasitesinin belirlenmesi işlemi, Konczak ve ark. (2010) metoduna göre gerçekleştirilmiştir. İlk olarak; fosfat tamponu (75 mM, pH 7.0) kullanılarak, floresin (120 nM) ve AAPH [(2,2-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid)] (360 mM) hazırlandı. 96 havuzlu mikrotabluya, kontrol ve fosfat tamponu ile seyreltilmiş bitki ekstraksiyonlarından 20 µl eklendi ve +37°C'ye ayarlanmış bir floresens spektrofotometreye (POLARstar Omega, BMG Labtech, Almanya) yerleştirildi. Daha sonra, 120 µl floresin mikrotabluya eklendi. Bunu müteakip, 20 µl AAPH mikrotabluya eklendi ve floresens ölçümleri başlatıldı. Floresens sıfırlanıncaya ve kinetik eğri oluşturuluncaya kadar dakikada bir floresens (eksitasyon dalga boyu 495 nm ve emisyon dalga boyu 515 nm) ölçümleri kaydedildi. Kinetik eğrinin altındaki bölge hesaplandı ve kontrol örneği kullanılarak standardize edildi. Tüm ölçümler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Bitki ekstraktlarının oksijen radikal absorbans kapasiteleri Troloks'un standart eğrisi kullanılarak, µmol Troloks eşdeğeri/g kuru ağırlık drog (bitkinin ekstrede kullanılan tozunun gram başına düşen miktarı olarak) belirlendi.



### 3.3.2.3. Deve gülü bitkisinin fitokimyasal içeriğinin belirlenmesi

Deve gülü bitkisinin fenoliklerin tanımlanması ve miktar tayini yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kütle spektrometrik detektör (LC-MS) ile yapılmıştır.

#### Fenolik bileşiklerin HPLC-DAD ile analizi

Ekstrede bulunan fenolik bileşiklerin tanımlanması ve konsantrasyonlarının belirlenmesi işlemleri Dalar ve Konczak (2013)'a göre, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analitik yüksek basınçlı sıvı kromatografisi +30°C'de yürütülmüŐ ve örnekler 250 nm, 280 nm, 326 nm, 370 nm ve 520 nm dalga boylarında kontrol edilmiştir. HPLC analizlerinde kullanılan sistemler ve gradient programı aşağıda sunulmuştur (izelge 3.3 ve 3.4). Çalışmada HPLC'ye özgü fenolik bileşik standartları kullanılmıştır. Analiz işlemi için HPLC'ye yüklenen tüm bitki ekstreleri ve standartlar enjektör yardımı ile 0.22 µm'lik hidrofilik filtreden geçirilerek filtre edilmiştir.

Fenolik bileşiklerin tanımlanması işlemi, ko-kromatografi, fenolik bileşik standartlarının spektral karakteristikleri ve geliş zamanları ile mukayese edilmesi sonucu gerçekleştirilmiştir. Total fenolik içerikleri ve maksimum dalga boyunda tespit edilen tekil fenolik bileşikler; 280 nm'de Gallik asit (mg GA), 326 nm'de Kaffeik asit ve onun esteri olan Klorojenik asit (mg KA) standartlarının eŐdeĐerlerinin, ekstrenin kuru ağırlığının gram başına düşen miktarları olarak hesaplanmıştır. Kantitatif analizler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. 3. HPLC analizlerinde kullanılmış olan sistemler

Sistem	Özellikleri
Detektör	DAD (SPD-M10ADVP)
Oto enjektör	SIL-10ADVP
Sistem kontrolcüsü	SCL-10A
Pompa	LC-10ADVP
Degaze	DGU-12A
Kolon fırını	CTO-1-ADVP
Kolon	Waters Atlantis DC <sub>18</sub> , (4.6 mm×100 mm), 5 µm
Mobil faz	A: %0.5 TFA (Trifloroasetik asit) + %95 Ultra saf su. B: %0.5 TFA + %4.5 Ultra saf su + %95 Asetonitril.
Akış hızı	1 ml/da
Enjeksiyon hacmi	10 µl
Kolon sıcaklığı	30 °C

Çizelge 3. 4. HPLC analizlerinde kullanılan gradient programı

Zaman (dakika)	A <sup>1</sup> (%)	B <sup>2</sup> (%)
2	100	0
5	80	20
10	60	40
15	40	60
20	20	80
25	0	100
30	0	100
32	100	0
40	100	0
40.01	0	0

<sup>1</sup> %0.5 TFA (Trifloroasetik asit), <sup>2</sup> %0.5 TFA + %4.5 Ultra saf su + %95 Asetonitril.

### LC-PDA-MS/MS ile Analizi

Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi analizleri; dört parçalı çözücü iletim sistemi, kolon fırını ve çoklu fotodiyod dedektör (PDA) ile donanımlı, Quantum triple stage quadrupole (TSQ) kütle spektrometresi (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, ABD) ile yürütüldü. Çoklu fotodiyod dedektörü, 190-520 nm aralığında bulunan verileri elde etmede kullanıldı. Kütle spektrometresi analizleri; tam tarama, nötral analiz ve hedef reaksiyon görüntüleme (SRM) modları kullanılarak yürütüldü. Çalışmada incelenen ekstratlar 1 mg/ml konsantrasyonunda hazırlandı. Kütle spektrumu için gerekli olan iyonlar elektrosprey kaynağı kullanılarak elde edildi. Analiz işlemleri için pozitif

ve negatif modlar kullanıldı. Pozitif mod optimizasyonu için kuersetin-3-glikozit ve negatif mod optimizasyonu için klorojenik asit kullanıldı. LC-MS analizlerinde kullanılan sistemler (Çizelge 3.5) ve gradient programı (Çizelge 3.6) aşağıda sunulmuştur.

Çizelge 3. 5. LC-MS analizlerinde kullanılan sistemler

Sistem	Özellikleri
Kolon	Phenomenex Luna Synergy Hydro (2.1 mm×150 mm), 5 µm
Mobil faz	A: %0.5 Formik asit + %99.5 Ultra saf su. B: %0.5 Formik asit + %99.5 Asetonitril.
Akış hızı	200 µl/dakika
Enjeksiyon hacmi	3 µl
Kolon sıcaklığı	30 °C
İyon kaymağı	Elektrosprey iyonlaşma
İyon modu	Pozitif ve negatif
Mod Optimizasyonu	Klorojenik asit (negatif) ve Kuersetin-3-glukozid (pozitif)

Çizelge 3. 6. LC-MS analizlerinde kullanılan gradient programı

Zaman (dakika)	A <sup>1</sup> (%)	B <sup>2</sup> (%)
2	100	0
8	60	40
16	40	60
20	0	100
22	100	0
22.01	0	0

1 %0.5 Formik asit + %95 Ultra saf su, 2 %0.5 Formik asit + %95 Asetonitril.

### Asit hidroliz analizi

Asit hidroliz işlemi için, ekstrelerden 10 mg tartılıp, cam tüpe konuldu, ve 2 ml 2N Triflorik asit (TFA) ile muamele edildi. Tüp ısıtıcıya yerleştirilen ve 2 saat süreyle, +120 °C'de bekletilen solüsyonlar 5 ml'lik volumetrik şişelere aktarıldı ve %80'lik metanol ile hacim 10 ml'e tamamlandı ve filtre edilerek HPLC-MS/MS kullanılarak ilgili analiz işlemleri yürütüldü.

### Mineral madde ve protein miktarlarının tayini

#### *Bitki materyaline uygulanan işlemler*

Bitkisel materyalin çözücü ile daha iyi bir şekilde etkileşmesini sağlayan geniş ekstraksiyon alanı elde etmek amacıyla bitki parçacıkları, öğütücü yardımı ile toz materyal haline getirilmiştir. Bitki örneklerine ait mineral içerikleri, HNO<sub>3</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> asit solüsyonları kullanılarak mikrodalga ekstraksiyon sistemi ile homojenize edilerek AAS (Atomik Absorbsiyon Spektrometresi), ICP-OES (Eşleşmiş plazma spektrometresi), cihazları kullanılarak tespit edildi. Tüm element miktarları mg/kg ve µm/kg kuru ağırlık cinsinden hesaplandı. Elementlerin limit değerlerini tespit için Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü referans malzemeleri kullanıldı. AAS ve ICPOES cihazlarında bitki analiz edilmeden önce Milestone Ethos Easy Microwave digestion system (mikro dalga yaş yakma) cihazında çözünürleştirildi. Bunun için 200 mg kurutulmuş bitki örneğine 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 6 ml HNO<sub>3</sub> eklenerek teflon tüplere bırakıldı. 200°C de, 35 bar basınçta, 45 dakika boyunca Milestone Ethos Easy Microwave digestion system cihazında çözünürleştirildi.

#### *Atomik absorbsiyon cihazı analizleri*

Yaş yakma işleminden sonra bitki örneklerini içeren sıvılar AAS cihazında Fe, K, Ca, Na ve Mg elementlerinin tespiti yapılmadan önce 101 kat bidistile suyla seyreltildi. Cu, Zn, Mn analizleri için seyreltme yapılmadı. Thermo Scientific marka

AAS cihazıyla analizler yapıldı. Çizelge 3.7. Atomik Absorbsiyon cihazının analiz esnasındaki optimum özellikleri verilmiştir.

Çizelge 3. 7. Atomik Absorbsiyon cihazının analiz esnasındaki optimum özellikleri

Elementler	Dalga boyu (nm)	yakıt	Bant geçişi(nm)	Oxitleyici	Hesaplama türü
Na	589.0	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	0.5	hava	integral
K	766.5	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	0.5	hava	integral
Mg	285.2	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	0.5	hava	integral
Ca	422.7	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	0.5	hava	integral
Mn	279.5	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	0.2	hava	integral
Fe	248.3	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	0.2	hava	integral
Cu	324.8	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	0.5	hava	integral
Zn	213.9	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	0.2	hava	integral

Na;sodyum, K:potasyum, Mg; magnezyum, Ca; kalsiyum, Mn; mangan, Fe; demir, Cu;bakır, Zn; çinko.

#### ICP-OES cihaz analizleri

Thermoscientific ICAP 6300 Duo marka ICP-OES cihazıyla Cd, Co, Cr ve Se tespiti için yaş yakma işleminden sonra sıvılar 5 kat seyreltildi. Cihaz analizlerinden sonra aşağıdaki işlemlere göre miktarları hesaplandı. ICPOES cihazında Inorganic Ventures IV-Stock-8 multi standardı kullanıldı. Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8'de analizler esnasında ICP-OES cihazı optimum ve enstrumental özellikleri verilmiştir.

Çizelge 3. 8. Analizler esnasında ICP-OES cihazı optimum özellikleri

ICP-OES cihaz özellikleri	
Yıkama pompa hızı	100 rpm
Analiz pompa hızı	50 rpm
Pompa stabilizasyon süresi	5 s.
RF gücü	950W
Yardımcı gaz akışı	0.5 l/da.
Nebulizatör gaz akışı	0.55 l/da

Çizelge 3. 9. ICP-OES cihazının analiz esnasındaki enstrümental özellikleri

ICP-OES cihazının analiz esnasındaki enstrümental özellikleri			
Elementler	Dalgaboyu(nm)	Korelasyon tipi	korelasyon
Cd	361.051	linear	0.9988
Co	237.862	linear	0.9999
Cr	283.563	linear	0.9999
Se	196.090	linear	0.9998

Cihaz analizlerinden sonra “Eş 3.5” deki işlemlere göre miktarları hesaplandı.

Atomik absorpsiyon ve ICPOES ile yapılan analiz sonucu şu şekilde hesaplanmıştır:

$Sf_1$ = seyreltme faktörü

$Sf_T$ =bitkideki mineral miktarı

$$Sf_1 = \frac{\text{yaş yakmanın seyreltildiği son hacim}}{\text{yaş yakma için tartılan bitki miktarı}} \quad (3.5)$$

$Sf_T = Sf_1 \times \text{seyreltme katsayısı} \times \text{cihazda okunan değer}$

#### *Protein ve N, analizleri*

Kurutulmuş bitki öğütüldükten sonra Dumas yöntemiyle, Gerhardt Dumatherm Azot-Protein cihazıyla azot ve protein miktarları tespit edilmiştir. Bunun için 50 mg kuru bitki örneği tartılarak aleminyum folyolar içinde 900°C de cihaz içinde yakılarak N ve protein miktarları tespit edildi. Standart olarak Dumatherm marka EDTA

### **3.3.3. Deve gülü bitkisinin doku kültüründe aktif bileşikleri artırma çalışmaları**

Deve gülü bitkisinin aktif bileşiklerini arttırmak için UV, sakkaroz ve BBD uygulanmıştır.

#### **3.3.3.1. UV uygulaması**

MS besiyerinde 4 hafta boyunca inkübe edilen sürgün uçlarına Osram/Puritec HNS 30W G13 UV-C (254 nm) kaynağı kontrol 0, 15 ve 30 dakika boyunca 20 cm

mesafeden uygulanmıştır. Uygulamadan sonraki 4. Gün (96 saat sonunda) örnekler hasat edilmiştir. İşlemlere tabi tutuluncaya kadar -20°C de muhafaza edilmiştir. Antioksidan kapasite ve fitokimyasal içerik analizleri için bölüm 3.3.2.1.de anlatıldığı şekilde liyofilize edilmiştir.

### **3.3.3.2. Sakkaroz uygulaması**

MS besiyerinde 4 hafta boyunca inkübe edilen sürgün uçları 15g/l, 30 g/l (kontrol) ve 45g/l sakkaroz içeren MS ortamlarında 24±2°C de, 16/8 fotoperiyot koşulları altında 28 gün boyunca sakkaroz stresine maruz bırakılmıştır. İşlemlere tabi tutuluncaya kadar -20°C de muhafaza edilmiştir. Antioksidan kapasite ve fitokimyasal içerik analizleri için bölüm 3.3.2.1.de anlatıldığı şekilde liyofilize edilmiştir.

### **3.3.3.3. Farklı hormon konsantrasyonlarının uygulanması**

MS besiyerinde 4 hafta boyunca inkübe edilen sürgün uçları 1mg/l NAA, 1mg/l BA, 0.5mg/l BA+0.5mg/l NAA ve BBD içermeyen kontrol olmak üzere farklı BBD kombinasyonları ve konsantrasyonları içeren MS ortamlarına ekilmiştir. 24±2°C de, 16/8 fotoperiyot koşulları altında 28 gün boyunca inkübe edilmiştir. İşlemlere tabi tutuluncaya kadar -20°C de muhafaza edilmiştir. Antioksidan kapasite ve fitokimyasal içerik analizleri için bölüm 3.3.2.1.de anlatıldığı şekilde liyofilize edilmiştir.

### **3.3.4. Deve gülü bitkisinin doku kültüründe antioksidan kapasitesinin ve aktif bileşiklerinin belirlenmesi**

Deve gülü bitkisinin doku kültüründe antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için öncelikle örneklerin liyofilize etanol ekstraksiyonları yapılmıştır. Ardından Folin-Ciocalteu indirgeme (FCR) deneyi, Ferrik indirgeme antioksidan gücü (FRAP) deneyi ve Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) deneyleri yapılmıştır. Son olarak da fenolik asitleri HPLC ve LC MS/MS ile tespit edilmiştir.

### 3.3.4.1. Doku kültürü örneklerinin liyofilize etanol ekstraksiyonu

Rejenere edilmiş ve stres uygulanmış örnekler, liyofilizatör cihazında 50 millitor basınç altında  $-52^{\circ}\text{C}$  de 72 saat boyunca liyofilize edilmişlerdir. Liyofilize olan örnekler, spatül yardımıyla toz hale getirilip, ekstraksiyonları yapılarına kadar  $-20^{\circ}\text{C}$  de saklanmıştır.

Hidrofilik sıvı etanol ekstraksiyon hazırlanması işlemleri Dalar ve ark. (2012) metoduna göre hazırlandı. Toz haline getirilmiş bitki parçacıkları en az 3 tekrarlı olmak üzere 50'şer mg tartılarak 2 ml'lik ependorf tüplerine konuldu ve 1 ml asidifik etanol (%80 etanol+%1 HCl+%19 ultra saf su) ile ekstre edildi. Tüp karıştırıcı yardımı ile iyice çalkalandıktan sonra, homojenizasyon için 15 dakika boyunca sonikatörde bekletildi. Homojenize edilen örnekler, santrifüj cihazına konularak, 10.000 rpm'de, 10 dk. boyunca santrifüj edildi. Elde edilen supernatant, 20 ml'lik temiz şişelere aktarıldı. Arta kalan bitki çökeltileri, aynı ekstraksiyon işlemlerine 2 defa daha tabi tutuldu. Elde edilen tüm supernatantlar birleştirildi ve analiz işlemlerine başlanana kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Elde edilen liyofilize ekstreler kullanılarak FCR, FRAP ve ORAC antioksidan kapasite tayini için, HPLC-DAD ve LC-MS/MS kullanılarak fenolik madde tayini bölüm 3.3.2.3'de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

### 3.3.5. İstatistiki analizler

Yapılan deneyler en az üç tekrarlı olarak yapılmış ve istatistiki olarak anlamlılık  $p<0.05$  olarak değerlendirilmiştir. İstatistiki olarak varyans analizi Minitab One-Way Anova (Tukey) çoklu karşılaştırma testine göre yapılmıştır.

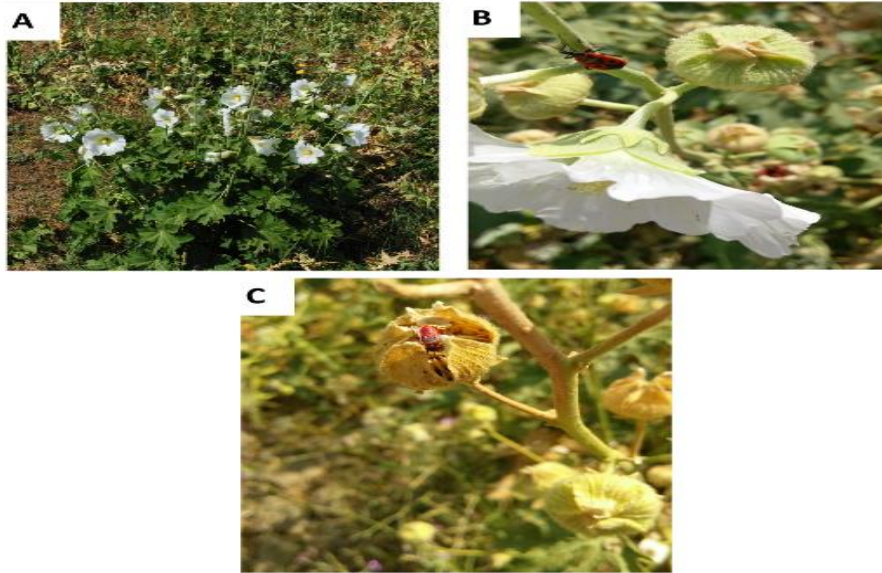


## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Deve gülü Bitkisinin Teşhisi ve Genel Özellikleri

Araziden toplanarak bez torbalar içerisinde Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na getirilen bitki örnekleri, bitki sistematigi uzmanı Prof. Dr. Murat nal tarafından teşhis edildikten sonra, farklı bitki türleri ile karışmasını önlemek amacıyla tek tek ayıklanmıştır.

Çok yıllık, otsu bir bitki olan Deve gülü-Hollyhock, 20-80 cm yükseklikte, dik, tabandan itibaren dallanmış görünümdedir. Gövde apı 2-7 mm, silindirik, tüysüz veya nadiren seyrek yıldızsı tüylü, taban yaprakları palmatilobat, yaprak sapı 3-10 cm. yıldızsı tüylüdür. iek rengi pembe, beyaz , sarı olabilmektedir. iek sapı 5-20 mm ve yıldızsı tüylüdür. 750-2500 m yükseklerde yayılış gösteren Deve gülü bitkisine kalkerli kayalıklar, yamaçlar, step ve yol kenarında rastlanmaktadır (Şekil 4.1). (Uzunhisarcıklı ve Vural, 2012).



Şekil 4.1. Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerindeki görünümü: a. Çiçeklenme (Haziran), b. meyve (Temmuz), c. Tohum (Ağustos).

## 4.2. Deve gülü bitkisinin mikrooaltım alışmaları

Deve gülü bitkisinin rejenerasyon çalışmaları için *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere iki yöntem denenmiştir.

### 4.2.1. Deve gülü bitkisinin *in vivo* rejenerasyonu

Deve gülü bitkisi doğal ortamından getirildikten sonra laboratuvar çalışmalarında bitki organlarının eksplant olarak kullanılması için saksı içine alınmıştır. Saksı yaz boyunca açık havada bekletilmiş, sonbaharda laboratuvara alınmıştır. Saksıda büyüyen bitki kurumaya başlayınca sürekli bir eksplant kaynağı için bitkinin tohumları hem laboratuvar dışında hem de laboratuvar içinde saksılara ekilerek imlendirilmeye çalışılmıştır. Deve gülü bitkisinin doğal ortamı olan 2500 m. yükseklikteki Konalga köyünün coğrafik şartları, ısı ve ışık şiddeti farkı ve toprağın mineral içeriğinin saksı ortamından farklı olmasının bitkinin kurumasında etkili olduğu düşünülmektedir.

Çimlenen bitkilerin yetersiz olması nedeniyle hedeflenen doku kültürü çalışmaları yapılamamıştır. Çimlenme zamanını hızlandırmak için bölüm 3.3.1.1'de anlatıldığı şekilde dormansi kırma çalışmaları yapılmış ancak bu çalışmaların hiçbirinde tohum çimlenmesi için başarı sağlanamamıştır.

Eksplantlarla yapılan sterilizasyon çalışmalarının değerlendirilmesi neticesinde bitki tohumlarını steril ortamda imlendirerek oluşan bitkiciklerden eksplant alınması hedeflenmiştir. Bu amaçla bitkinin tohumlarıyla sterilizasyon çalışmaları yapılmıştır.

### 4.2.2. Deve gülü bitkisinin *in vitro* rejenerasyonu

#### n alışmalar

Deve gülü bitkisinin doğadan getirilen örnekleriyle bir dizi n çalışma yapılmıştır (izelge 4.1, izelge 4.2 ve izelge 4.3). Bu çalışmalarda farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda BBD içeren MS ortamlarına eksplantlar ekilmiştir. Ancak gerek sterilizasyon protokolünde gerekse kallus oluşturma çalışmalarında başarı

elde edilememiştir. Bu çalışmalar sonunda bölüm 3.3.1.2’de anlatılan sterilizasyon protokolü denenmiş ve bölüm 4.2.2’de anlatıldığı üzere başarı sağlanarak çalışmalara devam edilmiştir.

Çizelge 4. 1. Deve gülü Bitkisiyle Yapılan Ön Çalışmalar

Uygulanan Sterilizasyon	Ortam	Eksplant	Sonuç
%10 çamaşır s.10 dk+3sn %70lik etanol	MS+1K+2mg/l 2,4D	Sap, yaprak	Kontaminasyon görüldü. kallus oluşumu çok zayıf.
% 3 çamaşır s.5dk+3sn %70lik etanol	MS+1K+2mg/l 2,4D	sap	boyuna büyümüş yaprak ve sap
% 10çamaşır s.10 dk+3sn %70lik etanol	MS+5mg/l 2,4D	Sap, yaprak	Gelişme yok, sapta çok zayıf kallus oluşumu.
% 3çamaşır s.5dk+3sn %70lik etanol	MS+5mg/l 2,4D	Sap, yaprak	Sap 3 katı uzunluğa ulaştı, yaprakta kallus çok zayıf
% 10çamaşır s.10 dk+3sn %70lik etanol	MS+3NAA+1BAP	yaprak	gelişme yok
% 10çamaşır s.10 dk+3sn %70lik etanol	MS+3NAA+1BAP	Sap, yaprak	Eksp.boyca büyüdü,kallus yok
% 10çamaşır s.10 dk+3sn %70lik etanol	MS+2NAA+1BAP	Sap, yaprak	Boyca büyüme, sap ucunda küçük kallus
% 10çamaşır s.10 dk+3sn %70lik etanol	B5+2NAA+1BAP	Sap, yaprak	Gelişme yok
% 10çamaşır s.10 dk+3sn %70lik etanol	B5+2NAA+1BAP	Sap, yaprak	
% 10çamaşır s.10 dk+3sn % 70lik etanol	MS+1NAA+1BAP	Sap, yaprak	Boyca büyüme
%10çamaşır s.10 dk+3sn %70lik etanol	MS+1NAA+1BAP	yaprak	Küçük kallus
% 10çamaşır s.10 dk+3sn % 70lik etanol	MS+0.5NAA+1BAP	yaprak	Yapraklar çok büyüdü,3 yapraktan birinin ucunda kallus oluştu

Çizelge 4.1'deki uygulamalar sonucunda istenen başarı elde edilemediği ve uygulanan sterilizasyonun başarılı olmaması nedeniyle farklı uygulamalar denenmiştir.

Çizelge 4. 2. Deve gülü bitkisiyle yapılan ön çalışmalar

sterilizasyon	Ortam	sonuç
3sn % 70lik etanol +% 3çamaşır s.5 dk	MS	4 explanttan 2sinde kallus
3sn % 70lik etanol +% 3çamaşır s.5 dk	5mg/l 2,4D	Küçük kallus,
3sn % 70lik etanol +% 3çamaşır s.5 dk	3NAA+1BAP+MS	Gelişim yok yaprak kenarlarında kıvrılma
3sn % 70lik etanol +% 3çamaşır s.5 dk	0.5NAA+1BAP+ MS	kalluslar büyümüş, kök veya sürgün yok
3sn % 70lik etanol +% 3çamaşır s.5 dk	0.5NAA+1BAP+ B5	Gelişim yok

Çizelge 4. 3. Eksplantlar çizelgede belirtilen alt kültürlerle alınmıştır

1.ORTAM	2.ORTAM	SONUÇ
MS sonraki denemelerde de kallus gözlemlendi y.sapında		hepsinde kallus %100
MS de kallus oluştu	5ppm 2.4D li ortama aktardım+MS	gelişme olmadı (30 gün)
5 mg/l 2,4D+MS		sap lar boyca uzadı,yapraklar genişledi,kallus 2 saptan birinde çok zayıf kallus
MS+1K+2mg/l2,4D		sap lar boyca uzadı,yapraklar genişledi,%50 saptan çok zayıf kallus
MS	0.1NAA+0.5BAP+MS	ms de oluşan kalluslar alt kültüre alındı. kallus gelişimi durdu, sürgün ve kök gözlenmedi
MS	0.2NAA+0.5BAP+MS	ms de oluşan kalluslar alt kültüre alındı. 30 gün de kalluslar az gelişmiş, sürgün ve kök yok
0.2NAA+0.5BAP+MS		gelişme olmadı

Çizelge 4.3. Eksplantlar çizelgede belirtilen alt kültürlere alınmıştır (devam)

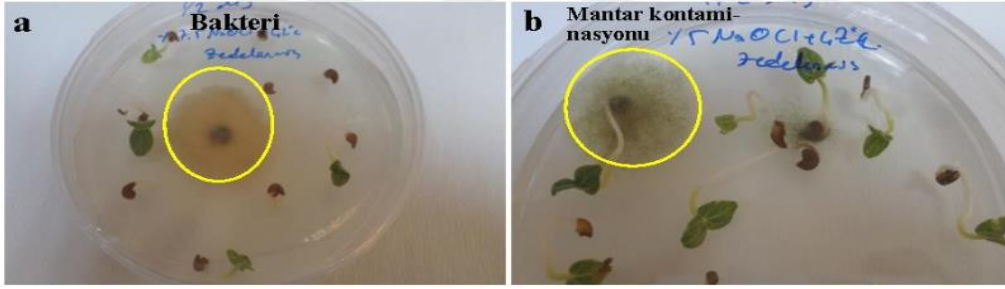
1. ORTAM	2.ORTAM	SONUÇ
MS+3NAA+1BAP		sap ve yapraklarda yavaş büyüme ,ancak kallus yok
B5+0.5NAA+1BAP		sadece 3 saptan birinde küçük kallus, diğerlerinde gelişme yok
B5+2NAA+1BAP		çok az boyca büyüme,kallus yok
MS+2mg/l2,4 D		2 yapraktan birinde zayıf kallus, sapta gelişme yok
MS+2BAP+1NAA		exp.sapların yarısında küçük kallus
MS+1NAA+1BAP		boyca az büyüme ,çok küçük kallus
MS+0,5NAA+1BAP		Yaprak ve sapta boyca az büyüme, kahverengileşme
MS+1NAA	1 hafta sonra %50 yaprak s. Kallus .kontaminasyon nedeniyle sonlandırıldı. Yaprak exp.gelişme yok	
MS+0,2NAA	Yaprakta gelişme yok. 5 saptan 4 ünde kallus başlangıcı.kallus gelişimi 1naa dekinden daha fazla	
MS+1BAP	Yapraklarda Gelişme yok, Saplarda 1 hafta sonra kallus başlangıcı.	

Çizelge 4.3’de belirtilen çalışmalar, sterilizasyon ve kallus oluşturmada başarılı sonuçlar vermemiştir. Bu nedenle bitki tohumdan çimlendirme çalışmalarına geçilmiştir.

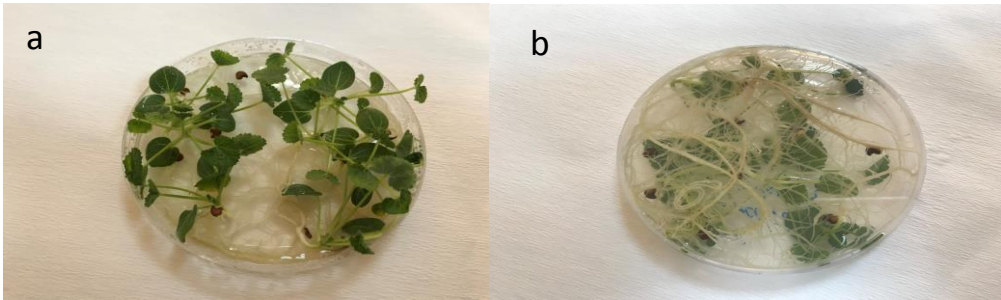
#### 4.2.2.1. Bitki tohumlarına uygulanan sterilizasyon

Bitki doku kültüründe kullanılacak eksplant kaynaklarının bolluğu önemlidir. Bitkilerin kök, gövde, kotiledonlar, yapraklar, embriyo, kotiledon sapı ve yaprak sapı gibi farklı kısımları bitki doku kültürü çalışmalarında eksplant kaynağı olarak kullanılabilir (Naz ve ark., 2017). Bundan dolayı, bitkilerin yapay bitki doku

kültürü ortamları kullanılarak steril olarak çimlendirilmesi yeterli eksplant kaynağının sağlanması için oldukça önemlidir. 5-SH gruplarında 2. Gün sonunda 5-SH ve 5-SH+42°C+Z gruplarında bakteri ve mantar üremesi belirlenirken, 3. Gün sonunda 5-SH+42°C grupta da bakteri ve mantar ürediği tespit edilmiştir. %7.5 NaOCl uygulanan gruplarda 1. Günün sonunda, 7.5-SH+42°C+Z grubu tohumların bulunduğu besiyerinde mantar ürediği gözlemlendi ve 3. Gün sonunda 7.5-SH, 7.5-SH+42°C ve 7.5-SH+42°C+Z gruplarında bakteri ve mantar üremesi belirlenmiştir (Şekil 4.2). Bakteri ve mantar ile kontamine olan besiyerleri 5. Güne kadar bekletilmiş ve çimlenme oranları belirlendikten sonra otoklav ile imha edilmişlerdir. % 10 sodyum hipoklorit uygulanan gruplarda ise 30. Güne kadar herhangi bir kontaminasyon görülmemiştir (Şekil 4.3). Deve gülü tohumlarının % 10 NaOCl ile 10 dakika uygulanmasının Deve gülü bitkisi tohumlarında sterilizasyonun sağlanması için yeterli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4).



Şekil 4.2. Sterilizasyon sonucu gözlenen kontaminasyonlar. a. Bakteri, b. Mantar kontaminasyonu.



Şekil 4.3. Doku kültüründe kullanılan *in vitro* çimlendirilmiş Deve gülü bitkiciklerinin kontamine olmadan büyümüş hali. a. üstten görünüm. b. Kökleri.

Tohumlara belirtilen uygulamalar yapıldıktan sonra çimlenmekte olan tohumlarda kontaminasyon takibi yapılmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4. 4. Farklı sodyum hipoklorit uygulanan Deve gülü tohumlarında 5.Gün sonunda gözlenen kontaminasyonlar

Uygulamalar	Bakteri Kontaminasyonu	Mantar Kontaminasyonu
5-SH	+	+
5-SH+42°C	+	+
5-SH+42°C+Z	+	+
7.5-SH	+	+
7.5-SH+42°C	+	+
7.5-SH +42°C+Z	+	+
10-SH	-	-
10-SH +42°C	-	-
10-SH +42°C+Z	-	-

Tohum sterilizasyonu için kullanılan maddenin çeşidi, konsantrasyonu ve uygulama süresi çimlenme oranını etkileyen faktörlerdir (Younesikelaki ve ark., 2016). Sodyum hipoklorit (NaOCl), etanol, cıva klorür (HgCl<sub>2</sub>) ve Tween-20 gibi sterilize edici maddelerin kullanılması, tohum yüzeyi sterilizasyonu için yaygın olarak tavsiye edilmektedir (Ramakrishna ve ark., 1991; Balyeri ve Mbah 2006). Younesikelaki ve ark. (2016), *Althaea officinalis* (Malvaceae)'in tohumlarını *in vitro* çimlendirme öncesi steril etmek için: kontrol olarak steril distile su, farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde HgCl<sub>2</sub>, %70 etanol+ tween, son olarak farklı konsantrasyon ve sürelerde NaOCl denemişlerdir. Maksimum kontaminasyon kontrol grubunda gözlenirken, minimum kontaminasyon 10 dakika %4 NaOCl de bekletilen tohumlarda görülmüştür. Özyiğit (2008), *Gossypium hirsutum* L. (Malvacea), tohumlarını çimlendirmek için bistüri ile çizerek MS besiyerine ekmiştir. 7 gün sonunda çimlenme görülmüştür.

Deve gülü bitkisinde, %10'luk NaOCl içinde 10dk. bekletildikten sonra bir dizi

işleme tabi tutulan tohumlarda sterilizasyon sağlanmıştır. Bu çalışmalarımız sonunda kontaminasyonu engelleyecek ve tohumların 48 saat içinde çimlenmesini sağlayacak sterilizasyon protokolü oluşturulmuştur. Yukarıda verilen kaynaklar, sterilizasyonda kullanılan maddenin türü, konsantrasyonu ve uygulama süresinin bitkiden bitkiye farklılık oluşturabileceğini göstermiştir. Yapılan çalışmada tohumlara uygulanan NaOCl yüzdesinin ve uygulama süresinin bitkinin coğrafik konumundan ve genotipinden ötürü çevreden kaynaklı kontaminantlarını etkisiz hale getirmek için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

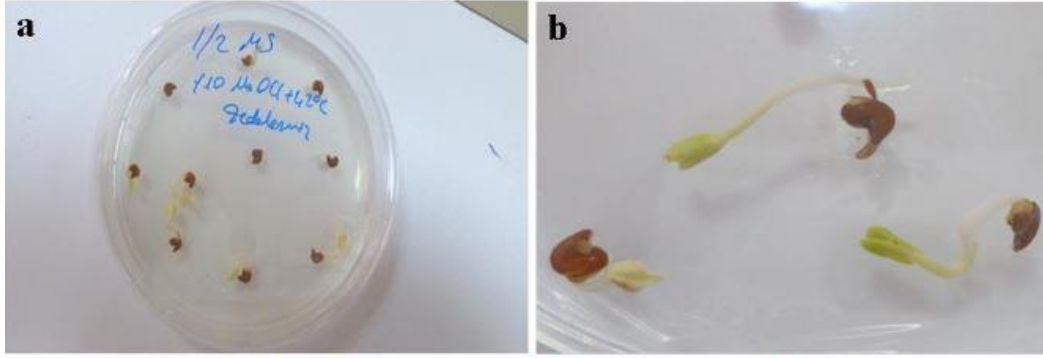
#### 4.2.2.2. Deve gülü bitkisi tohumlarının çimlendirilmesi ve çimlenme indeksi

Yapılan ön çalışmalarda, çentik atılmamış tohumlara HgCl<sub>2</sub>, etanol ve sodyum hipoklorit gibi sterilizasyon ajanlarının farklı konsantrasyonları farklı süreler ile test edilmiş ve çimlenme gözlenmemiştir. Daha sonra bistüri ile çentik atılan Deve gülü bitkisinin tohumlarının ½MS besiyerinde çimlenme durumları 1., 2., 5., 10. ve 30. günlerde gözlenmiştir. 5. Gün çimlenme indeksleri bütün uygulamalar için hesaplanırken 30. gün çimlenme indeksi sadece kontaminasyonun olmadığı % 10 sodyum hipoklorit ile sterilize edilen gruplar için hesaplanmıştır. Tohumların ekiminden itibaren 1. gün sonunda sadece meyve kabuğu bistüriyle zedelenen tohum gruplarında çimlenmenin başladığı gözlenmiştir. 42°C sıcaklıkta inkübe edilen ve meyve kabuğu zedelenmeyen ve sadece sodyum hipoklorit uygulanan gruplarda tohumlar çimlenmemiştir. 5.Gün çimlenme indeksi en yüksek 90.00±10.00 oran ile 5-SH+42°C+Z uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Fakat, bu uygulamada hem bakteri hem de mantar oluştuğu gözlenmiştir. 7.5-SH+42°C+Z (%66.67±25.166) ve 10-SH+42°C+Z (%66.67±20.817) uygulamalarında da 5. Gün sonunda çimlenme gözlenirken, 7.5-SH+42°C+Z uygulamasında bakteri ve mantar kontaminasyonu oluştuğu (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.9). 10-SH+42°C+Z uygulamasında ise kontaminasyon gözlenmemiştir. 5.Gün sonunda kontaminasyon gözlenen %5 ve %7.5 SH uygulamaları sonlandırılmış ve denemeye kontaminasyon oluşmayan %10 SH grupları ile devam edilmiştir. 30.gün sonunda sadece 10-SH uygulamasında çimlenme indeksi



$3.33 \pm 5.774$  iken, 10-SH+42°C+Z uygulanmasında çimlenme indeksi  $86.67 \pm 5.774$  olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2).

Bistüri ile çizmenin çimlenmeyi aktive ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.4). Tohum kabuğunun zedelenmesiyle tohumların su alımı hızlanmış ve çimlenme için gereken enzim aktivitelerinin başlaması sağlanmıştır.



Şekil 4.4. Bistüri ile zedelandikten sonra çimlenen tohumlar.

Çizelge 4. 5. Deve gülü 5. gün ve 30. gün çimlenme indeksleri

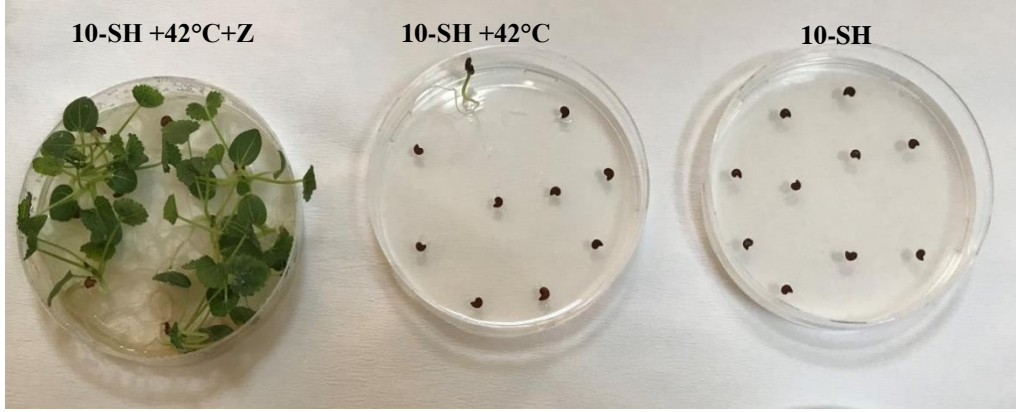
Uygulamalar	Çimlenme İndeksi (%) Ortalama±Standart Sapma	
	5.Gün	30.Gün
5-SH	$3.33 \pm 5.774^a$	TE
5-SH+42°C	$0.00 \pm 0.000^a$	TE
5-SH+42°C+Z	$90.00 \pm 10.00^{ab}$	TE
7.5-SH	$3.33 \pm 5.774^a$	TE
7.5-SH+42°C	$0.00 \pm 0.000^a$	TE
7.5-SH +42°C+Z	$66.67 \pm 25.166^{ab}$	TE
10-SH	$0.00 \pm 0.000^a$	$3.33 \pm 5.774^a$
10-SH +42°C	$0.00 \pm 0.000^a$	$0.00 \pm 0.000^a$
10-SH +42°C+Z	$66.67 \pm 20.817^{ab}$	$86.67 \pm 5.774^{ab}$

Aynı sütundaki farklı harfler ortalamalar arasındaki istatistiki olarak  $p < 0.05$  farklılığı belirtir. TE; tespit edilemedi.

Çimlenme durumları 1., 2., 3., 5., 10. ve 30. günlerinde takip edilerek “Eş 3.6” daki formüle göre 5. ve 30. gündeki % çimlenme oranları belirlenmiştir.

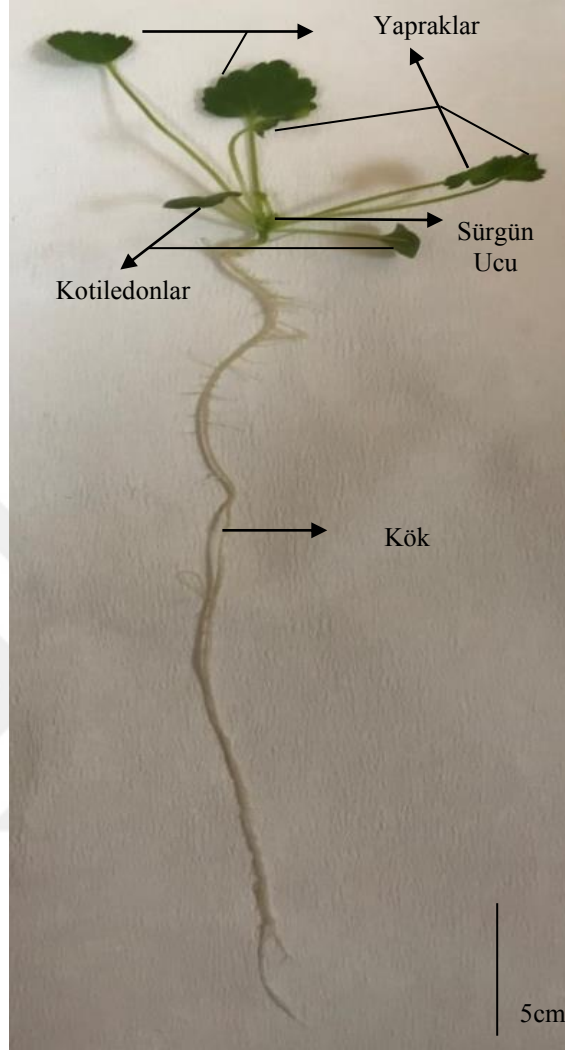
$$\% \text{ Çimlenme İndeksi (Çİ) } = (\text{Çimlenmiş Tohum Sayısı} / \text{Ekilmiş Tohum Sayısı}) \times 100 \quad (3.6)$$

Çimlenen tohumlar hızlıca filizlenerek kotiledonları oluşturmuştur. Çimlenmeden 1 hafta sonra filizlerin kotiledon, kotiledon sapları, hipokotil ve epikotil kısımları doku kültüründe eksplant kaynağı olarak kullanılmaya hazır hale gelmiştir. Yapraklar, 8.Günde oluşmaya başlamış ve 30. gün sonunda yaprak, yaprak sapı ve sürgün ucu eksplantları doku kültüründe kullanılabilir duruma gelmiştir (Şekil 4.5 ve şekil 4.5.).



Şekil 4.5. %10 SH uygulamalarının 30. gün çimlenme durumları.

*Althea officinalis* L. ile yapılan bir çalışmada çimlenme oranının oldukça düşük olduğu bildirilmiştir (Kozlowski ve ark., 1989). Aynı türden *Alcea aucheri* (Boiss.) Alef. ile yapılan bir çalışmada farklı sülfürik asit konsantrasyonlarının ve uygulama sürelerinin, giberillik asitin farklı konsantrasyonlarının ve kum zımparasının farklı uygulama sürelerinin bitki tohumlarının çimlenmesine etkisi incelenmiş ve en yüksek çimlenme oranının (%42) 5 dakika kum zımparası uygulamasıyla elde edildiği bildirilmiştir (Shooshtarian ve Salehi, 2010). Gülhatmi bitkisi için oluşturulan etkili bir çimlendirme prosedürünün rapor edildiği çalışmada en yüksek çimlenme oranı %76 ile steril mineral su kullanılarak elde edildiği ve en düşük çimlenme oranının ise %3 sükröz ilaveli agar ile katılaştırılmış MS besiyerinde %28 bulunduğu bildirilmiştir (Younesikelaki ve ark., 2016).



Şekil 4. 6. 30. gün sonunda çimlenen Deve gülü bitkiciği.

Tıbbi bir bitki olan *Rheum ribes* L. ile yapılan bir çalışmada ise sülfürik asit, giberellik asit, kalsiyum klorür ve potasyum nitratın farklı konsantrasyonları farklı stratifikasyon sürelerinde test edilmiş ve en yüksek çimlenme oranının (%57.3) giberellik asit ile 25 gün 4°C de aydınlıkta inkübe edilen örneklerde bulunduğu bildirilmiştir (Akin ve ark., 2019). Sonuçlar değerlendirildiğinde, hatmi türlerinden biri olan Deve gülü bitkisi %90'a yakın bir oranda çimlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Tohumda embriyonun bünyesinde ve dış kabuğun etkisiyle meydana gelen dormansi görülebilir. Embriyonun etrafındaki tabaka (kabuk) uzaklaştırılırsa çimlenmeyi engelleyen dış kabuğun mekanik baskısı da ortadan kalkar. Gelişme potansiyeli yüksek olan

tohumlarda kabuk alındıktan sonra çimlenme başlar (Karakurt ve ark., 2010). Hidropriming (suda bekletme) sulu bir ortamda tohum içine çok yavaş su girişine neden olan bir çimlenme öncesi uygulamadır. Elkoca ve ark. (2010), nohut çimlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada 12 saat süreyle suda bekletilen tohumların en yüksek çimlenme hızına sahip olduklarını belirtmiştir. Kuru ve sıcak su uygulamaları da tohum çimlenmesinde etkili olabilen uygulamalar olarak bildirilmiştir (Herranz ve ark., 1998; Pela ve ark., 2000; Karakurt ve ark., 2010).

Sonuçlar değerlendirildiğinde, tohumların 42°C sıcaklıkta 24 saat inkübasyonunun Deve gülü bitkisinin çimlenmesini teşvik etmediği belirlenirken, meyve kabukları zedelenmiş tohumların ise yüksek çimlenme oranlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, Deve gülü bitkisi için tohum kabuğunun çentiklenmesi ile etkili bir çimlendirme prosedürü geliştirilmiş olup bitki doku kültürü çalışmaları için sorunsuzca kullanılacak eksplant kaynaklarının elde edilebilmesi sağlanmıştır. Geliştirilen çimlendirme yönteminin çimlenme indeksi düşük bitkiler için uygulanabilirliği test edilebilir.

#### **4.2.2.3. Deve gülü bitkisinin farklı eksplant kaynaklarından kallus oluşturulması ve rejenerasyonu**

##### Kallus çalışmaları

MS besiyerinde çimlenen tohumlardan 14. günde kotiledonlar, kotiledon sapları, hipokotil ve yapraklar eksplant kaynağı olarak kullanılırken, 28. gün çimlendirilen bitkilerden ise nod, sürgün ucu, hipokotil ve kotiledonlar eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.

Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi 14 günlük kotiledon sapları MS0, MS1 ve MS2 ortamlarında oluşturduğu kallus miktarı istatistiki olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. KS-14, en yüksek kallus miktarını MS1 de (%83.33±16.67) göstermiştir.

14 günlük yaprak eksplantlarından MS2’de MS1 ve MS0’a göre istatistiki olarak önemli derecede ( $p<0.05$ ) kallus üretilmiştir (Şekil 4.7 b). En yüksek kallus oluşumu MS2 de ( $77.78 \pm 25.46$ ) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

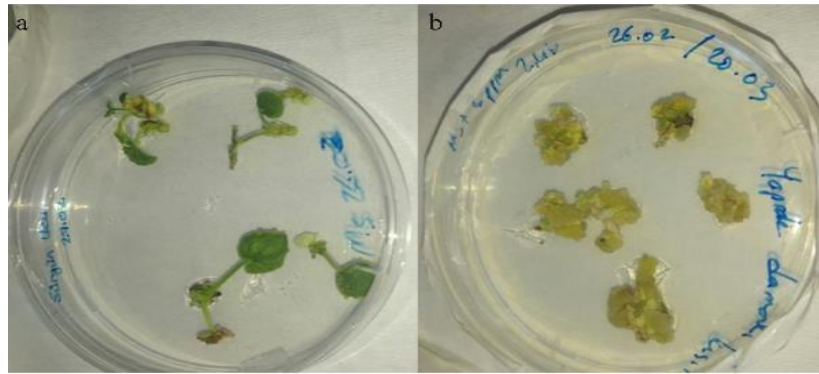
14 günlük kotiledonlardan alınan eksplantları MS1 ve MS2 de MS0 a göre anlamlı şekilde artan ( $p<0.05$ ) miktarda kallus oluşturmuştur (Şekil 4.8). MS0’daki kotiledon eksplantlarında nekroz görülmüştür. En yüksek kallus oluşum yüzdesi MS1 ortamında  $91.67 \pm 9.62$  olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

14 günlük hipokotil eksplantları, MS1 ve MS2 de MS0’a göre anlamlı şekilde ( $p<0.05$ ) artan miktarda kallus oluşturmuştur (Şekil 4.9). En yüksek kallus oluşumu MS2’de ( $100 \pm 0.00$ ) görülmüştür (Çizelge 4.6).

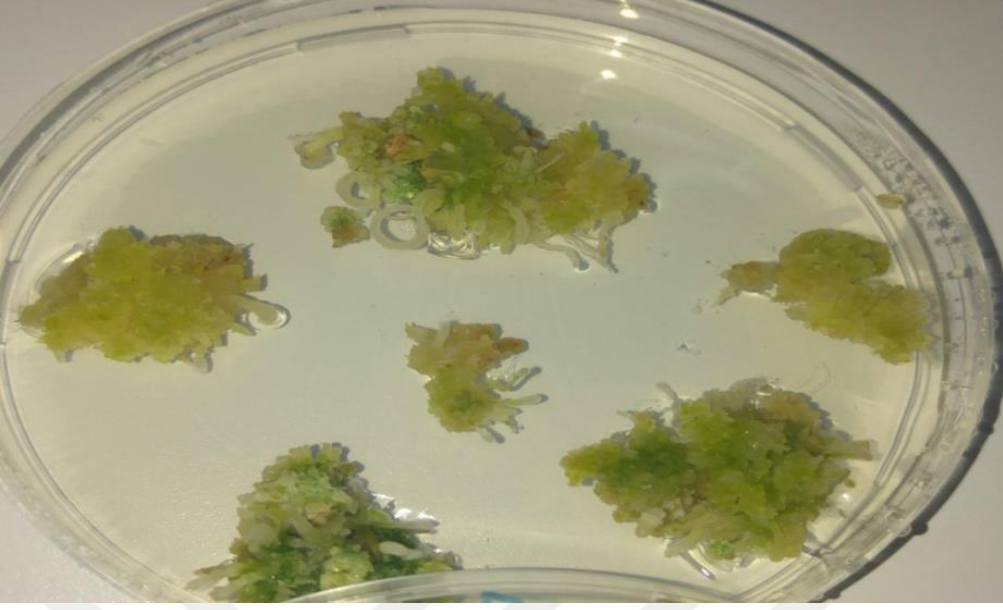
28 günlük kotiledonlar MS2 ortamında MS0 ve MS1 ortamına göre anlamlı şekilde artan ( $p<0.05$ ) miktarda kallus oluşturmuştur. En yüksek kallus oluşumu MS2 de ( $86.67 \pm 23.09$ ) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

28 günlük hipokotil ve sürgün ucu eksplantlarında 2,4 D’nin kallus oluşumu üzerine istatistiki olarak bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

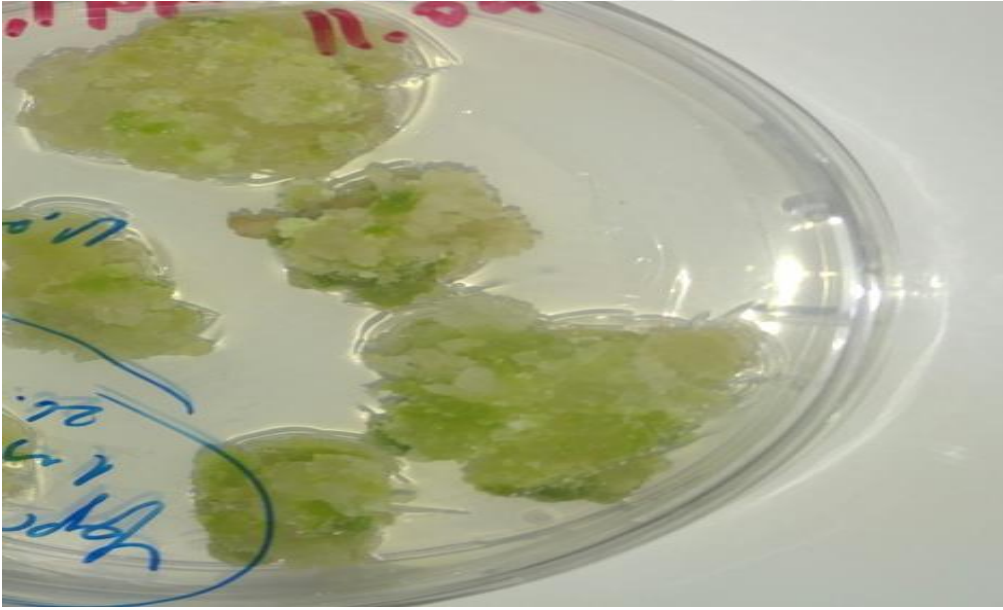
Nod eksplantları ise MS1 ortamında MS0 ve MS2 ye göre anlamlı şekilde artan ( $p<0.05$ ) miktarda kallus oluşturmuştur. En yüksek kallus oluşumu MS1  $94.44 \pm 9.62$  olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Deve gülü bitkisinin farklı eksplantları ile kallus oluşumu. a. Sürgün ucu. b. yaprak.



Şekil 4.8. Deve gülü bitkisinin kotiledon eksplantından kallus oluşumu.



Şekil 4.9. Deve gülü bitkisinin hipokotil eksplantından kallus oluşumu.

Çizelge 4. 6. 14 ve 28 günlük eksplantlarda kallus oluşumu yüzdeleri

	MS0 ± SS	MS1± SS	MS2± SS
<b>KS-14</b>	53.13 ± 23.66 <sup>a</sup>	83.33 ± 16.67 <sup>a</sup>	61.11 ± 9.62 <sup>a</sup>
<b>K-14</b>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	91.67 ± 9.62 <sup>b</sup>	88.89 ± 8.61 <sup>b</sup>
<b>HP-14</b>	50.00 ± 25.46 <sup>a</sup>	88.89 ± 9.62 <sup>b</sup>	100 ± 0.00 <sup>b</sup>
<b>Y-14</b>	27.78 ± 25.46 <sup>a</sup>	72.22 ± 9.62 <sup>b</sup>	77.78 ± 25.46 <sup>ab</sup>
<b>K-28</b>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	32.50 ± 30.31 <sup>ab</sup>	86.67 ± 23.09 <sup>b</sup>
<b>HP-28</b>	55.56 ± 25.46 <sup>a</sup>	83.33 ± 16.67 <sup>a</sup>	83.33 ± 28.87 <sup>a</sup>
<b>SU-28</b>	85.83 ± 18.93 <sup>a</sup>	85.83 ± 18.93 <sup>a</sup>	73.33 ± 11.86 <sup>a</sup>
<b>N-28</b>	55.56 ± 25.46 <sup>a</sup>	94.44 ± 9.62 <sup>b</sup>	50.00 ± 0.00 <sup>a</sup>

Kısaltmalar= K-14; 14 günlük kotiledon, KS-14; 14 günlük kotiledon sapı, HP-14; 14 günlük hipokotil, Y-14; 14 günlük yaprak, K-28; 28 günlük kotiledon, HP-28; 28 günlük hipokotil, SU-28; 28 günlük sürgün ucu, N-28; 28 günlük nod. MS0; hormonsuz Murashige ve Skoog besi ortamı, MS1; 1mg/l 2.4D eklenmiş MS, MS2; 2mg/l 2.4D eklenmiş MS, SS; standart sapma, Aynı satırdaki farklı harfler ortalamalar arasındaki istatistiki olarak  $p < 0.05$  farklılığı belirtir.

Genotip, eksplant tipi, doku kültür ortamı, bitki büyüme düzenleyicileri ve elisatörler gibi birçok faktör, bitkilerin doku kültürü tepkilerini, embriyonik kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunu etkileyebilir (Chenar ve ark., 2015; Pakseresht ve ark., 2016). Oksinler ve sitokininler bitki doku kültüründe yaygın olarak birlikte veya ayrı kullanılan bitki büyüme düzenleyicileridir (Gang ve ark., 2003). Oksinler, kallus indüksiyonunda önemli bir etkiye sahiptir (Hosseini ve ark., 2017). Farklı bitki türleri veya genotipleri farklı BBD'lere farklı tepkiler verir (Pakseresht ve ark., 2016). Bazı familyalarda ve Malvacea familyası ile yapılan çalışmalarda 2.4-D, kallus oluşumu için yaygın olarak kullanılan BBD olmuştur (Zhang, 2000; Wang ve ark., 2004; Sun ve ark., 2006; Zouzou ve ark., 2008; Darvishi ve ark., 2014; Chenar 2015). Bitki doku kültüründe 2.4-D, yaygın kullanılan bir oksin olmasına rağmen yüksek dozlarda kullanımı hücre bölünmesi ve hücre uzamasında da artışa neden olmaktadır (Pakseresht ve ark., 2016).



Bu çalışmada, Deve gülü bitkisinin farklı eksplant kaynaklarından kallus oluşturulması için 2,4 D'nin farklı konsantrasyonları (1 mg/l ve 2 mg/l) kullanılmıştır. MS1 ortamında, 14 günlük tüm eksplantlarda ortalama % 84±11.3 oranında, MS2 de % 82±10.9 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir. 28 günlük tüm eksplantlarda ise MS1 ortamında ortalama %74±18,8 oranında kallus oluşturulurken, MS2 ortamında ise % 73±16 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir

Hosseini ve ark. (2017), *Althaea digitata* (Malvacea)'nın sürgün, kök ve yaprak eksplantlarından kallus oluşturma çalışmalarında en iyi sonucu sürgün ucu eksplantlarında, 2.4-D ve KIN içeren ortamda % 82.98 olarak elde ederken, Rauol ve ark. (2010), *Hibiscus sabdariffa* (Malvacea) ile yaptıkları kallus oluşturma çalışmalarında ise en iyi sonucu 2.4-D ve TDZ içeren ortamda inkübe edilen hipokotil ve kotiledon eksplantlarında elde etmiştir. Pakseresht ve ark. (2016), hipokotil ve yaprak eksplantları arasında kallus indüksiyonu ve kallus büyüme hızı açısından anlamlı fark olmadığını, BBD nin miktar ve çeşidi ile eksplant çeşidinin kallus indüksiyonu ve kallus büyüme hızı üzerinde önemli etkisi olduğunu bildirmiştir. Munir ve ark. (2012), *Alcea rosea*'nın kotiledon eksplantlarına kallus oluşturmak için farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda BBD uyguladıkları çalışmalarında bizim çalışmamızla uyumlu olarak en iyi sonucu 2,4 D uyguladıkları kotiledon eksplantlarında elde etmiştir.

Deve gülüyle yapılan bu çalışmada, 14 ve 28 günlük eksplantlar birlikte değerlendirildiğinde kotiledonların diğer eksplantlara göre daha yüksek kallus oluşturma yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. 14 günlük kotiledonlar en fazla MS1 de (91.67±9.62)., 28 günlük kotiledonlar ise en fazla MS2 de kallus oluşturmuştur. Germinasyonun ilk üç haftasında hücrede oksijenli solunumun hızlanması nedeniyle metabolik faaliyetlerinin daha hızlı olması (Özyiğit, 2008) 14 günlük kotiledonlarda 28 günlük kotiledonlardan daha yüksek oranda kallus oluşumuna neden olmuştur. Eksplant tipi, yaşı ve anatomik yapısı Deve gülü bitkisinin kallus oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Farklı eksplant tiplerinin ve yaşının kallus oluşturma çeşitliliği, diğer birçok bitkide bildirilmiştir (Ishii ve ark., 2004; Dhar ve Joshi, 2005; Zouzou ve ark., 2008). Yapılan bu çalışma, kotiledonun daha fazla kallus oluşturma potansiyeline sahip olduğunu belirten çalışmalarla da uyumludur (Zhang 2000; Zouine ve El-Hadrami, 2004; Dhar ve Joshi, 2005; Michel ve ark., 2008; Raoul ve ark. 2010). Sivacioğlu ve



ark., (2007), Demir (2003)'e atfen oksinlerin suyun dokularda alımını hızlandırdığını bildirmektedir. 1 ve 2 mg/l 2,4 D içeren MS ortamında suyun alınımının artmasıyla kotiledonun metabolizması hızlanmıştır. Meatbolizması hızlanan kotiledon eksplantları kök ve hipokotil ile karşılaştırıldığında daha fazla kallus üretmiştir. Kotiledon dışındaki diğer eksplantlar için farklı kombinasyon ve konsantrasyonlardaki BBD'lerin uygulanması ileri çalışmalar olarak düşünülebilir. 2,4 D, kotiledon eksplantını kallus oluşturmak için manipüle etmiş, ancak diğer eksplantların kallus oluşumunu sağlayacak hücre bölünmesini kodlayan genlerini aktive edememiştir.

### Sürgün oluşturma çalışmaları

Kallus oluşturma çalışmalarıyla birlikte bütün eksplantlar embriyonik kallus ve sürgün oluşumu için 0.5 BAP+0,1 NAA ve 0.1 BAP+0.5 NAA de 6 hafta bekletildi. Ancak gelişme olmadı.. Bu ortamlarda bekletilen örnekler deneme amaçlı MS li ortamlara rejenerasyon için alındı. Ancak kalluslarda rejenerasyon gözlemlenmedi. Werbrouck ve Debergh, (1994) sitokin/oksin oranının yüksek olmasının sürgün oluşumuna, oksin/sitokin oranının yüksek olmasının kök oluşumuna, oksin ve sitokin oranının eşit olmasının kallus oluşumuna neden olacağını bildirmektedir. . Tyub ve ark. (2016), BAP ve NAA'in farklı konsantrasyonlarını deneyerek *Althea rosea (Malvacea)*'da sürgün oluşumunu sağlamışlardır. Sürgün ve kök oluşumu için kullanılan 0.5 BAP+0,1 NAA ve 0.1 BAP+0.5 NAA miktarlarının Deve gülü bitkisinde etkili BBD'ler olmadığı sonucuna varılmıştır Deve gülü bitkisinde denenen BAP ve NAA konsantrasyonlarının bu tür için uygun BBD kombinasyon ve konsantrasyonu olmadığı sonucuna varılmıştır. İleri çalışmalarda farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda BBD'lerin kullanılması hedeflenmektedir.

Deve gülü bitkisiyle ilk kez yapılan bu çalışmada farklı eksplantlarla kallus oluşumu başarılı, en yüksek kallus indeksi, 14 günlük kotiledonların 1mg/l 2,4 D içeren MS ortamında inkübasyonu ile elde edilmiştir.

### Deve gülü bitkisinin rejenerasyonu

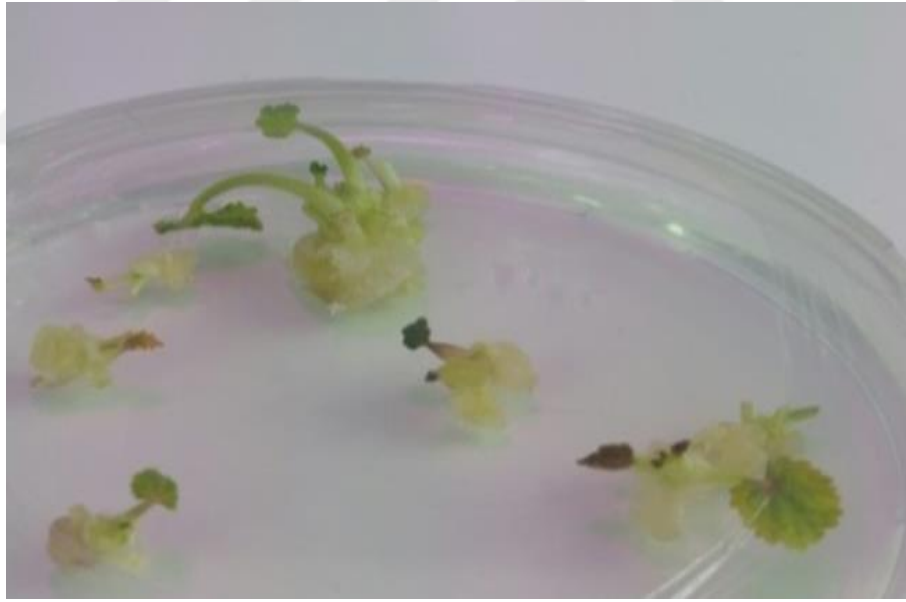
Rejenerere bitkicikler, 28 günlük çimlendirilen bitkilerden alınan sürgün ucu ve nodlardan 6 hafta boyunca MS inkbasyonuyla elde edilmiştir (şekil 4.10.). Nod ve sürgün ucundan %100 oranında doğrudan rejenerasyon gözlenmiştir (şekil 4.11). Rejenerere olan bitkicikler 6 hafta sonra köklendirme (1/2 MS) besiyerine alınmış (şekil 4.12), kklendirildikten sonra rejenerasyon işleminin devamında toprağa aktarılmıştır. Sauer ve ark. (1985) gl bitkisinin, Tetsumura ve ark. (2008) yaban mersininin, Fadel ve ark. (2010) nane bitkisinin, rejenerasyonunda 1/2 MS ortamının köklendirme için başarılı sonuçlar verdiğini bildirmiştir. Deve gülü bitkisinin rejenerasyonunda denemiş olduğumuz 1/2 MS besiyerinin köklendirme için uygun ortam olduğu belirlenmiştir.

Mikro oğaltımı yapılan nodların %44.4' BBD'siz MS ortamında iki veya daha fazla sürgünle filizlenmiştir. Eksplant başına düşen sürgün sayısı 1.61 olarak tespit edilmiştir. Deve gülü bitkisiyle noddan mikroçoğaltım çalışması başarılmıştır. Noddan mikroçoğaltımı yapılan bitkiciklerin hepsi viallere aktarılmasına rağmen bunların %5.6'sı saksıya aktarılabilmiştir.

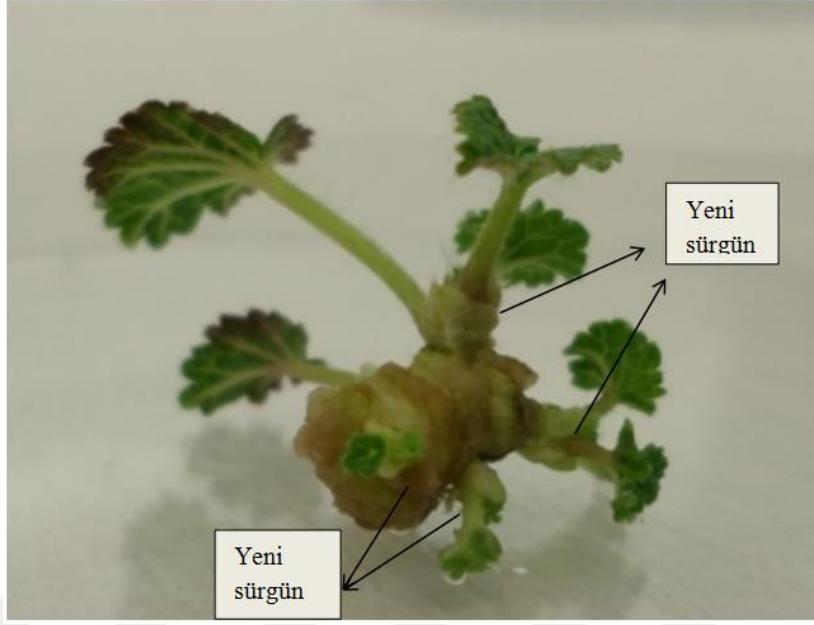
Sürgün ucu eksplant kaynağı olan örneklerden %12.5'i BBD'siz MS ortamında birden fazla sürgün vererek filizlenmiştir. Kullanılan sürgün ucu eksplantı başına düşen sürgün sayısı 1.125 olarak tespit edilmiştir. Sürgün ucundan ise %12.5 oranında mikroçoğaltım başarılmıştır. Sürgün ucu örneklerinin %20 si toprağa aktarılmıştır. 28 günlük sürgün ucu ve nodların meristemastik hücre yoğunluğundan ötürü rejenerasyonda başarı gösterdiği düşünülmektedir. Kallus oluşumu ve rejenerasyon cevabının, eksplant yaşı ve çeşidi, bitkinin genotipi, ortam kompozisyonu ve diğer fiziksel kültür koşullarına bağlı olduğu *Malvacea* familyasına ait bazı bitkiler ile yapılan araştırmalarda (Hemphill ve ark., 1998; Luo ve ark., 2000; zyiğit ve ark., 2007) bildirilmiştir. Rejenerasyon bitkinin Deve gülü bitkisiyle aynı familyadan olan pamuk bitkisini zyiğit ve Gözükırmızı (2008), 0.1 mg/L KIN (kinetin) +1 g/L PVP (polyvinylpyrrolidone) içeren ortamda rejenerere ederken, Sivanesan ve Jeong (2007), aynı familyadan olan *Sida cordifolia* Linn bitkisini 2.0 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren ortamda rejenerere etmiştir.

Lorenzo (2001) şeker kamışında, Özyiğit (2007) pamukta fenolik üretimin en yüksek olduğu kültürün üç ile dördüncü haftalarında (20-30 gün) rejenerasyonun da yüksek olduğunu bildirmiştir. Fenolik asit miktarındaki artışın oksin metabolizmasını aktive ederek hücre bölünmesi ve hücre duvarının oluşumunu hızlandığını bildirmişlerdir. Deve gülü bitkisinin in vitro çimlendirilen sürgün ucu ve nodları 28. günde BBD'siz MS ortamına alınarak rejenerere edilmiştir. Ortamda BBD olmamasına rağmen, fenolik asitlerinin en yüksek seviyede olduğunu düşündüğümüz (28.gün) dönemde fenolik asitlerin oksin etkisi yaparak rejenerasyonu teşvik ettiği düşünülmektedir.

Bu çalışmayla tıbbi önemi olan Deve gülü bitkisinin doku kültüründe rejenerasyon çalışmaları ilk kez yapılarak, sürgün ucu ve nodlardan rejenerasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.10. Sürgün ucundan rejenerasyon.



Şekil 4 .11. Nod eksplantından oluşan yeni sürgünler.



Şekil 4.12. MS besiyerinde rejenere edildikten sonra köklendirme besiyerinde köklendirilen sürgün uçları

#### 4.2.2.4. Köklenen rejenere bitkiciklerin alıştırılması

Kozai (1988), alıştırmayı bitkinin yeni bir ortama alınmadan önceki iklimsel adaptasyonu olarak tanımlamıştır. Mikroçaoğaltımı yapılan bitkilerin doku kültüründen alınarak iklime alıştırılma aşamasında ortam nem ve ısısının optimize edilerek bitkinin yaşamını sürdürebileceği konuma getirilmesi gerekir. *In vitro* şartlarda oluşan yüksek bağıl nem bitki kalitesini olumsuz etkilemektedir. Doku kültüründe bağıl nemi düşürülen ortamda yetiştirilen az sayıda bitki *ex vitro* koşullarda da yaşamını sürdürebilmiştir (Özkaynak ve Samancı, 2005). Bitkiler alıştırma aşamasında, şeker içeren doku kültürü ortamına göre daha yüksek su potansiyeline sahip bir ortama aktarıldıkları için yapraklarından hızlı bir şekilde su kaybederek solarlar. Yaprak

yüzeyindeki mumsu tabaka incelererek yaprak yüzeyinde su tutamaz. Stomalar işlevini göremez, kökler istenen miktarda su alamaz. Kültür ortamında mineraller ve şekerin hazır bulunması, düşük CO<sub>2</sub> fiksasyonuna neden olmaktadır. Karbonhidrat üretmeye ihtiyaç duymayan bitki heterotrof beslenmektedir. Alıştırma aşamasında toprağa aktarılan bitki fotootorofik yaşamak zorunda olduğu için fazla gelişemez ve ölür. Ancak alıştırma ortamında yeni yapraklar gelişirse fotosentezi aktif olarak yapmaya başlar.

Nod ve sürgün uçlarından rejenere olan bitkicikler doku kültüründeki ortamlarından alınarak köklerine zarar vermeden toprak içeren viallere ekildi. Üç ay sonunda bitkicikler viallerden çıkarılarak iki litrelik saksılara aktarılmıştır. Noddan mikroçağaltımı yapılan bitkiciklerin hepsi viallere aktarılmasına rağmen bunların % 5.6'sı, sürgün ucu örneklerinin ise %20'si toprağa aktarılmıştır.

Deve gülü bitkisinin eksplantlarından doku kültüründe ilk kez rejenere edilen bitkicikler başarılı bir şekilde toprağa aktarılmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. a, b, c, d; toprağa aktarılan rejenere bitkicikler

### 4.3. Farklı Vejetasyon Dönemlerinde Deve gülü Bitkisinin Fitokimyasal İçeriğinin ve Antioksidan Kapasitesinin Tayin Bulguları

Deve gülü bitkisinin fenoliklerin tanımlanması ve miktar tayini yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kütle spektrometrik detektör (LC-MS) ile yapılmıştır. Antioksidan kapasite tayini için FRAP, ORAC ve FC deneyleri yapılmıştır.

#### 4.3.1. Deve gülü bitkisinin liyofilize etanol ekstraksiyonu ve suyla infüzyon verim bulguları

Kimyasal reaksiyonlar, reaksiyona girecek maddelerin çok rahat birbirleriyle çarpışma olanağı bulabildiği bir çözücünün kullanıldığı homojen bir ortamda gerçekleşebilir (Kolancılar, 2010). Su, analitik kimyada en fazla kullanılan polar bir

çözücüdür. İki hidrojen atomunun bir oksijen atomuna V şeklinde bağlanmasıyla oluşur. Bir molekül farklı atomlardan oluşmuşsa her bir atomun elektronlara karşı ilgisi farklı olmaktadır. Bu nedenle molekülün bir tarafında elektron fazlalığından dolayı kısmi negatif yük, diğer kısmında da elektron azlığından dolayı kısmi pozitif yük oluşmaktadır. Bu tür çözücüler polar olarak adlandırılırken, aynı tür atomlara sahip çözücüler ise apolar çözücüler olarak sınıflandırılmaktadır (örnek, H<sub>2</sub>). Polar bileşiklerde moleküller arası çekim kuvveti oldukça güçlü olduğu için polar çözücünün negatif kısmı çözünenin pozitif kısmı tarafından çekilir (Morgil, 2007). Böylece çözünen maddenin çözücü içindeki çözünürlüğü artarak ekstraksiyon verimini artırır.

Haziran (çiçeklenme dönemi), Temmuz (meyve dönemi), Ağustos (tohum dönemi) olmak üzere 3 farklı gelişim döneminde Konalga köyü kırsalından getirilerek kurutulmuş bitki örneklerinin, işlemlere tabi tutulmadan önce ekstraksiyon verimi hesaplanmıştır. Çizelge 4.7'de Deve gülü bitkisinin suyla infüzyon ve etanol ekstraksiyonu verimi hesaplanmıştır.

Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi etanol ekstraksiyonunun verimi infüzyon veriminden daha yüksek tespit edilmiştir. Etanol ekstraksiyonu ve infüzyonu yapılan örnekler kendi içlerinde dönemlerine göre değerlendirildiğinde Ağustos ayında etanol ekstraksiyonu (%28.89) ve infüzyonu yapılan örneklerin verimi (%6.4) en yüksek tespit edilirken, Temmuz ayında etanol ekstresi (%3.64) ve infüzyonu yapılan örneklerin verimi (%2.34) ise en düşük olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4. 7. Deve gülü bitkisinin infüzyon ve etanol ekstraksiyonu % verimi

<b>Vejetasyon Dönemi</b>	<b>Etanolle ekstraksiyon % verimi</b>	<b>İnfüzyon % verimi</b>
Haziran	6.03	5.06
Temmuz	3.64	2.34
Ağustos	28.89	6.4

Genel olarak etanol çözüneninin ekstraksiyon verimi saf su çözünenine göre daha yüksek olarak belirlenirken en yüksek verim Ağustos ayına ait etanol ekstraksiyonlarında (%28.89) elde edilmiştir. Ağustos ayında tohum dönemine geçen bitkide endosperm ve embriyo oluşumu için gerekli olan yağ, protein ve karbonhidrat (nişasta) depolanması,



bitkinin ağırlığını ve ekstre edilen madde miktarını attırarak ekstraksiyon veriminde de artışa neden olmuştur.

#### **4.3.2. Deve gülü bitkisinin antioksidan aktivitesi bulguları**

Yapılan çalışmada bitkinin antioksidan kapasitesinin ölçülmesi amacıyla 3 farklı antioksidan testi uygulanmıştır. Bu deneyler Folin-Ciocalteu indirgeme gücü (FCR) deneyi, Ferrik indirgeme antioksidan gücü veya total indirgeme kapasitesi (FRAP) ve Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC)'nden oluşmaktadır.

##### FCR, FRAP ve ORAC deneyleri bulguları

Folin-Ciocalteu (F-C) metodu, alkalik ortamında fenolik bileşiklerden fosfomolibdik/fosfotungstik asit kompleksine elektron transferi esasına dayanmakta olup, bu indirgenme tepkimesi sonucu tepkime rengi sarı renkten, mavi renge dönüşmektedir.

FRAP deneyin temel mekanizması, düşük pH ortamında incelenmek istenen bitkisel materyaldeki antioksidan bileşiklerin  $Fe^{3+}$ -TPTZ oksidan kompleksini, yoğun mavi renkteki  $Fe^{2+}$ -TPTZ kompleksine indirgemesi gücünün ölçülmesi esasına dayanmakta olup, Tekli Elektron Transferi (SET) mekanizmasını temsil etmektedir.

ORAC deneyi, azot bileşiklerinin termal bozulma sonucu oluşan peroksil radikalının antioksidan bileşikler tarafından, floresens ortamında inhibisyon oranının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. ORAC deneyi, HAT temelli (hidrojen atom transferi) bir deney olup, hidrojen atomunun aktarılması yoluyla, serbest radikallerin dindirilmesi-süpürülmesi esasına dayanmaktadır. ORAC deneyi pahalı ekipman ve uzun süre almasına rağmen, deneyde biyolojik bir radikal kaynak (floresin proteini) kullanılması önemini arttırmaktadır (Prior ve ark., 2003).

En yüksek FCR, FRAP ve ORAC değerleri Temmuz ayına ait infüzyon örneklerinde sırasıyla  $16.538 \pm 0.019$  GA.Eq. mg/gdrog,  $225.691 \mu\text{mol } Fe^{+2}/\text{gdrog}$ ,  $311,86 \pm 1,006 \mu\text{molTE/gKA drog}$  olarak, en düşük miktar ise etanol ekstresi yapılan

Ağustos ayına ait örneklerde sırasıyla  $4.667 \pm 0.109$  GA.Eq. mg/g drog,  $59.708 \mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g}$  drog,  $119.091 \pm 0.7629 \mu\text{molTE}/\text{gKAdrog}$  olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4. 8. Deve gülü bitkisinin infüzyon ve etanol ekstraksiyonunun farklı vejetasyon dönemlerinde FCR, FRAP, ORAC sonuçları

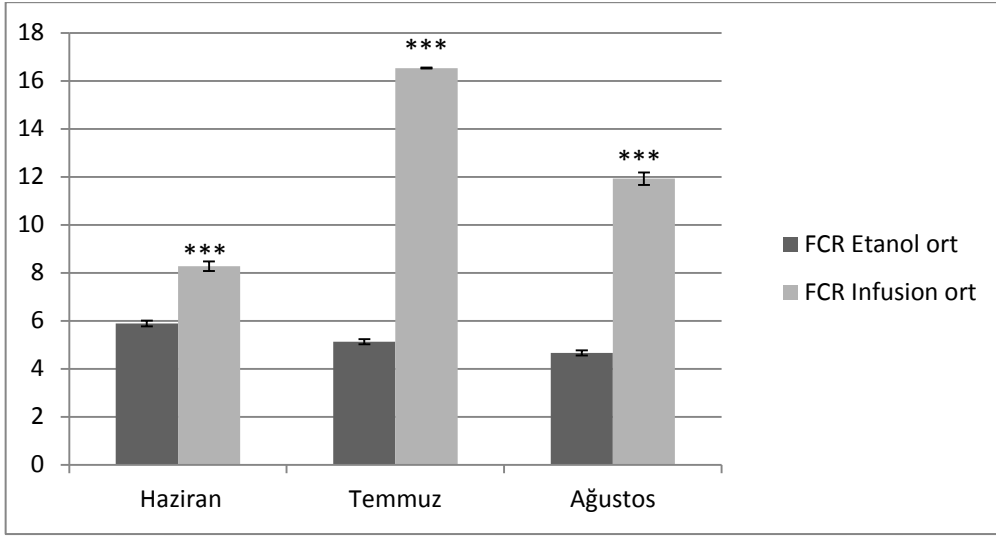
	<b>FCR</b> <b>GA.Eq. mg /g</b> <b>kuru ağı.</b>	<b>FRAP</b> <b><math>\mu\text{mol Fe}^{+2} /\text{g}</math></b> <b>kuru ağı.</b>	<b>ORAC</b> <b><math>\mu\text{molTE}/\text{g}</math></b> <b>kuru ağı.</b>
ETANOL EKS.	ortalama $\pm$ SS	ortalama $\pm$ SS	ortalama $\pm$ SS
Haziran	$5.891 \pm 0.115$	$73.304 \pm 2.519$	$187.332 \pm 0.566$
Temmuz	$5.13 \pm 0.109^a$	$76.25 \pm 1.497$	$152.282 \pm 3.100^a$
Ağustos	$4.667 \pm 0.109^{ab}$	$59.708 \pm 2.573^{ab}$	$119.091 \pm 0.762^{ab}$
INFÜZYON			
Haziran	$8.273 \pm 0.200$	$117.604 \pm 2.523$	$249.724 \pm 2.364$
Temmuz	$16.538 \pm 0.019^a$	$225.691 \pm 5.140^a$	$311.86 \pm 1.006^a$
Ağustos	$11.928 \pm 0.264^{ab}$	$162.81 \pm 4.552^{ab}$	$261.187 \pm 2.059^{ab}$

a: Temmuz ve Ağustos ayındaki değerlerin Haziran ayına göre anlamlı olarak artış veya azalışını,

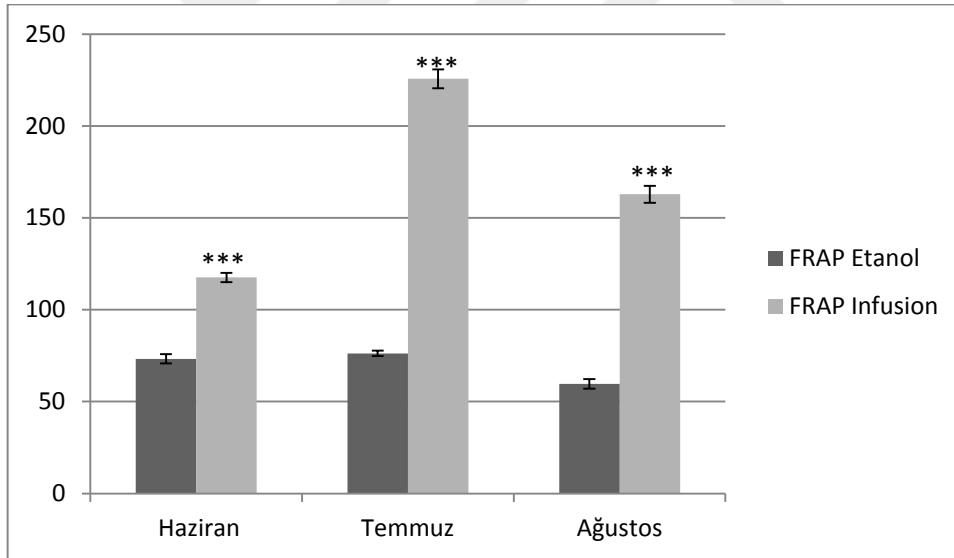
b: Ağustos ayındaki değerlerin Temmuz ayına göre anlamlı olarak artış veya azalışını göstermektedir.

SS; standart sapma.

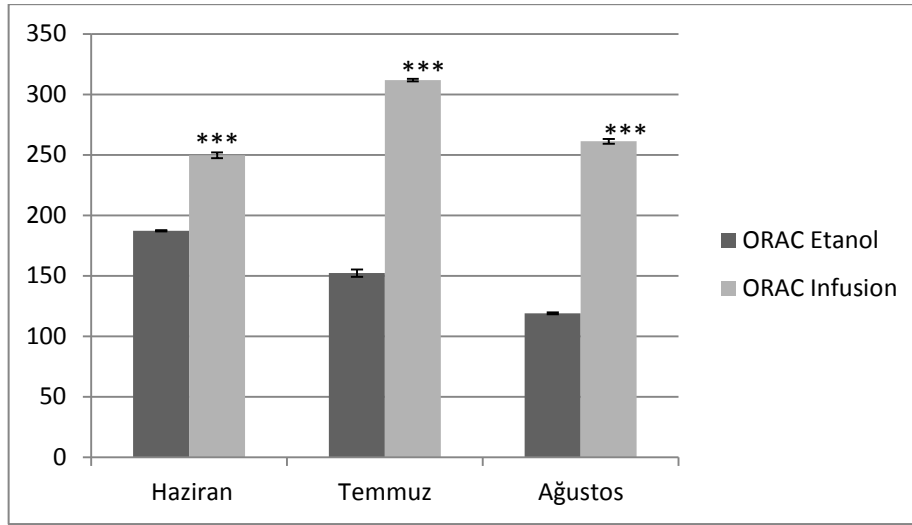
Her vejetasyon dönemi kendi içinde değerlendirildiğinde infüzyon ekstratlarının FCR, FRAP ve ORAC miktarları aynı dönemin etanol ekstratlarına ait FCR, FRAP ve ORAC miktarlarından anlamlı olarak ( $p < 0.001$ ) yüksek bulunmuştur (Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16).



Şekil 4.14. Deve gülü bitkisinin FCR değerlerinin ekstraksiyon çeşidine göre (infüzyon ve etanol) dönemsel karşılaştırılması, \*\*\*p<0.001.



Şekil 4.15. Deve gülü bitkisinin FRAP değerlerinin ekstraksiyon çeşidine göre (infüzyon ve etanol) dönemsel karşılaştırılması, \*\*\*p<0.001.



Şekil 4.16. Deve gülü bitkisinin ORAC değerlerinin ekstraksiyon çeşidine göre (infüzyon ve etanol) dönemsel karşılaştırılması, \*\*\* $p < 0.001$ .

#### 4.3.3. Deve gülü bitkisinin fitokimyasal içerik bulguları

##### Kütle spektrometresi (MS) yardımıyla fenolik bileşiklerin analizi bulguları

Kütle spektrometresi analizleri kalitatif olarak; tam tarama ve hedef reaksiyon görüntüleme (SRM; Selected Reaction Monitoring) modları kullanılarak yürütüldü. Tam tarama (MS/MS) neticesinde bu bileşiklerin total molekül ağırlıkları ve parçalanma iyonları incelendi. Böylece, bu bileşiklerin temel olarak fenolik asitler olduğu belirlendi. Geçici olarak tanımlanan bu bileşikler hedef reaksiyon görüntüleme modunda parçalanma iyonları sonuçları ile tanımlandı. Daha sonra son tanımlama için, özgün ticari standartlar kullanılarak varlıkları sıvı kromatografisi ve kütle spektrumunda doğrulandı.

Ekstrelerde başlıca tespit edilen fenolik bileşikler fenolik asitlerden oluşmaktadır. Tüm ekstrelerde gallik asit, klorojenik asit ve kaffeik asit bileşikleri belirlendi. Bu bileşiklere ait bulgular aşağıda sunulmuştur.

### Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC-DAD) yardımıyla fenolik bileşiklerin analizi bulguları

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, fenolik bileşiklerin tanımlanması ve miktar tayininde kullanılan en yaygın ve güvenilir yöntemdir. Özgün standartlar mevcudiyetinde, bitkisel kaynaklardaki fenolik bileşikler HPLC-DAD kullanılarak, alıkonulma zamanı ve UV spektrum bilgisi yardımıyla tanımlanabilmektedirler (Pereira ve ark., 2009). Bitki fenolikleri genel olarak DAD dedektörleri kullanılarak tanımlanırlar. DAD dedektörleri, kromatografik doruk noktasının elüsyonu boyunca, fenolik bileşiklere ait tüm UV spektrumunu toplamasını sağlamaktadır. Bu sayede, fenolik bileşikler spektrum bilgilerine dayanarak kolaylıkla tanımlanabilmektedirler (Andrés-Lacueva ve ark., 2009).

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) tekil fenolik bileşiklerin ayırışmasına, geçici olarak tanımlanmasına ve miktar tayinine olanak sağladığından dolayı, fenolik bileşiklerin tanımlanmasında standart pratik yöntem olarak kabul edilmektedir (Becker ve ark., 2004). HPLC-DAD ise, fenolik bileşiklerin tanımlanmasında en doğru ve en uygun yöntem olarak kabul edilmektedir (Naczek ve Shahidi, 2004; Robbins, 2003).

İncelenen ekstraktlerdeki fenolik bileşiklerin en yoğun absorpsiyonu 326 nm dalga boyunda gösterdiği belirlendi. 280 nm’de nispeten daha düşük absorpsiyon gözlenirken, 250 ve 520 nm’de ise herhangi bir absorpsiyon gözlenmedi. Bu bileşikler ile fenolik bileşik standartlarına ait alıkonulma zamanları ve spektrum özellikleri karşılaştırıldığında, bu bileşikler gallik asit, klorojenik asit ve kaffeik asit olarak tanımlandı. Ko-kromatogram uygulanarak, bu bileşiklerin gallik asit, klorojenik asit ve kaffeik asit olduğu doğrulandı. Ko-kromatogram uygulamasında her bir bileşik için numuneler 3 uygulama şeklinde sıvı kromatografide yürütüldü. Birinci uygulamada sadece numune, ikinci uygulamada sadece standart bileşik ve üçüncü uygulamada ise standart ve numune beraber yürütülmüştür. Bu uygulamalardan elde edilen bilgiler (Çizelge 4.9) neticesinde bu bileşiklerin gallik asit, klorojenik asit ve kaffeik asit oldukları doğrulanmıştır.

Çizelge 4. 9. Deve gülü bitkisinin yaprak kısmından elde edilen liyofilize ekstrelerde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi\* yardımıyla tespit edilen fenolik bileşikler

Fenolik bileşik	Geliş zamanı (dakika)	Mevcudiyet
Gallik asit	6.5	+
Klorojenik asit	8.7	+
Kafeik asit	9.45	+

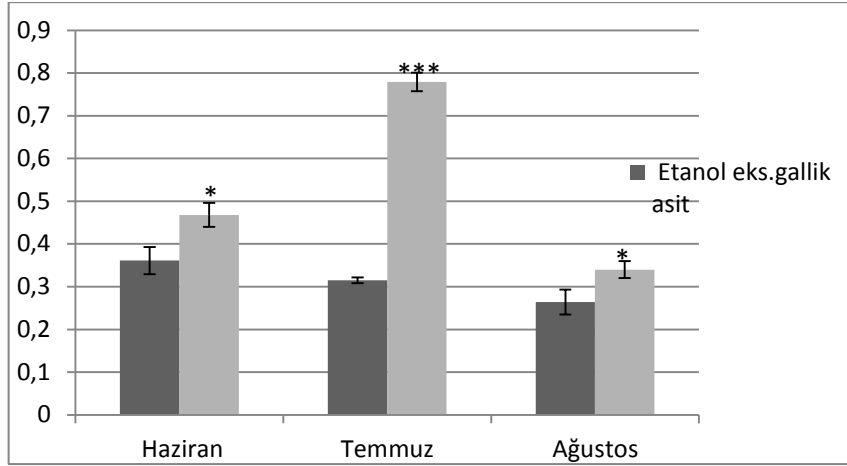
\*Fenolik bileşiklerin tanımlanması işlemi; ko-kromatografi, fenolik bileşik standartlarının spektral karakteristikleri ve alıkonulma zamanları ile mukayese edilmesi sonucu gerçekleştirildi.

#### Deve gülü bitkisinde tespit edilen fenolik asitler

##### *Gallik asit:*

Bu bileşik 6.5'inci dakika geliş zamanına sahip olup, en yüksek absorpsiyonu 280 nm'de gösterdi. Parçalanma iyonu olarak negatif modda 125 m/z fragmanı elde edildi. SRM' de negatif modda 169 m/z'ye 125 m/z fragmanı elde edildi. Özgün Gallik asit standardının sıvı kromatografisinde ko-kromatografi ve kütle spektrumu bulguları ile bu bileşiğin Gallik asit olduğu belirlendi. Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi en yüksek gallik asit miktarı (0.779 mg/kuru ağırlık) Temmuz ayına ait infüzyon örneklerinde, en düşük miktarı ise Ağustos ayına ait etanol ekstraktlarında (0.264 mg/kuru ağırlık) elde edilmiştir.

Şekil 4.17'de görüldüğü gibi, her üç vejetasyon döneminde de infüzyonu yapılan örneklerin gallik asit miktarı etanol ekstraktlarından anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

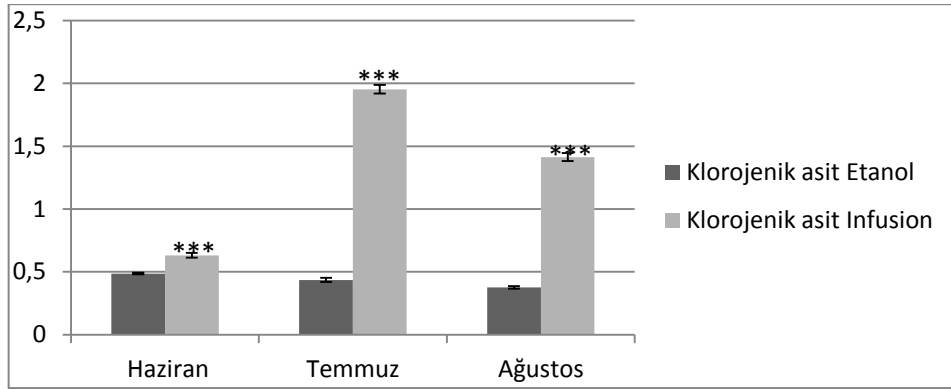


Şekil 4.17. Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerinde tespit edilen Gallik asit miktarının ekstraksiyon çözgenine göre değişimi, \*  $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

#### *Klorojenik asit:*

Bu bileşik 8.7'inci dakika geliş zamanına sahip olup, en yüksek absorpsiyonu 326 nm'de gösterdi. Parçalanma iyonu olarak negatif modda 191 m/z fragmanı elde edildi. SRM' de negatif modda 353 m/z'ye 191 m/z fragmanı elde edildi. Özgün klorojenik asit standardının sıvı kromatografisinde ko-kromatografi ve kütle spektrumu bulguları ile bu bileşiğin klorojenik asit olduğu belirlendi (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi en yüksek klorojenik asit miktarı Temmuz ayına ait infüzyon örneğinde ( $1.953\pm 0.035$  mg/kuru ağ.) elde edilirken en düşük miktar ise Ağustos ayında ( $0.376\pm 0.010$ ) elde edilmiştir. Şekil 4.18. de görüldüğü gibi infüzyonu yapılan her üç vejetasyon dönemine ait bitki örneklerinde tespit edilen klorojenik asit miktarı etanol ekstrelerinde tespit edilenden anlamlı olarak ( $p<0.001$ ) yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.18. Deve gülü bitkisinin infüzyon ve etanol ekstralarında tespit edilen klorojenik asidin vejetasyon dönemlerine ve ekstraksiyon çözgenine göre değişimi, \*\*\*p<0.001.

#### Kafeik asit:

Bu bileşik en yüksek absorpsiyonu 326 nm’de gösterdi 9.45’inci dakikada gözlemlendi. Parçalanma iyonu olarak negatif modda 191 m/z fragmanı elde edildi. SRM’ de negatif modda 353 m/z’ye 191 m/z fragmanı elde edildi. Bu bilgiler sonucunda, bu bileşiğin kafeik asit olduğu belirlendi. Çizelge 4.10’da görüldüğü gibi en yüksek kafeik asit miktarı Haziran ayına ait (1.256 mg/kuru ağ.) infüzyon örneğinde tespit edilirken en düşük miktar ise Ağustos ayına ait (0.258 mg/kuru ağ.) infüzyon örneklerinde tespit edilmiştir.

Çizelge 4. 10. Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerinde HPLC ve LC-MS/MS ile tespit edilen fenolik asit içeriği

Gallik asit		
Konsantrasyon (mg/kuru ağırlık)		
	[M+1]+/ [M-1]-	-/169
	Fragments (m/z) (+/-)	-/125
Vejetasyon dönemi	Etanol ort. ± SS	İnfüzyon ort. ± SS
Haziran	0.361 ± 0.032	0.468 ± 0.028
Temmuz	0.315 ± 0.007	0.779 ± 0.0216 <sup>a</sup> ,
Ağustos	0.264 ± 0.029 <sup>ab</sup>	0.340 ± 0.0197 <sup>ab</sup> ,

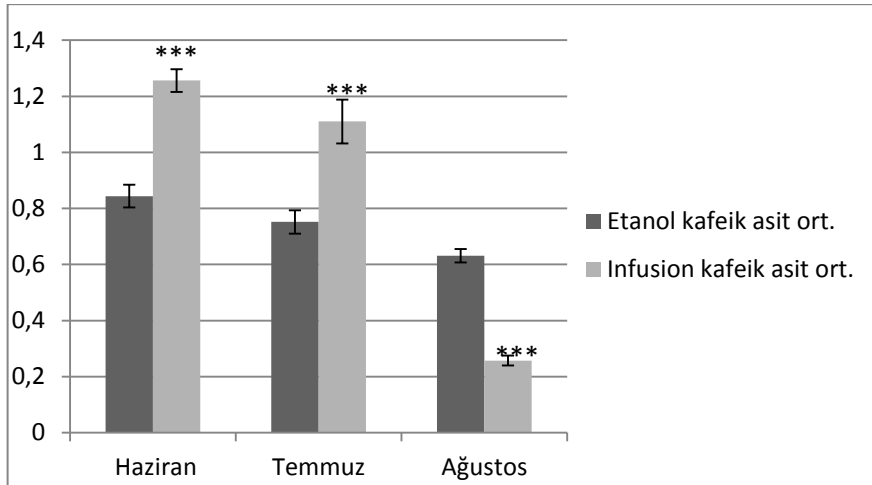


Çizelge 4.10. Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerinde HPLC ve LC-MS/MS ile tespit edilen fenolik asit içeriği (devam)

<b>Klorojenik asit</b>		
<b>Konsantrasyon (mg/kuru ağırlık)</b>		
	<b>[M+1]<sup>+</sup>/ [M-1]<sup>-</sup></b>	<b>-/353</b>
	<b>Fragments (m/z) (+/-)</b>	<b>-/191</b>
<b>Vejetasyon dönemi</b>	<b>Etanol ort. ± SS</b>	<b>İnfüzyon ort. ± SS</b>
Haziran	0.488 ± 0.006	0.632 ± 0.019
Temmuz	0.436 ± 0.017 <sup>a</sup>	1.953 ± 0.035 <sup>a</sup>
Ağustos	0.376 ± 0.010 <sup>ab</sup>	1.413 ± 0.032 <sup>ab</sup>
<b>Kafeik asit</b>		
<b>Konsantrasyon (mg/kuru ağırlık)</b>		
	<b>[M+1]<sup>+</sup>/ [M-1]<sup>-</sup></b>	<b>-/353</b>
	<b>Fragments (m/z) (+/-)</b>	<b>-/191</b>
<b>Vejetasyon dönemi</b>	<b>Etanol ort. ± SS</b>	<b>İnfüzyon ort. ± SS</b>
Haziran	0.844 ± 0.041	1.256 ± 0.040
Temmuz	0.752 ± 0.042 <sup>a</sup>	1.111 ± 0.079 <sup>a</sup>
Ağustos	0.631 ± 0.024 <sup>ab</sup>	0.258 ± 0.018 <sup>ab</sup>

a: Temmuz ve Ağustos ayındaki değerlerin Haziran ayına göre anlamlı ( $p < 0.05$ ) olarak artış veya azalışını, b: Ağustos ayındaki değerlerin Temmuz ayına göre anlamlı ( $p < 0.05$ ) olarak artış veya azalışını göstermektedir. SS; standart sapma.

Şekil 4.19. de görüldüğü üzere aylara göre infüzyon ve etanol ekstrelerindeki kafeik asit miktarı değerlendirildiğinde, infüzyon ekstrelerinin etanole göre anlamlı şekilde ( $p < 0.001$ ) yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ağustos ayına ait infüzyon örneklerindeki miktarın ise etanole göre anlamlı şekilde ( $p < 0.001$ ) azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.19. Deve gülü bitkisinin infüzyon ve etanol ekstralarında tespit edilen kafeik asidin vejetasyon dönemlerine göre değişimi, \*\*\*p<0.001.

#### Antioksidan kapasite ve fenolik içeriğin değerlendirilmesi

Bu çalışmada tespit edilen kafeik, klorojenik ve gallik asitlerin *in vitro* ve *in vivo* antioksidan etkileri daha önceki çalışmalarda (Kahkonen ve ark., 1999; Sato ve ark., 2011; Gonthier ve ark., 2003) bildirilmiştir. *Alcea* türlerinde hidrosibenzoik (kafeik ve klorojenik asit) ve hidrosinamik asidin (gallik asit) de içinde olduğu çok çeşitli fenolik varlığı daha önceki çalışmalarda tespit edilmiştir (Gudej, 1989; Valiei ve ark., 2011; Al-Snafi ve ark. 2013). Klorojenik ve kafeik asidin aromatik bir kalıntı üzerinde bitişik hidroksil gruplara sahip olduğu (Rice-Evans ve ark., 1996), kafeik asidin klorojenik asitten daha güçlü bir antioksidan aktivite gösterdiği (Sato ve ark., 2011) tespit edilmiştir.

Antioksidan aktivite ve fenolik içerik verimi, farklı ekstrakte edici solventlerden etkilenmektedir (Sun ve Ho, 2005). Deve gülü bitkisinde en yüksek antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik su çözgeniyle yapılan deneylerde gözlenmiştir. Özellikle meyve dönemi olan Temmuz ayına ait bitki örneklerinin su ile infüzyonunun FCR, ORAC ve FRAP değerleri yüksek tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Deve gülü bitkisiyle aynı familyaya (*Malvacea*) ait *Hibiscus sabdariffa* L. ile yapılan bir çalışmada en yüksek ekstraksiyon veriminin su ekstraktında gözlendiği bildirilmiştir (Şen, 2011). Benzer sonuçlar Cheung ve ark. (2003), tarafından yenilebilir mantarların su ve metanol ekstralarıyla, İsmail ve Hong (2002)'un su yosunlarının su ve etanol ekstralarıyla

yaptıkları antioksidan çalışmalarında da elde edilmiştir. Nagai ve ark. (2003), propolisin sulu ekstrelerinde antioksidan aktiviteye neden olabilecek amino asitler, fenolik asitler ve flavonoidler tespit ederken, Dreosti (2000); çay, kakao ve üzümün sulu ekstrelerinde yüksek antioksidan aktivite bildirmiştir. Anlas ve ark. (2017), Türkiye endemiği olan *Achillea nobilis* ve *Alcea apterocarpa* bitkilerinin suyla infüzyonunun, dekoksilyonunun, %96 etanol ve n-hekzan ekstraksiyonunun toplam fenolik ve antioksidan kapasitelerini karşılaştırdıkları çalışmalarında en yüksek toplam fenolik içeriği *A. nobilis* subsp. *sipylea*'nın infüzyon ekstrelerinde elde etmişlerdir. Caunii ve ark. (2011), aktif bileşenlerin miktarının, ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak değiştiğini bildirmiştir. Elde edilen veriler, önceki çalışmalarla (Kang ve ark. 2003; Musa ve ark. 2011; Addai ve ark. 2011; Chaturvedi ve ark. 2015) uyumlu olarak, solventin polaritesindeki artışın fenoliklerin çözünürlüğünü arttırarak daha yüksek antioksidan aktiviteye neden olduğu bilgisini desteklemektedir. Deve gülü bitkisiyle ilk kez yapılan bu çalışmayla, Temmuz ayında bitkinin suyla yapılan infüzyonunda antioksidan kapasitenin (FC, FRAP, ORAC), diğer dönemlere ve etanol çözüneğine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Antioksidan kapasite ile toplam fenolik madde arasında anlamlı bir ilişki vardır ve bitkinin yetiştiği ortam, genetik yapısı ve maruz kaldığı stres nedeniyle antioksidan kapasite bitkiden bitkiye farklılık göstermektedir (Dudonné ve ark., 2009). Bitkilerin içerdiği toplam fenolikler, antioksidan aktiviteyi etkilemesi (Katalinić ve ark., 2004), antimutagenik ve antitümör etkiye sahip olması nedeniyle önem taşır (Kono ve ark., 1995).

Deve gülü bitkisinin antioksidan kapasite sonuçları, Şen (2011)'in *Hibiscus sabdariffa* (*Malvaceae*)da, Dalar ve ark.(2016)'nın *Malva neglecta* (*Malvaceae*) da tespit ettikleri FC oranlarıyla, Liu ve ark.(2008)'nin bildirdiği nane yaprağı, Japonya'da yaygın olarak kullanılan peril yaprağı ve Çin'de kullanılan dut yaprağı sonuçları ile ve Konczak ve ark. (2010)'nın altı farklı bitkide buldukları sonuçlarla uyumludur. Deve gülü bitkisinin toplam FC değerleri Kähkönen ve ark. (1999)'nın *Matricaria chamomilla*, *Ranunculus repens*, *Trifolium pratense* için bildirdiği değerlerden daha yüksek bulunmuştur. Farklı vejetasyon dönemlerinde Deve gülünün FC miktarları

Bouayed ve ark. (2007)'nin İran da yetişen Deve gülünde tespit ettikleri ( $2.15 \pm 0.1$  mg GAE/g kuru ağırlık) miktardan daha yüksek çıkmıştır.

Deve gülü bitkisinin FRAP değeri Li ve ark. (2008)'nin bildirdiği bazı şifalı bitkilerininkilerle, Dalar ve ark. (2012), bildirdiği *Malva neglecta*'nın FRAP değerleriyle ve Konczak ve ark.(2010)'nin bildirdikleri sonuçlar ile uyumludur.

Deve gülü bitkisinin ORAC miktarları, Dalar ve ark. (2016)'nın *Malva neglecta* (*Malvacea*) için bildirdikleri ORAC değerleriyle, Kratchanova ve ark. (2010)'nın bazı tıbbi bitkiler için bildirdikleri sonuçlar ile, Konczak ve ark. (2010)'nin defne yaprağının ORAC değerleriyle uyumludur.

Deve gülü bitkisiyle ilk kez yapılan bu çalışmada, hem fenolik içerik (kafeik, klorojenik ve gallik asitler) hem de antioksidan aktivitenin en yüksek değerleri infüzyonu yapılan Temmuz dönemine ait bitki örneklerinde tespit edilmiştir. Toplam fenolik içerik ile antioksidan kapasite arasındaki doğrusal ilişki daha önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Velioglu ve ark. 1998; Nagai ve ark. 2003). İnfüzyon ekstrelerinden Temmuz ayına ait örneklerde antioksidan özelliklerin (FRAP, ORAC, FCR) yüksek çıkması, en yüksek miktarlarına Temmuz ayına ait infüzyon ekstrlerinde sahip olan kafeik asit ve klorojenik asit ile ilişkilendirilmiştir. Farklı vejetasyon dönemlerinde Deve gülü bitkisinde fenolik ve antioksidan kapasitede değişikliklerin görülmesi daha önce farklı bitkilerle yapılan çalışmalarda biyoaktif bileşiklerin, genotip ve olgunluk aşamasına göre değişebildiği bilgileriyle uyumludur (zeytinde Ryan ve ark., 1999; kekikde Özkan ve ark., 2010; biberde Ghasemnezhad ve ark., 2011; bamyada Nair, 2013; çayda Şavşatlı ve ark., 2018). Fenolik bileşikler ve antioksidan özellikler, farklı büyüme mevsimleri arasındaki sıcaklık, güneş ışınımı, yağış ve hidrotermik katsayı gibi iklim faktörlerinin etkisiyle mevsimsel varyasyonlar gösterebilir (Xu ve ark., 2011). Mevsimsel değişiklikler Deve gülü bitkisinde strese neden olarak fenolik sentezini dolayısıyla da antioksidan kapasiteyi arttırıp azaltabilir. Bitkilerde çiçeklenme döneminden sonra meyve döneminde biyoaktif moleküller en yüksek seviyede iken tohum döneminde senesensin de başlaması ile birlikte kloroplast DNA'sı yıkılmaya başlar. DNA yıkımı klorofillerin parçalanmasına neden olarak yaprağın fotosentetik kapasitesini de ani bir şekilde düşürür. Nükleik asit, lipid ve proteinler parçalanmaya başlar (Sağlam, 2015). Işığın etkisiyle kloroplastlarda sentezlenerek vakuollerde

depolanan fenolikler, ilkbahar yapraklarında sonbahardakine oranla daha fazla miktarda bulunur (Kefeli ve ark., 2003). Zouari ve ark. (2011), *Malva aegyptiaca* (*Malvaceae*)'nın bitkinin vejetatif döngü sırasındaki metabolik ve fizyolojik değişiklikleriyle ilişkili olarak toplam fenolik maddelerinin büyük farklılıklar gösterdiğini bildirmiştir. Aynı şekilde Schwob ve ark. (2004), *Hypericum perforatum*' un farklı fenolojik dönemlerinde içerdiği kimyasal bileşenlerini araştırdıkları çalışmalarında, fizyolojik ontogenez sürecinde meydana gelen morfolojik modifikasyonların sekonder metabolizmadaki modifikasyonlara eşlik ettiğini tespit etmişlerdir. Tohum dönemine geçerken fotosentezin azalması beraberinde sekonder metabolit (fenoliklerin) üretiminin azalmasına ve dolayısıyla antioksidan kapasitede düşüşe neden olabilir. Deve gülü bitkisinin meyve dönemi olan Temmuz ayında yaprak yüzeyinin genişlemiş olması, sıcaklık, dönemsel güneş ışınlarının etkisi, fotosentezi ve dolayısıyla metabolik faaliyetleri arttırmaktadır. Fotosentez ürünlerinin fosföfenol pürivattan şikimik asit yoluyla fenolik asitlere (kafeik, gallik ve klorojenik asit) dönüşümü artmıştır. Temmuz döneminde fenoliklerin artması antioksidan kapasitenin de artmasına neden olmuştur.

#### Mineral Madde ve protein miktarlarının tayini

Bitki örneklerine ait mineral içerikleri, nitrik asit ( $\text{HNO}_3$ ) ve hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) asit solüsyonları kullanılarak mikrodalga ekstraksiyon sistemi ile homojenize edilerek, atomik absorpsiyon spektrometresi (AAS) (Thermo Scientific, USA) ve indüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) (Thermo scientific, USA), cihazları kullanılarak belirlenmiştir. Analizler üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Tüm element miktarları  $\text{mg kg}^{-1}$  veya  $\text{g kg}^{-1}$  kuru ağırlık cinsinden hesaplanmıştır. Elementlerin limit değerlerini tespit için Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü referans malzemeleri kullanıldı. AAS ve ICP-OES cihazlarında bitki analiz edilmeden önce Milestone Ethos Easy Microwave digestion system (mikro dalga yaş yakma) cihazında, 200 mg kurutulmuş bitki yaprağı örneğinin üzerine 2 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve 6 ml  $\text{HNO}_3$  eklenerek teflon tüplerde  $200^\circ\text{C}$  de, 35 bar basınçta, 45 dakika boyunca çözünürleştirilmiştir.

Atomik absorpsiyon ve ICPOES ile yapılan analiz sonucu "Eş 4.1" deki şekilde

hesaplanmıştır:

$$Sf_1 = \text{seyreltme faktörü} \quad Sf_T = \text{bitkideki mineral miktarı} \quad (4.1)$$

$$Sf_1 = \frac{\text{yaş yakmanın seyreltildiği son hacim}}{\text{yaş yakma için tartılan bitki miktarı}}$$

$$Sf_T = Sf_1 \times \text{seyreltme katsayısı} \times \text{cihazda okunan değer}$$

Makro ve mikro besin elementlerinin bitki hayatında önemli rolleri vardır. Özellikle de çok çeşitli metabolik yollarda görev alan enzimlerin yapısına girerek işlevlerini yerine getirirler. Eksikliklerinde bitkilerde başta klorozis ve renk değişimleriyle birlikte yaprak kıvrılması, yaprakta beneklenme ve yaprak dökülmesi olmak üzere birçok morfolojik ve fizyolojik eksiklik ve değişiklikler meydana gelir (Taiz ve Zeiger, 2008). Bitki büyümesi için Ca ve Mg klorofillerin, metaloenzimlerin ve ikincil metabolitlerin bileşenleri olmaları (Olukayode ve ark., 2003) ve K ise özellikle hücre turgor basıncının ve elektronötlülüğünün dengelenmesinin yanısıra birçok enzimin kofaktörü olarak önemli rol oynaması (Taiz ve Zeiger, 2008) nedeniyle birçok bitkinin en bol metal bileşenini temsil etmektedirler. Deve gülü bitkisinin de verilen Ca, Mg ve K içerikleri diğer minerallerinden önemli ölçüde yüksektir ve bu bulgu önceki çalışmalarda bulgularla uyumludur (Fagbohun ve ark., 2012; Falade ve ark., 2005; Rami ve ark., 2014). K ve Mg miktarları Ağustos ayında Haziran ve Temmuz aylarına göre anlamlı miktarda azalırken, Ca ise Haziran ve Temmuz aylarında, Ağustos'a göre anlamlı şekilde azalmaktadır (Çizelge 4.11). Azot, protein molekülünün oluşumunda ve DNA yı oluşturan azotlu bazların yapısında, canlıların temel yapıtaşını oluşturan amino asitlerin ve strese karşı savunma görevi gören sekonder metabolitlerin ve metabolik olaylarda rol alan enzimlerin yapısında bulunması nedeniyle önem taşır. Tıbbi bir bitki olan Deve gülünün, farklı vejetasyon dönemlerindeki azot içerikleri literatürde bildirilen bazı tıbbi bitkilerin azot miktarlarıyla uyumludur. Haziran (çiçeklenme) döneminde en yüksek azot (39.14 g/kg kuru ağı) miktarlarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Temmuz ve Ağustos ayındaki N değerinin Haziran ayına göre anlamlı olarak düşmesiyle birlikte, Ağustos ayında N konsantrasyonu Temmuz ayına göre de anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (Çizelge 4.11). Sonuçlar, Rao ve Lakshminarayana (1984)'nın *Malvacea* familyasına ait farklı türlerin tohumlarında %12.5 ile %20.2 (kuru ağı) arasında bildirdikleri protein miktarlarıyla uyumaktadır. Na, C4 ve CAM bitkilerinde

fosfoenolpürivatın yeniden oluşturulmasında görevli olduğu gibi, gerektiğinde potasyumun yerini almaktadır (Taiz ve Zeiger, 2008). Deve gülü bitkisinde Na miktarındaki vejetasyon dönemlerine bağlı değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.11). Pytlakowska ve ark. (2012), beş farklı tıbbi bitkide Na miktarını  $133 \pm 2$   $\mu\text{g/g}$  ile  $563 \pm 3$   $\mu\text{g/g}$  arasında bildirirken, Fagbohun ve ark. (2012), *Urena lobata* L. (*Malvacea*) bitkisinde 29.48 mg/100g, Rami ve ark. (2014) ise *Sida acuta* (*Malvacea*) bitkisinde, Na miktarını 110 mg/100g olarak tespit etmiştir. Bizim çalışmamızda Deve gülü bitkisinde Na miktarı 0.327g/kg ile 0.456g/kg arasında tespit edilmiştir.

Çizelge 4. 11. Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerindeki makroelement içeriği

Makroelementler (g/kg)	Haziran $\pm$ SS	Temmuz $\pm$ SS	Ağustos $\pm$ SS
Na	0.456 $\pm$ 0.027	0.327 $\pm$ 0.100	0.352 $\pm$ 0.084
Mg	3.042 $\pm$ 0.090	2.572 $\pm$ 0.484	2.460 $\pm$ 0.298 <sup>a</sup>
K	20.681 $\pm$ 0.323	18.316 $\pm$ 1.851	15.134 $\pm$ 1.603 <sup>a</sup>
Ca	21.968 $\pm$ 0.541	21.282 $\pm$ 2.133	24.824 $\pm$ 2.334
N	39.135 $\pm$ 0.654	22.901 $\pm$ 0.413 <sup>a</sup>	19.634 $\pm$ 1.020 <sup>ab</sup>

a: Temmuz ve Ağustos ayındaki değerlerin Haziran ayına göre anlamlı olarak artış veya azalışını,

b: Ağustos ayındaki değerlerin Temmuz ayına göre anlamlı olarak artış veya azalışını göstermektedir.

SS; standart sapma.

Fe, Mn, Zn ve Cu, bütün canlı organizmalar için çeşitli biyokimyasal fonksiyonlara sahip temel mikro besinler olmalarına rağmen yüksek konsantrasyonlarda alınmaları halinde zararlı olabilmektedirler (Korkmaz ve ark., 2010). Zn, protein sentezi, enerji üretimi ve biyomembranların yapısal bütünlüğünün korunmasında görevli enzimlerin yapısına katılır. Tohum gelişiminde de önemli rol oynar ve çinko eksikliği olan bitkiler gecikmiş bir olgunluk gösterir (Kramer ve Clemens, 2005). Deve gülünde Zn miktarı, Ağustos ayında Temmuz'a göre anlamlı olarak azalırken, Haziran ayında her iki aydan daha yüksek olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). FAO/WHO (1984) tarafından Zn için izin verilen sınır yenilebilir bitkiler için 27.4 mg/kg dır. Deve gülü bitkisinde Zn miktarının toksik sınırların altında olduğu belirlenmiştir (Max.

18.765±0.334 mg/kg). Pytlakowska ve ark. (2012), sarı kantaron, nane, melisa, adaçayı ve papatya gibi tıbbi bitkilerin mineral içeriklerini tespit ettikleri çalışmada; Zn; 56.6±0.2 µg/g ile 75.5±0.3µg/g arasında tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Cu, bitkilerde fotosentez ve mitokondriyal solunum, karbon ve azot metabolizması, oksidatif stres koruması ve hücre duvar sentezi için gereklidir (Hänsch ve Mendel, 2009). Cu konsantrasyonunun Temmuz ve Ağustos aylarında Haziran ayına göre anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 4.12). Queralt ve ark. (2005), beş farklı tıbbi bitkinin Cu miktarının 10-27 mg/kg arasında değiştiğini belirtmiştir. Korkmaz ve ark. (2010), 21 farklı kenevir tohumunun Cu miktarının 9-12 mg/kg arasında tespit etmiştir. Yaşam için büyük öneme sahip olan Fe, mitokondriyal solunum, azot asimilasyonu, hormon biyosentezi, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve atılması, osmokoruma ve patojen savunması ile ilgilidir (Yang ve ark., 2006). Çizelge 4.12'de görüldüğü gibi Deve gülü bitkisinde Fe miktarı, Temmuz ayında Haziran ve Ağustos'a göre anlamlı şekilde azalmıştır. Queralt ve ark. (2005), beş farklı tıbbi bitkide Fe miktarını 89-853mg/kg olarak, Korkmaz ve ark. (2010), farklı kenevir türlerinde 98-121mg/kg olarak tespit ederken Fagbohun ve ark. (2012), *Urena lobata* L. (*Malvacea*) da 9.35mg/100g olarak bildirmiştir. Mangan, bitkilerde sekonder metabolit üretimi için önemli olan shikimik asit metabolik yolu, giberellik asit biyosentezi, RNA polimeraz aktivasyonu ve yağ asidi biyosentez yollarında görev alan enzimlerin yapısına katılır (Hänsch ve Mendel, 2009). Deve gülü bitkisinde Mn 26.5-36.22mg/kg olarak vejetasyon dönemine göre farklılık göstermiştir. Mn konsantrasyonu, Temmuz ayında Hazirana göre istatistiki olarak anlamlı oranda azalırken Ağustos ayında Temmuz'a göre anlamlı olarak artmıştır. Sonuçlar, daha önce *Malvacea* familyası üyeleriyle yapılan çalışmalarla (Zouari ve ark., 2011; Fagbohun ve ark., 2012) uyumluluk göstermektedir. Mn, bazı dehidrogenazların, dekarboksilazların, kinazların, oksidazların, peroksidazların aktiviteleri ve fotosentetik O<sub>2</sub> üretimi için gereklidir (Taiz ve Zeiger, 2008).



Çizelge 4. 12. Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerindeki mikroelement içeriği

Mikroelementler (mg/kg)	Haziran±SS	Temmuz±SS	Ağustos±SS
Mn	33.893 ± 0.314	26.592 ± 0.932 <sup>a</sup>	36.217 ± 2.771 <sup>b</sup>
Cu	5.932 ± 0.487	4.147 ± 0.306 <sup>a</sup>	3.628 ± 0.195 <sup>a</sup>
Zn	18.765 ± 0.334	12.000 ± 0.709 <sup>a</sup>	9.983 ± 0.252 <sup>ab</sup>
Fe	441.617 ± 21.240	403.67 ± 11.666	431.756 ± 28.928

a: Temmuz ve Ağustos ayındaki değerlerin Haziran ayına göre anlamlı olarak artış veya azalışını,  
b: Ağustos ayındaki değerlerin Temmuz ayına göre anlamlı olarak artış veya azalışını göstermektedir.  
SS; standart sapma

Ağır metalleri alma, tolere etme ve biriktirme yetenekleri bitki türlerine göre değişebildiği gibi, aynı türün bireyleri arasında da farklılık gösterebilmektedir (Angelova ve ark., 2004). Cobalt, B-12 vitaminin bir parçasıdır. İnsandaki eksikliği, bazı biyolojik süreçleri ciddi şekilde etkilemektedir (Taylor ve Sullivan 2008). Deve gülü bitkisinde Se miktarı 0.92-1.27 mg/kg aralığında değişmektedir. Ağır metallerin konsantrasyonunda istatistiki olarak farklı vejetatif dönemlerde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Çizelge 4.13). Deve gülü bitkisinde Co miktarı 0.38-0.45mg/kg arasında değişmektedir (Çizelge 4.13). Başgel ve Erdemoğlu (2006), test ettikleri bazı tıbbi bitkilerin Co değerini 0.14 ile 0.40 mg/kg arasında tespit etmiştir. Kadmiyum gıdalarda ve doğal sularda önemsiz bir elementtir ve esas olarak böbrekler ve karaciğerde birikmektedir (Castagnetto ve ark., 2002). Gıdalardaki kadmiyum çoğunlukla çeşitli çevresel kirlilik kaynaklarından elde edilir (Divrikli ve ark., 2006). Tıbbi bitkilerde Cd değerinin maksimum 0.3 mg/kg a kadar toksik olmadığı kabul edilmektedir (WHO, 1998). Çizelge 4.13’de görüldüğü gibi Deve gülü bitkisinin tohum döneminde Cd değeri WHO’nun (1998) önerdiği değerler arasında bulunmuştur (0,29 mg/kg). Divrikli ve ark. (2006), farklı tıbbi bitkilerde kadmiyum değerini 0.2–2.7 µg/g arasında tespit ederken Başgel ve Erdemoğlu (2006), beş farklı tıbbi bitkide Cd değerini 0.004 ile 0.44 mg/kg aralığında belirlemişlerdir. Cr, fazla alındığında biyolojik indirgenlerle reaksiyonlara girerek, reaktif oksijen türleri oluşturmakta böylece DNA ve protein sentezine zarar veren oksidatif strese neden olmaktadır (Stohs ve Bagchi, 1995). Deve gülünde Cr miktarı 5.9 mg/kg ile 7.06 mg/kg arasında değişmektedir (Çizelge 4.13). Özcan (2004), fesleğen, biberiye, defne ve lavantadaki krom konsantrasyonlarını

7.95 ile 19.0 µg/g arasında değişen değerlerde tespit ederken Divrikli ve ark. (2006), biberiye, fesleğen ve defnede Cr değerini sırasıyla 0.1 ile 9.7 µg/g arasında belirlemiştir. Selenyumun erken yaşlanma ve dejeneratif hastalıklara karşı etkili bitkisel antioksidanlardan olduğu, Se uygulanan hastalarda tümörün genellikle kökenle sınırlı kalarak, uzak metastazın daha az görüldüğü (Obiajunwa ve ark.,2002), enflamatuar ve immün yanıtlarda modülatör olarak aktif bir role sahip olduğu (Neve, 1991) bildirilmiştir. Özcan ve ark. (2003), kimyon, dereotu, nanede Se miktarını sırasıyla 1.41, 1.65, 1.12 mg/kg olarak bulmuşlardır. Deve gülü bitkisinde Se miktarı 0.924 ile 1.274 mg/kg arasında değişmektedir. Temmuz ayındaki Se miktarı Haziran ve Ağustos aylarındakine göre anlamlı olarak artmıştır.

Çizelge 4. 13. Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerindeki ağır metal içeriği

Ağır metaller (mg/kg)	Haziran±SS	Temmuz±SS	Ağustos±SS
Cd	0.308 ± 0.118	0.247 ± 0.026	0.289 ± 0.031
Co	0.454 ± 0.096	0.378 ± 0.054	0.450 ± 0.058
Cr	6.670 ± 0.778	5.972 ± 0.850	7.060 ± 1.149
Se	1.012 ± 0.112	1.274 ± 0.418	0.924 ± 0.081

a: Temmuz ve Ağustos ayındaki değerlerin Haziran ayına göre anlamlı olarak artış veya azalışını, b: Ağustos ayındaki değerlerin Temmuz ayına göre anlamlı olarak artış veya azalışını göstermektedir. SS; standart sapma.

Deve gülü bitkisi toprak üstü kısımlarının protein miktarı Temmuz ve Ağustos aylarında Haziran ayına göre anlamlı olarak azalmasının yanında Ağustos ayındaki miktarın Temmuz ayına göre de anlamlı olarak düştüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.12). Azot ve protein oranı birlikte değerlendirildiğinde protein miktarındaki azalmanın azot miktarındaki azalmayla orantılı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12). Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerindeki protein miktarları Zouari ve ark. (2011)'nin *Malva aegyptiaca* (Malvacea) (8.7g/100g(kuru ağ.)) ve *M. sylvestris* (Malvacea) (12.25g/100g (kuru ağ.)) için bildirdikleri miktarlardan daha yüksek olarak bulunmuştur. Kabir ve ark. (2016), Pakistan'ın beş farklı tıbbi bitkisinin toprak üstü kısımlarıyla yaptıkları çalışmada, protein miktarlarını %8.148( kuru ağırlık) ile %17.28 (kuru ağırlık) arasında değişen değerlerde bildirmiştir. Bitkinin çiçeklenmeye geçtiği Haziran ayı dönemi aynı zamanda yaprak sayısının en fazla ve taze olduğu dönem olması nedeniyle protein sentezinin ve sekonder metabolit üteriminin de en fazla olduğu dönem

olarak düşünülmektedir. Benzer sonuçlar Zouari ve ark. (2011) tarafından *Malva aegyptiaca* L. (*Malvaceae*) ile yaptıkları çalışmada bildirilmiştir. Aynı zamanda yöre halkı Deve gülü bitkisini özellikle yapraklarının en fazla olduğu Haziran ayında toplayarak tedavi amacıyla kullanmaktadır.

Çizelge 4. 14. Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerindeki protein içeriği

Element	Haziran±SS	Temmuz±SS	Ağustos±SS
Protein (g/kg)	244.593 ± 4.086	143.133 ± 2.578 <sup>a</sup>	122.712 ± 6.375 <sup>ab</sup>
Azot (g/kg)	39.135 ± 0.654	22.901 ± 0.413 <sup>a</sup>	19.634 ± 1.020 <sup>ab</sup>

a: Temmuz ve Ağustos ayındaki değerlerin Haziran ayına göre anlamlı olarak artış veya azalışını, b: Ağustos ayındaki değerlerin Temmuz ayına göre anlamlı olarak artış veya azalışını göstermektedir. SS; standart sapma.

Haziran ayında yaprak sayısının en fazla olduğu dönemde protein miktarının da en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. Bu da morfolojik olarak gelişme döneminde olan Deve gülü bitkisinde protein sentezinin de fazla olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Meyve ve tohum döneminde ise protein miktarının giderek azalması, Nair (2013)'in bildirdiği bamyanın meyve döneminden tohum dönemine geçerken proteinlerdeki azalmayla uyumludur. Nair (2013), protein kaybının, proteinojen amino asitlerin perikarptan tohumlara translokasyonuna bağlı olabileceğini açıklamıştır. Böylece normal bitki büyümesi koşulları altında, protein parçalanma ürünlerinin büyüyen tohumlara aktarıldığı düşünülmektedir.

Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerindeki makro ve mikro element, ağır metal ve protein içeriği ilk kez tespit edildiği bu çalışmada, metabolik faaliyetlerin yoğunlaşmaya başladığı çiçeklenme dönemi olan Haziran ayında makro ve mikro elementler diğer aylara göre daha yüksek belirlenmiştir. Ağır metaller ise vejetasyon dönemlerine göre anlamlı bir farklılık göstermeyerek yenilebilir bitkilerde olması gereken sınırlarda belirlenmiştir. Tıbbi bitkilerin mineral içeriklerinin belirlenmesi, besin içerikleri ve farmakolojik fonksiyonlarını dikkate alarak, tedavi amaçlı kullanılmak üzere önerilen bitki dozlarının tanımlanması açısından oldukça önemlidir. Bitkilerin mineral ve protein içerikleri yetiştikleri ortamın özelliklerinden etkilendikleri gibi farklı vejetasyon dönemlerinde de değişebilmektedir.

#### **4.3.4. Deve gülü bitkisinin antioksidan kapasitesinin ve fenolik asitlerinin doku kültüründe arttırılması**

Fenoliklerin genel olarak olumsuz evre koşullarında bitki biyotik ve abiyotik stres altındayken sentezlenen fitokimyasallar olduğu belirtilmiştir (Fini ve ark., 2011). Tıbbi bitki doku kültürlerinde hedef ikincil metabolitlerin sentezini etkileyen bir dizi fiziksel ve kimyasal faktörler vardır. Bunlar; ışık, pH, elektrik, manyetik, elektromanyetik radyasyon, mekanik kuvvet, ultrasonik, ortam tipleri, ortam tuzu, inokulum yoğunluğu, karbon kaynağı, azot kaynağı, kuraklık, su, UV, yaralı yüzeylerden patojen enfeksiyonu ve bazı eser metal iyonları olarak sıralanabilir (Collin, 2001; Kefeli ve ark; 2003 Wang ve ark., 2017). Ayrıca çimlenmenin farklı aşamalarında fenol konsantrasyonu artmış veya azalmış olabilir (Thomas ve Ravindra, 1999).

Deve gülü bitkisinin fenolik madde miktarına bazı stres faktörlerinin etkisini incelemek için, MS de 28 gün bekletilip genç yaprakları oluşan sürgünler kullanılmıştır. Fenolikler, yapraklarda sentezlendikten sonra diğer doku ve organlara taşınır (zyiğit, 2008). Kallus kültürlerinde yaprak oluşumu görülmediği için taze yaprak taşıyan sürgün uçlarının fenolik üretiminde kalluslara göre daha aktif olacağı dşnlmştir. zyiğit (2008), Deve gl ile aynı familyadan olan pamuk bitkisinin yaprak ve sürgünlerini kültüre aldıktan sonraki üçüncü ve dördüncü haftalarda (20 ile 30 gün arası), fenolik madde miktarının en üst seviyeye ulaştığını bildirmiştir. Benzer sonuçlar Lorenzo ve ark. (2001) tarafından şeker kamışı kültürlerinde, İslam ve ark. (2003) tarafından patates hücre kültürlerinde de bildirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda sakkaroz, BBD ve farklı şiddetlerde UV uygulamaları sonucunda Deve gülü bitkisinin doku kültürü örnekleri antioksidan kapasite ve fenolik asit miktarları açısından tekrar değerlendirilmiştir.

##### **4.3.4.1. Doku kültüründe farklı sakkaroz konsantrasyonlarının uygulanması sonucu antioksidan kapasite ve fenolik içerik bulguları**

Doku kültüründe MS besiyerinde 28 gün boyunca farklı sakkaroz konsantrasyonlarında inkübe edilen sürgün uçlarına antioksidan kapasitenin belirlenmesi için FCR, FRAP ve Orac testleri uygulanmıştır. Fenolik asit miktarları ise

HPLC ve LC-MS/MS le tespit edildi. Bu testlerin sonuçları Çizelge 4.15 ve Çizelge 4.16'da verilmiştir.

15 g/l ve 45 g/l sakkaroz uygulamasının kontrol (30 g/l) grubuna göre FCR, FRAP ve ORAC değerlerinde anlamlı olarak artışa neden olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.15). 15 S ve 45 S uygulamalarının hücrede reaktif oksijen türlerinden elektron alacak veya onlara elektron verecek olan antioksidan molekülleri sentezleyen genleri aktive edemediği düşünülmektedir. 15 g/l ve 45 g/l sakkaroz uygulamalarının Deve gülü bitkisinin antioksidan kapasite arttırımında kullanılamayacak bir uygulama olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4. 15. Sakkaroz uygulamasının ardından FCR, FRAP, ORAC değerleri

Sakkaroz uygulaması	FCR GA.Eq. mg /g kuru ağırlık±SS	FRAP µmol Fe <sup>2+</sup> g/kuru ağırlık±SS	ORAC µmolTE/g kuru ağırlık±SS
MS K	7.46±0.740	168.542±5.776	135.983±4.381
15 S	6.174±0.556 <sup>a</sup>	145.733±2.987 <sup>a</sup>	131.354±4.915
45 S	6.654±0.457	144.320±5.963 <sup>a</sup>	119.892±3.635 <sup>b</sup>

MSK; kontrol (30mg/l sakkaroz), 15S; 15 mg/l sakkaroz içeren MS. 45S; 45 mg/l sakkaroz içeren MS.a: 15 S ve 45 S uygulamalarının MS K uygulamasına göre anlamlı (p<0.05) olarak artış veya azalışını, b: 45 S uygulamasının 15 S uygulamasına göre anlamlı (p<0.05) olarak artış veya azalışını göstermektedir. SS; standart sapma.

İlk kez yapılan bu çalışmayla Deve gülü bitkisinin fenolik asit miktarında 45 g/l sakkaroz uygulamasının, kontrol (30 g/l) ve 15 g/l sakkaroz uygulanan gruba göre fenolik asit miktarında artışa neden olduğu görülmüştür (Çizelge 4.16). Yüksek sakkaroz konsantrasyonu hücre sitoplazmasında ozmotik basınca neden olarak hücrenin plazmoliziyle sonuçlanmıştır (Zouine ve Hadrami, 2004). Bu durum hücreyi strese sokarak fenolik üretimini sağlayan genlerin aktivasyonuna neden olmuştur. (Çizelge 4.16). Sakkaroz bitkilerde, karbon ve enerji kaynağı olmasının yanısıra osmotik strese de yol açabilmektedir (Liu ve Cheng, 2008). Sonuçlarımız Zouine ve Hadrami (2004) tarafından *Phoenix dactylifera* L. bitkisinde ve Yamaner (2011) tarafından *H. adenotrichum*'da ve Raoul ve ark. (2010), *H. sabdariffa* (Malvacea)'da bildirdikleri sonuçlarla uyumludur. Yamaner (2011), *H. adenotrichum in vitro* kültürlerinde 15, 30

ve 45 g/l sakkaroz uygulayarak fenolikleri arttırmaya çalışmış, 45 g/l sakkaroz uygulamasının izokuersetin miktarını kontrole göre yaklaşık 1.6 kat arttırdığını, Raoul ve ark. (2010), ise *H. sabdariffa* (Malvacea) doku kültürüne uygulanan şekerin çeşit ve konsantrasyonunun fenolik içeriği etkilediğini bildirmiştir.

Çizelge 4. 16. Sakkaroz uygulamasının ardından gallik, kafeik ve klorojenik asit miktarları

Sakkaroz uygulaması	Gallik asit (mg/kuru ağırlık)±SS	Kafeik asit (mg/kuru ağırlık)±SS	Klorojenik asit (mg/kuru ağırlık)±SS
MS K	0.318±0.003	0.904±0.010	0.456±0.005
15 S	0.337±0.07 <sup>a</sup>	0.944±0.037	0.474±0.005 <sup>a</sup>
45 S	0.516±0.008 <sup>ab</sup>	1.036±0.015 <sup>ab</sup>	0.514±0.011 <sup>ab</sup>

MSK; kontrol (30mg/l sakkaroz), 15S; 15 mg/l sakkaroz içeren MS. 45S; 45 mg/l sakkaroz içeren MS.a: 15 S ve 45 S uygulamalarının MS K uygulamasına göre anlamlı ( $p<0.05$ ) olarak artış veya azalışını, b: 45 S uygulamasının 15 S uygulamasına göre anlamlı ( $p<0.05$ ) olarak artış veya azalışını göstermektedir. SS; standart sapma

#### 4.3.4.2. Doku kültüründe UV uygulanması sonucu antioksidan kapasite ve fenolik içerik bulguları

UV, kuraklık, fazla su, patojen enfeksiyonu ve karbonhidrat (şeker) destekleri gibi bazı stres faktörleri bitkilerde fenoliklerin çeşit ve konsantrasyonunu etkilemektedir (Lux-Endrich ve ark., 2000; Kefeli ve ark., 2003; Zapprometov ve ark., 1989). UV ışınları üçe ayrılır. UVA (320 ila 400 nm), UVB (280 ila 320 nm) ve UVC (200 ila 280 nm) Bunlar arasında, en güçlü etkiye UVC sahiptir. Dalga boyu ne kadar kısalsın şiddeti o kadar güçlü olmaktadır.

15 dk. UVC (254 nm) uygulaması, FRAP ve ORAC sonuçlarını kontrole göre anlamlı olarak düşürürken FCR sonuçlarını ise anlamlı olarak etkilememiştir (Çizelge 4.17). Ancak UV nin 30 dakika uygulanması ise FCR, FRAP ve ORAC sonuçlarını anlamlı olarak düşürmüştür.

Çizelge 4. 17. UV C (254 nm) uygulamasının ardından FCR, FRAP, ORAC değerleri

Uygulama (UVC=280nm)	FCR GA.Eq. mg /g kuru ağ. ± SS	FRAP µmol Fe <sup>2+</sup> g/kuru ağırlık±SS	ORAC µmolTE/g kuru ağırlık±SS
UV K	6.282±0.551	136.246±8.131	155.035±6.607
UV 15	5.918±0.379	117.878±3.335 <sup>a</sup>	137.81±5.384 <sup>a</sup>
UV 30	4.803±0.066 <sup>ab</sup>	89.014±2.447 <sup>ab</sup>	128.544±5.934 <sup>a</sup>

UV; ultraviyole, UV K; ultraviyole kontrol, SS; standart sapma, a: UV 15 ve UV 30 uygulamalarının UV K uygulamasına göre anlamlı ( $p<0.05$ ) olarak artış veya azalışını, b: UV 30 uygulamasının UV 15 uygulamasına göre anlamlı ( $p<0.05$ ) olarak artış veya azalışını göstermektedir. SS; standart sapma.

15 ve 30 dk. UV uygulaması fenolik asit miktarlarını kontrole göre anlamlı şekilde düşürmüştür. Ancak 15 dakika UV uygulaması ise klorojenik asit miktarı kontrole göre arttırmıştır (Çizelge 4.18). UV uygulamanın klorojenik asit dışındaki fenoliklerin sentez yolunu baskıladığı ancak strese neden olarak klorojenik asit kodlayan geni aktive ettiği düşünülmektedir.

Çizelge 4. 18. UV C (254 nm) uygulamasının ardından fenolik asit miktarları

Uygulama (UVC=280nm)	Gallik asit (mg/kuru ağırlık)±SS	Kafeik asit (mg/kuru ağırlık)±SS	Klorojenik asit (mg/kuru ağırlık)±SS
UV K	0.242±0.008	0.708±0.007	0.298±0.007
UV 15 min	0.183±0.005 <sup>a</sup>	0.663±0.009 <sup>a</sup>	0.417±0.014 <sup>a</sup>
UV 30 min	0.139±0.006 <sup>ab</sup>	0.456±0.010 <sup>ab</sup>	0.216±0.005 <sup>ab</sup>

UV; ultraviyole, UV K; ultraviyole kontrol, SS; standart sapma, a: UV 15 ve UV 30 uygulamalarının UV K uygulamasına göre anlamlı ( $p<0.05$ ) olarak artış veya azalışını, b: UV 30 uygulamasının UV 15 uygulamasına göre anlamlı ( $p<0.05$ ) olarak artış veya azalışını göstermektedir. SS; standart sapma.

Deve gülü ile ilk kez yapılan bu çalışmada, uygulanan UV C (254 nm) nin şiddeti, süresi, uygulama mesafesi, uygulanan örneklerin yaşı ve uygulama süresinden sonra analizlere kadar geçen sürenin, fenolik asit miktarı ve antioksidan aktivite üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Uygulama süresi, UV şiddeti, mesafesi ve yaş gruplarıyla farklı kombinasyonlar yapılarak Deve gülü bitkisinde fenolik arttırımı için optimum şartların sağlanması ileriki çalışmalar olarak düşünülebilir. Elde edilen sonuçlar, uygulanan faktörlerden UV nin bitkinin sekonder metabolit üretimini (gallik ve kafeik asit) azaltarak antioksidan aktivitelerini de olumsuz etkilediğini göstermiştir. Benzer sonuçlar Keskin ve Kunter (2008)'in *Vitis vinifera*'nın yapraklarından elde edilen kalluslara UVC (254 nm) uygulamasından 72 saat sonra *trans* resveratrol

ölçümünde elde edilmiştir. Bir sekonder metabolit olan *trans* resveratrol miktarındaki düşüş kallus yaşıyla ilişkilendirilmiştir. Charlwood ve ark., tarafından sekonder metabolitlerin miktarındaki düşüş, belli bir inkübasyon aşamasından sonra dokuların enzimler tarafından parçalanmasına bağlanmaktadır (Keskin ve Kunter, 2008). Tůmová ve Tůma (2010), *Genista tinctoria* kallus kültürlerinde sekonder metabolit miktarınının UV radyasyonunun dalga boyuna ve uygulama süresine bağlı olarak arttığını veya azaldığını bildirmişlerdir. Namlı ve ark. (2009), *Hypericum triquetrifolium* da hiperisinin 15 dakikalık UV uygulamasında artmasına rağmen, 60 dakikalık uygulamadan sonra azaldığını bildirilmiştir.

15 dk. UV uygulaması sonucu klorojenik asit miktarında kontrole göre artış sağlanması Namlı ve ark. (2009), Fini ve ark. (2011) ve Pakseresht ve ark. (2016)'nın elde ettiği sonuçlarla ve Jiao ve ark.(2018), farklı şiddette UV uyguladıkları *Isatis tinctoria* L. tüylü kök kültürlerinde, UV-B'nin flavonoid birikimini kontrole göre 16.51 kat arttırdığı sonuçlarla uyusmaktadır.

Deve gülü bitkisiyle ilk defa yapılan bu çalışmayla, antioksidan etkisi önceki çalışmalarda bildirilen (Kahkonen ve ark., 1999; Sato ve ark., 2011; Gonthier ve ark., 2003) bir sekonder metabolit olan klorojenik asit miktarının, 15 dakika UVC uygulaması sonucunda kontrole göre anlamlı şekilde arttırımı başarılmıştır.

#### **4.3.4.3. Doku kültüründe BBD uygulaması sonucu antioksidan kapasite ve fenolik içerik bulguları**

Önceki çalışmalarda (Kwak ve ark. 1996; Ruiz ve ark., 2003), biyotik ve abiyotik stresin fenolik asit metabolik yolunda görevli PAL (fenilalanin amonyum liyaz), peroksidaz (POD) enziminin miktarında artışa neden olduğu bildirilmiştir. Bu enzimin artışı beraberinde fenolik asit üretiminin ve dolayısıyla da antioksidan kapasitenin artışına neden olmaktadır.

0.5 mg/l NAA+0.5 mg/l BAP uygulanan örneklerdeki FCR, FRAP ve ORAC değerlerinin hem kontrolden hem de 1 mg/l NAA ve 1 mg/l BA uygulanan örneklerden anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.19). Tek başına uygulanan BA ve NAA'nın ise antioksidan aktiviteyi kontrole göre düşürdüğü gözlenmiştir.



Deve gülü bitkisiyle ilk kez yapılan bu çalışmayla, farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda uygulanan BBD'lerden 0.5 mg/l NAA+0.5 mg/l BAP'ın, her üç fenolik asit miktarında anlamlı olarak artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Gallik, kafeik ve klorojenik asit miktarları kontrole göre yaklaşık 2 kat fazla üretilmiştir (Çizelge 4.20). 0.5 mg/l NAA+0.5 mg/l BAP'ın Deve gülü bitkisinde fenolik asit arttırımı için uygulanabilecek uygun dozda hormon olduğu sonucuna varılmıştır. 1 mg/l BA ve 1 mg/l NAA'in ise tek başına uygulanması her üç fenolik asit miktarını kontrol grubuna göre düşürdüğü, dolayısıyla fenolik sentezini baskıladığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4. 19. BBD uygulamasının ardından FCR, FRAP, ORAC değerleri

Uygulama	FCR GA.Eq. mg /g kuru ağ.	FRAP µmol Fe2+ /g kuru ağırlık	ORAC µmolTE/g kuru ağ.
MS K	7.46±0.740	168.542±5.776	135.983±4.381
0,5 NAA+0.5BA	8.211±0.370	181.46±10.667	183.168±3.177 <sup>a</sup>
1BA	6.05±0.344 <sup>ab</sup>	151.788±4.121 <sup>ab</sup>	139.112±2.817 <sup>b</sup>
1NAA	6.398±0.227 <sup>ab</sup>	147.751±4.856 <sup>ab</sup>	126.204±5.777 <sup>abc</sup>

a: Hormon uygulamalarının MS K uygulamasına göre anlamlı (p<0.05) olarak artış veya azalışını, b: 1BA ve 1NAA uygulamalarının 0.5NAA+0.5BA uygulamasına göre anlamlı (p<0.05) olarak artış veya azalışını göstermektedir, c: 1BA uygulamasının 1NAA uygulamasına göre anlamlı (p<0.05) olarak artış veya azalışını göstermektedir.

Çizelge 4. 20. BBD uygulamasının ardından gallik, kafeik ve klorojenik asit değerleri

uygulama	Gallik asit (mg/kuru ağırlık)±SS	Kafeik asit (mg/kuru ağırlık)±SS	Klorojenik asit (mg/kuru ağırlık)±SS
MS K	0.318±0.003	0.904±0.010	0.456±0.005
0.5 NB	0.628±0.007 <sup>a</sup>	1.725±0.016 <sup>a</sup>	0.711±0.01 <sup>a</sup>
1BA	0.212±0.006 <sup>ab</sup>	0.578±0.011 <sup>ab</sup>	0.338±0.012 <sup>ab</sup>
1NAA	0.277±0.006 <sup>abc</sup>	0.648±0.023 <sup>abc</sup>	0.414±0.014 <sup>abc</sup>

a: Hormon uygulamalarının MS K uygulamasına göre anlamlı (p<0.05) olarak artış veya azalışını, b: 1BA ve 1NAA uygulamalarının 0.5NAA+0.5BA uygulamasına göre anlamlı (p<0.05) olarak artış veya azalışını göstermektedir, c: 1BA uygulamasının 1NAA uygulamasına göre anlamlı (p<0.05) olarak artış veya azalışını göstermektedir.

Bitkiler sekonder metabolit arttırımı için genotipine bağlı olarak farklı miktar ve çeşitte BBD'ye ihtiyaç duyar (Gürel ve Türker, 2002). Yeşil-Çelikaş ve ark. (2007), *Rosmarinus officinalis* kalluslarında en yüksek fenolik asit ve antioksidan kapasiteyi 1 mg/L NAA içeren ortamda, Giri ve ark. (2012), *Habenaria edgeworthii* kalluslarında,

doğal ortamdakinden daha yüksek gallik asit ve antioksidan kapasiteyi BA içeren ortamda, North ve ark. (2012), *Strelitzia reginae*, doku kültüründe en yüksek fenolik içeriği 0.5 mg/l NAA ve 6 mg/l BAP içeren ortamda tespit etmişlerdir. Deve gülü ile yapılan bu çalışmada ise 0.5 NAA+0.5 BAP uygulanan örneklerin fenolik asit miktarları ve antioksidan kapasiteleri hem kontrole göre hem de doğadan getirilip etanol ekstraksiyonu yapılanlardan daha yüksek tespit edilmiştir.

#### 4.3.5. Doğal ortamından getirilen ve doku kültüründe stres uygulanan örneklerin antioksidan kapasite ve fenolik asit miktarlarının karşılaştırılması

Doğal ortamından farklı vejetasyon dönemlerinde getirilen ve etanol ekstraksiyonu yapılan örneklerin antioksidan kapasite ve fenolik içerik miktarları karşılaştırıldığında MS kontrol ortamında yetiştirilen örneklerin FCR ve FRAP değerleri, farklı vejetasyon dönemlerinde doğal ortamından getirilen örneklerden daha yüksek tespit edilmiştir. Ayrıca 0,5 NAA+0.5BA uygulamasının hem doğal ortamdan getirilen hem de kontrolden yaklaşık iki kat daha yüksek miktarda FCR ve FRAP değerlerine neden olduğu tespit edilmiştir. İlk kez yapılan bu çalışmayla Deve gülü bitkisinin antioksidan kapasitesi BBD uygulanarak arttırılmıştır.

Çizelge 4. 21. Doğal ortamından getirilen ve doku kültüründe stres uygulanan örneklerin antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması.

Uygulama (Etanol ekstraheleri)	FCR GA.Eq. mg /g kuru ağ. ±SS	FRAP µmol Fe <sup>2+</sup> /g kuru ağırlık±SS	ORAC µmolTE/g kuru ağ. ±SS
Haziran	5.891±0.115	73.304±2.519	187.332±0.566
Temmuz	5.13±0.109	76.25±1.497	152.282±3.100
Ağustos	4.667±0.109	59.708±2.573	119.091±0.762
MS kontrol	7.46±0.740	168.542±5.776	135.983±4.381
<b>0,5 NAA+0.5BA</b>	<b>8.211±0.370</b>	<b>181.46±10.667</b>	<b>183.168±3.177</b>

0.5 NB; 0.5 NAA+0.5 BA uygulaması, SS; standart sapma.

0.5 NAA+0.5 BA uygulamasının fenolik asit miktarlarını doğal ortamından getirilene göre yaklaşık iki kat arttırdığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.23).

Çizelge 4. 22. Doğal ortamından getirilen ve doku kültüründe stres uygulanan örneklerin fenolik asit miktarlarının karşılaştırılması

<b>uygulama</b>	<b>Gallik asit (mg/kuru ağırlık)±SS</b>	<b>Kafeik asit (mg/kuru ağırlık)±SS</b>	<b>Klorojenik asit (mg/kuru ağırlık)±SS</b>
<b>Haziran</b>	0.361 ± 0.032	0.844 ± 0.041	0.488 ± 0.006
<b>Temmuz</b>	0.315 ± 0.007	0.752 ± 0.042	0.436 ± 0.017
<b>Ağustos</b>	0.264 ± 0.029	0.631 ± 0.024	0.376 ± 0.010
<b>0,5 NB</b>	0.628±0.007	1.725±0.016	0.711±0.01

0.5 NB; 0.5 NAA+0.5 BA uygulaması, SS; standart sapma



## 5. SONUÇ

Bitkisel materyaller gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ilaç endüstrisi için reçetesiz satılan ilaç ürünleri ve hammadde olarak kullanılarak küresel ilaç pazarının önemli bir bölümünü temsil etmektedir. Genellikle ciddi yan etkilere sahip olmayan bitkilerin terapötik aktivitesi, içeriğindeki yağlar, proteinler, sekonder metabolitler, mineral ve vitaminler gibi biyolojik olarak aktif organik bileşikler ile ilişkilidir. Tarımsal yöntemlerle bitki üretimi, pek çok bitki için coğrafi konuma, iklim ve büyüme şartlarına bağlı olduğu için sekonder metabolit eldesini sınırlayabilmektedir. Bitki doku kültürleri çevresel faktörlerden bağımsız geliştikleri için üretim koşulları denetim altına alınabilir. Denetimle optimum büyüme koşullarının sağlanması hücre bölünmesini hızlandırır. Doku kültürü ortamında morfolojik çeşitlilik görsel seçimle ayırt edilebilir. Ayrıca, bazı bitki enzimleri kültür ortamında etkin biçimde salgılanabilir. Biyoteknolojik araştırmalar *in vitro* hücre kültürleriyle sekonder ürün arttırımını sağlamanın yanı sıra tıp, kozmetik, boya, kimya ve gıda sanayinde kullanılması çalışmalarını da hızlandırmıştır. Sekonder ürünlerin doku kültürü ortamında üretilmesiyle arz talep dengesine dayanan, çevresel etkilerden bağımsız üretim sağlanabilir. Sabit verim ve kararlılıkta istenilen miktarda üretim yapılabilir. Doğa tahribatı en aza indirilip, daha az arazi kullanımının gerçekleşmesi sağlanabilir. Yeni sekonder ürünlerin eldesi mümkün olabilir. Bu yolla elde edilen sekonder ürünler, bitkideki gibi başka bileşikler ile kontamine olmaz ve saflık miktarı artabilir. Nesli tükenme tehlikesi altındaki türler korunabilir. Metabolik yollar aydınlatılabilir ve bu sayede kitlesel üretime geçişte gereken bilgi elde edilmiş olur.

Malvacea familyasına ait bir çok tür içerdiği musilaj nedeniyle tıbbi kullanım alanına sahiptir (Uzunhisarcıklı ve Vural, 2012). Deve gülü bitkisi, halk arasında tonsilit, mide ülseri, duodenal ülserler, pnömoni, üriner sistem enfeksiyonları ve alopesi gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır (Mati ve de Boer, 2011). Bu bitkinin doku kültüründe üretilmesi, fitokimyasal içeriğinin belirlenerek fenolik asitlerinin ve antioksidan kapasitesinin doku kültüründe arttırılması çalışmaları daha önce yapılmamıştır.

Deve gülü bitkisi doğal ortamından getirildikten sonra laboratuvar

çalışmalarında bitki organlarının eksplant olarak kullanılması için saksı içine alınmıştır. Ancak gelişimi yavaşlamış, yeni oluşan yaprakların yüzeyi küçülmüş ve iki ay sonunda kurumuştur.

Doku kültürü çalışmaları için tohumlar %5, %7.5 ve %10 'luk NaOCl ile steril edildikten sonra 24 saat inkübe edilerek ve bistüri ile çizilerek veya çizilmeden tekrar sterilizasyon çalışmalarına tabi tutulmuştur. Bu çalışmalar sonunda kontaminasyonu engelleyecek sterilizasyon protokolünün oluşturulmasının yanı sıra tohumların 48 saat içinde çimlenmesini sağlayacak dormansi kırma protokolü de oluşturulmuştur. %10 'luk NaOCl ile steril edildikten sonra 42°C sıcaklıkta 24 saat inkübe edilip bistüri ile çentik atılan tohumlar % 86.67±5.774 oranında çimlendirilmiştir.

14 ve 28 günlük eksplantlar kullanılarak yapılan kallus oluşturma çalışmalarında, kotiledonların diğer eksplantlara göre daha yüksek kallus oluşturma yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. 14 günlük kotiledonlar en fazla 1 mg/l 2,4-D de, 28 günlük kotiledonlar ise en fazla 2 mg/l 2,4D içeren MS ortamlarında kallus oluşturmuştur. Genel olarak 14 günlük kotiledonlar 28 günlük kotiledonlardan daha yüksek oranda kallus oluşturmuştur.

Rejenere bitkicikler, 28 günlük çimlendirilen bitkilerden alınan sürgün ucu ve nodlardan 6 hafta boyunca MS inkübasyonu ile elde edilmiştir. Nod ve sürgün ucundan %100 oranında doğrudan rejenerasyon gözlenmiştir. Rejenere olan bitkicikler 6 hafta sonra köklendirme besiyerine alınmış, köklendirildikten sonra rejenerasyon işleminin devamında toprağa aktarılmıştır. Mikro çoğaltımı yapılan nodların % 44.4'ü BBD'siz MS ortamında iki veya daha fazla sürgünle filizlenmiştir. Eksplant başına düşen sürgün sayısı 1.61 olarak tespit edilmiştir. Deve gülü bitkisiyle noddan mikroçoğaltım çalışması başarılıdır. Noddan mikroçoğaltımı yapılan bitkiciklerin hepsi viallere aktarılmasına rağmen bunların % 5.6'sı saksıya aktarılabilmiştir. Sürgün ucu eksplant kaynağı olan örneklerden % 12.5'i BBD'siz MS ortamında birden fazla sürgün vererek filizlenmiştir. Kullanılan sürgün ucu eksplant başına düşen sürgün sayısı 1.125 olarak tespit edilmiştir. Sürgün ucundan ise % 12.5 oranında mikroçoğaltım başarılıdır. Sürgün ucu örneklerinin % 20 si toprağa aktarılmıştır. Bu çalışmayla tıbbi önemi olan Deve gülü bitkisinin doku kültüründe rejenerasyon çalışmaları ilk kez yapılarak, sürgün ucu ve nodlardan rejenerasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Antioksidan kapasite ve fitokimyasal içerik çalışmaları için Haziran (çiçeklenme dönemi), Temmuz (meyve dönemi), Ağustos (tohum dönemi) olmak üzere 3 farklı gelişim döneminde Konalga köyü kırsalından getirilerek kurutulan bitki örneklerinin, işlemlere tabi tutulmadan önce ekstraksiyon verimi hesaplanmıştır. Genel olarak etanol çözgeninin ekstraksiyon verimi saf su çözgenine göre daha yüksek olarak belirlenirken en yüksek verim Ağustos ayına ait etanol ekstrelerinde (% 28.89) elde edilmiştir.

Yapılan çalışmada bitkinin antioksidan kapasitesinin ölçülmesi amacıyla 3 farklı antioksidan testi uygulanmıştır. Bu deneyler Folin-Ciocalteu indirgeme gücü (FCR) deneyi, Ferrik indirgeme antioksidan gücü veya total indirgeme kapasitesi (FRAP) ve Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC)'nden oluşmaktadır. Deve gülü bitkisiyle ilk kez yapılan bu çalışmayla, Temmuz ayında bitkinin suyla yapılan infüzyonunda antioksidan kapasitenin (FC, FRAP, ORAC), diğer dönemlere ve etanol çözgenine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. En yüksek FCR, FRAP ve ORAC değerleri Temmuz ayına ait infüzyon örneklerinde sırasıyla  $16.538 \pm 0.019$  GA.Eq. mg/g drog,  $225.691 \mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g}$  drog,  $311.86 \pm 1.006 \mu\text{molTE}/\text{gdrog}$  olarak, en düşük miktar ise etanol ekstresi yapılan Ağustos ayına ait örneklerde sırasıyla  $4.667 \pm 0.109$  GA.Eq. mg/g drog,  $59.708 \mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g}$  drog,  $119.091 \pm 0.7629 \mu\text{molTE}/\text{gdrog}$  olarak tespit edilmiştir. Deve gülü bitkisinde ayrıca gallik asit, klorojenik asit ve kafeik asit varlığı tespit edilmiştir.

Tıbbi bitkilerin mineral içeriklerinin belirlenmesi, besin içerikleri ve farmakolojik fonksiyonlarını dikkate alarak, tedavi amaçlı kullanılmak üzere önerilen bitki dozlarının tanımlanması açısından oldukça önemlidir. Bitkilerin mineral ve protein içerikleri yetiştikleri ortamın özelliklerinden etkilendikleri gibi farklı vejetasyon dönemlerinde de değişebilmektedir. Deve gülü bitkisinin farklı vejetasyon dönemlerindeki makro ve mikro element, ağır metal ve protein içeriğinin ilk kez tespit edildiği bu çalışmada, metabolik faaliyetlerin yoğunlaşmaya başladığı çiçeklenme dönemi olan Haziran ayında makro ve mikro elementler diğer aylara göre daha yüksek belirlenmiştir. Ağır metaller ise vejetasyon dönemlerine göre anlamlı bir farklılık göstermeyerek yenilebilir bitkilerde olması gereken sınırlarda tespit edilmiştir..

Deve gülü bitkisinin doku kültürü örneklerine sakkaroz, UVC ve BBD uygulayarak fenolik asit miktarları ve antioksidan kapasite (FCR, FRAP ve ORAC

deneyleriyle) değerlendirilmiştir. İlk kez yapılan bu çalışmayla Deve gülü bitkisinin fenolik asit miktarında 45 g/l sakkaroz uygulamasının, kontrol (30 g/L) ve 15 g/l sakkaroz uygulanan gruba göre fenolik asit miktarında artışa neden olduğu görülmüştür. 15 g/l ve 45 g/l sakkaroz uygulamasının kontrol (30 g/l) grubuna göre anlamlı olarak FCR, FRAP ve ORAC değerlerinde ise artışa neden olmadığı belirlenmiştir.

15 dk. UVC (254 nm) uygulaması, FRAP ve ORAC sonuçlarını kontrole göre anlamlı olarak düşürürken FCR sonuçlarını ise anlamlı olarak etkilememiştir. Ancak UV nin 30 dakika uygulanması ise FCR, FRAP ve ORAC sonuçlarını anlamlı olarak düşürmüştür. 15 ve 30 dk. UV uygulaması fenolik asit miktarlarını kontrole göre anlamlı şekilde düşürmüştür. Ancak 15 dakika UV uygulaması ise klorojenik asit miktarını kontrole göre arttırmıştır.

0.5 mg/l NAA+0.5 mg/l BAP uygulanan örneklerdeki FCR, FRAP ve ORAC değerlerinin hem kontrolden hem de 1 mg/l NAA ve 1 mg/l BA uygulanan örneklerden anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tek başına uygulanan BA ve NAA'nın ise antioksidan aktiviteyi kontrole göre düşürdüğü gözlenmiştir. 0.5 mg/l NAA+0.5 mg/l BAP'ın, her üç fenolik asit miktarında anlamlı olarak artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Gallik, kafeik ve klorojenik asit miktarları kontrole göre yaklaşık 2 kat fazla üretilmiştir.

İlk kez yapılan bu çalışmayla Doğal ortamından farklı vejetasyon dönemlerinde getirilen ve etanol ekstraksiyonu yapılan örneklerin, antioksidan kapasite ve fenolik içerik miktarları doku kültüründe yetiştirilenlerle karşılaştırıldığında karşılaştırıldığında 0,5 NAA+0.5BA uygulamasının hem FCR ve FRAP değerlerini hem de fenolik asit miktarlarını kontrolden yaklaşık iki kat daha yüksek miktara neden olduğu tespit edilmiştir. İlk kez yapılan bu çalışmayla Deve gülü bitkisinin antioksidan kapasitesi BBD uygulanarak arttırılmıştır.

Halk arasında tıbbi bitki olarak kullanılan Deve gülü bitkisiyle ilk kez yapılan bu çalışmayla, bitkinin doğal ortamından farklı vejetasyon dönemlerinde (Haziran; çiçeklenme, Temmuz; meyve, Ağustos; tohum) getirilen örneklerinin, mineral ağır metal, azot ve protein oranları, toplam fenolikleri ve antioksidan kapasiteleri (FRAP, ORAC ve FCR) tespit edilmiştir. Ayrıca *in vitro* ortamda tohum sterilizasyon protokolü oluşturulmuş, dormansi kırılarak çimlenmesi gerçekleştirilmiş, filizlenen bitkinin



vejetatif kısımları eksplant olarak kullanılarak kallus oluşturma, rejenerasyon ve iklime alıştırılması gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan kalluslara farklı oranlarda UV, şeker ve BBD uygulandıktan sonra fenolik asitleri ve antioksidan kapasitesi değerlendirilmişdir. 0,5 NAA+0.5BA uygulamasının bitkinin doğal ortamda yetişen rneklerinenen iki kat fazla fenolik asit üretimine ve antioksidan kapasiteye neden olduğu belirlenmiştir. . Bu çalışmanın, bitkinin halk hekimliğinde daha bilinçli kullanılmasına katkı sunacağı, Deve gülü bitkisi ile gelecekte yapılması muhtemel fitokimyasal çalışmalara öncülük etmesi ve topraksız tarımın ihtiyaç olduğu günümüzde bitkinin hızlı üretimine katkı sunacağı düşünülmektedir.





## KAYNAKLAR

- Addai, Z. R., Abdullah, A., Mutalib, S. A., 2013. Effect of extraction solvents on the phenolic content and antioxidant properties of two papaya cultivars. *J Med Plants Res*, **7**: 3354- 3359.
- Ağırakça, A., 2015. Osmanlı tıbbının kaynakları ve Osmanlı tıbbına giriş. [http://ahmetagirakca.com.tr/uploads/default/articles/5Osmanli\\_Tibbinin\\_Kaynaklari\\_ve\\_Osmanli\\_Tibbina\\_Giris.pdf](http://ahmetagirakca.com.tr/uploads/default/articles/5Osmanli_Tibbinin_Kaynaklari_ve_Osmanli_Tibbina_Giris.pdf) . ahmetagirakca.com. Erişim tarihi: 12/2/2016.
- Akin, M., Ekin, Z., Ozmen, S., Kaya, M., 2019. Seed dormancy in *Rheum ribes* L. collected from natural populations in Turkey. *International Journal of Scientific and Technological Research*, **5** (2): 183-192.
- Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A., 2010. Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, **26** (4): 401-409.
- Al-Snafi, A. E., 2013. The pharmaceutical importance of *Althaea officinalis* and *Althaea rosea*: a review. *Int J Pharm Tech Res*, **5** (3): 1387-1385.
- Andrés-Lacueva, C., Medina-Remon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G., Zamora-Ros, R., Rotches-Ribalta, M., Lamuela-Raventós, R. M., 2009. Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables, Chapter 2. *Fruit and Vegetable Phytochemicals*. Wiley-Blackwell, 367, Oxford. 53-83.
- Angelova, V., Ivanova, R., Delibaltova, V., Ivanov, K., 2004. Bioaccumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Ind. Crops Prod.* **19**: 197-205.
- Anlas, C., Ustuner, O., Alkan, F. U., Bakirel, T., Aydogan, M. N., Erel, S. B., 2017. A comparative study in the antioxidant activities and phenolic contents of different extracts of a *Chillea Nobilis Subsp Sipylea* and *Alcea Apterocarpa* (Fenzl) Boiss, endemic plants in Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, **26** (2A): 1423-1430.
- Annan, K., Dickson, A., Amponsah, I. K., Nooni, I. K., 2013. The heavy metal contents of some selected medicinal plants sampled from different geographical locations. *Pharmacognosy Research*, **5**(2): 103.
- Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Prior, R. L., Cisneros-Zevallos, L. 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**(23): 6657-6662.
- Balyeri K. P, Mbah B. N., 2006. Surface sterilization and duration of seed storage influenced emergence and seedling quality of African breadfruit (*Treculia Africana Decne*). *African Journal Biotechnology*, **5** (15): 1393-6.
- Başgel S, Erdemoğlu S. B., 2006. Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey. *Science of the Total Environment*, **359** (1-3): 82-89.
- Bouayed, J., Piri, K., Rammal, H., Dicko, A., Desor, F., Younos, C., Soulimani, R., 2007. Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants. *Food Chemistry*, **104** (1): 364-368.

- Brain, K. R., 1976. Accumulation of L-DOPA in cultures from *Mucuna pruriens*. *Plant Sci. Lett.*, **7**: 157-161.
- Cao, G., Verdon, C. P., Wu, A. H., Wang, H., Prior, R. L., 1995. Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the cobas fara II. *Clin. Chem.*, **41**: 1738-1744
- Castagnetto J. M., Hennessy S. W., Roberts V. A., Getzoff, E. D., Tainer, J. A., Pique, M. E., 2002. MDB: the Metalloprotein database and browserrat the Scripps Research Institute. *Nucleic Acids Research*, **30** (1): 379-382.
- Chaturvedi, P., Kwape, T. E., Fulukani, I., 2015. Evaluation of free radical scavenging activities of *Sida Rhombifolia* extracts. *Indian Journal Plant Science*, **4**: 5-10.
- Chenar H. M., Kahrizi, D., Zebarjadi, A., 2015. Effect of plant growth regulators and explant type upon cell dedifferentiation and callus induction in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Applied Biotechnology Reports*, **2**: 241-4.
- Cheung, L. M., Cheung, P. C., Ooi, V. E., 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food chemistry*, **81** (2): 249-255.
- Clark, S. M., Eaton-Rye, J. J., 2000. Amino acid deletions in loop C of the chlorophyll a-binding protein CP47 alter the chloride requirement and/or prevent the assembly of photosystem II. *Plant Mol. Biol.* **44**: 591-601.
- Collin, H. A., 2001. Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regul.*, **34**: 119-134.
- Cotelle, N., 2001. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.*, **1**: 569-590
- Dai, J., Mumper, R. J., 2010. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, **15** (10): 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Dalar, A., Konczak, I., 2013. Phenolic contents, antioxidant capacities and inhibitory activities against key metabolic syndrome relevant enzymes of herbal teas from Eastern Anatolia, *Industrial Crops and Products*, **44**: 383-390.
- Dalar, A., Türker, M., Konczak, I., 2012. Antioxidant capacity and phenolic constituents of *Malva Neglecta* Wallr. and *Plantago lanceolata* L. from Eastern Anatolia Region of Turkey. *Journal of Herbal Medicine*, **2** (2): 42-51.
- Dalar, A., Uzun, Y., Turker, M., Mukemre, M., Konczak, I., 2016. Health attributes of ethnic vegetables consumed in the Eastern Anatolia Region of Turkey: antioxidant and enzyme-inhibitory properties. *Journal of Ethnic Foods*, **3** (2): 142-149.
- Darvishi E., Kazemi E., Kahrizi D., Chaghakaboudi S. R., Khani Y., 2014. Optimization of callus induction in Pennyroyal (*Mentha pulegium*). *Journal of Applied Biotechnology Reports*, **1**: 97-100.
- Dhar, U., Joshi, M., 2005. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew.(Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. *Plant Cell Reports*, **24** (4): 195-200.
- Dias, A., C. P., Tomás-Barberán, F. A., 1998. Unusual flavonoids produced by callus of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*, **48**: 1165–1168.
- Divrikli, U., Horzum, N., Soylak, M., Elci, L., 2006. Trace heavy metal contents of some spices and herbal plants from western Anatolia, Turkey. *International Journal of Food Science and Technology*, **41** (6): 712-716.

- Dogan, S., Diken, M. E., Dogan, M., 2010. Antioxidant, phenolic and protein contents of some medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, **4** (23): 2566-2572.
- Dreosti, I. E., 2000. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*, **16** (7): 692-694.
- Dudek M., Matlawska I., Szkudlarek M., 2006. Phenolic acids in the flowers of *A. rosea* Var. *nigra*. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, **63** (3): 207- 211
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., Mérillon, J. M. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57** (5): 1768-1774.
- Dwivedi SK, Dey S., 2002. Medicinal herbs: A potential source of toxic metal exposure for man and animals in India. *Arch Environ Health*, **57**: 229–231.
- Elçi, B., Erik, S., (2006). Gdl (Ankara) ve evresinin etnobotanik zellikleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **26**(2): 57-64.
- Elkoca, E., Haliloğlu, K., Eşitken, A., Ercişli, S., 2007. Hydro- and osmopriming improve chickpea. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, **57** (3): 193-200.
- Epstein, E., 1999. Silicon. *Annual Review of Plant Biology*, **50**(1): 641-664.
- Erkoyuncu, M., ve Yorgancılar, M., 2015. Bitki Doku Kültürü Yntemleri İle Sekonder Metabolitlerin retimi. *Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi*, **2** (1): 66–76.
- Fabricant, D. S., Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, **109** (1): 69-75.
- Fadel, D., Kintzios, S., Economou, A. S., Moschopoulou, G., Constantinidou, H. I. A. 2010. Effect of different strength of medium on organogenesis, phenolic accumulation and antioxidant activity of spearmint (*Mentha spicata* L.). *The Open Horticulture Journal*, **3** (1): 31-35.
- Fagbohun E., Asare R. R., Egbebi A. O., 2012. Chemical composition and antimicrobial activities of *Urena lobata* L. (Malvaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, **6** (12): 2256-2260.
- Falade O. S., Otemuyiwa I. O., Oladipo A., Oyedapo O. O., Akinpelu B. A., Adewusi S. R. A., 2005. The chemical composition and membrane stability activity of some herbs used in local therapy for anemia. *Journal of Ethnopharmacology*, **102** (1): 15-22.
- Faydaloğlu E., Srcoğlu M. S., 2011. Gemişten gnmze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik nemi, *Kastamonu ni., Orman Fakültesi Dergisi*, **11** (1): 52-67
- Fernandez-Pachon M., Villano S. D., Tronosco A. M., Garcya –Parilla M. C., 2006. Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Anal Chim. Acta*, **563**: 101-108.
- Fett-Neto, A. G., Zhang, W. Y., Dicosmo, F., 1994. Kinetics of taxol production, growth, and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata*. *Biotechnology and Bioengineering*, **44** (2): 205-210.
- Fini, A., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Tattini, M., 2011. Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signaling & Behavior*, **6** (5): 709-711.

- Fowler, M., 1982. Substrate utilisation by plant cell cultures. *J. Chem. Tech. Biotech.*, **32**: 338-346.
- Gang, Y. Y., Du, G. S., Shi, D. J., Wang, M. Z., Li, X. D., Hua, Z. L., 2003. Establishment of in vitro regeneration system of the *Atrichum mosses*. *Acta Botanica Sinica*, **45** (12): 1475-1480.
- Ghasemnezhad, M., Sherafati, M., Payvast, G. A., 2011. Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*capsicum annum*) fruits at two different harvest times. *Journal of Functional Foods*, **3** (1): 44-49.
- Gil, M. I, Tomas-Barberan F. A., Hess-Pierce B., Kader A. A., 2003 Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids and vitamin C contents of nectarine, peach and plum cultivars from California. *J Agric Food Chem*, **50**: 4976-4982.
- Giri, L., Dhyani, P., Rawat, S., Bhatt, I. D., Nandi, S. K., Rawal, R. S., Pande, V., 2012. *In vitro* production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: a rare himalayan medicinal orchid. *Industrial Crops and Products*, **39** (1): 1-6.
- Gisbert, C., Clemente, R., Navarro-Avino, J., Baixauli, C., Giner, A., Serrano, R., Walker, D. J., Bernal, M. P., 2006. Tolerance and accumulation of heavy metals by *brassicaceae* species grown in contaminated soils from Mediterranean regions of Spain. *Environ. Exp. Bot.* **56**: 19-27.
- Golkar, P., Taghizadeh, M., 2018. *In vitro* evaluation of phenolic and osmolite compounds, ionic content, and antioxidant activity in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under salinity stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, **134** (3): 357-368.
- Gonthier, M. P., Verny, M. A., Besson, C., Rémésy, C., Scalbert, A., 2003. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *The Journal of Nutrition*, **133** (6): 1853-1859.
- Gudej J., 1989. Determination of flavonoids in leaves, flowers and roots of *Althaea officinalis* L. *Pharm Pol*, **46**: 153-155.
- Güven A, Knorr D., 2011. Isoflavonoid production by soy plant callus suspension culture. *J Food Eng*, **103**: 237-243.
- Güner, A, Özhatay, N, Ekim, T., Başer, K. H. C., 2000. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Second Supplement. Vol. 11.. Edinburgh: University Press. 656.
- Güven, A., Gürsul, I., 2014. Bitki doku kültürlerinde sekonder metabolit sentezi. *Gıda/The Journal of Food*, **39** (5): 299-306.
- Halliwell, B., 2001. Role Of Free Radicals In The Neurodegenerative Diseases. *Drugs & Aging*, **18** (9): 685-716
- Hänsch, R., Mendel, R. R., 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current opinion in plant biology*, **12** (3): 259-266.
- Harborne, J. B., Williams, C. A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55** (6): 481-504.
- Harling, H., Czaja, I., Schell, J., Walden, R., 1997. A plant cation-chloride co-transporter promoting auxin-independent tobacco protoplast division. *EMBO J.*, **16**: 5855-5866.
- Hemphill, J. K., Maier, C. G. A., Chapman, K. D., 1998. Rapid in-vitro plant regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep.*, **17**: 273-278

- Hepler, P.K., Wayne, R.O., 1985. Calcium and plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **36**: 397–439.
- Herranz, M.H., Ferrandis, P., Martinez-Sanchez, J. J., 1998. Influence of heat on seed germination of seven Mediterranean *Leguminosae* species. *Plant Ecology*, **136**: 95-103.
- Hosseini, Z., Ghasempour, H. R., Kahrizi, D., Akbari, L., 2017. *In vitro* callus induction and shoot regeneration in hollyhocks (*Althaea digitata*). *Biological, Environmental and Agricultural Sciences*, **2**:34-40.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 1841-1856.
- Husain, M. K., Anis, M., 2009. Rapid *in vitro* multiplication of *Melia azedarach* L. (a multipurpose woody tree). *Acta Physiologiae Plantarum*, **31** (4): 765-772.
- Iauk, L., Bue, A. M .L., Milazzo, I., Rapisarda, A., 2003. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phytotherapy Res*, **17** (6): 599-604.
- Ishii Y., Takamura, T., Goi, M., Tanaka, M., 2004. Callus induction and somatic embryogenesis of phalaenopsis. *Plant Cell Rep.* **17** (6): 446-450
- İslam, I. K., Okuno, S., Yoshimoto, M., Yamakawa, O., 2003. Composition of phenolics and anthocyanins in a sweet potato cell suspension culture. *Biochem. Eng. J.* **14**: 155-161.
- İsmail, A., Hong, T. S., 2002. Antioxidant activity of selected commercial seaweeds. *Mal J Nutr*, **8** (2): 167-177.
- Jenderek, M. M., Olney, A. J., 1998. Utilization of different seedling explants for *in vitro* propagation of *Hibiscus syriacus*. *Hort Science*, **33** (3): 478-479.
- Jiao, J., Gai, Q. Y., Yao, L. P., Niu, L. L., Zang, Y. P., Fu, Y. J., 2018. Ultraviolet radiation for flavonoid augmentation in *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures mediated by oxidative stress and biosynthetic gene expression. *Industrial Crops and Products*, **118**: 347-354.
- Kabir, S., Khanzada, A., Baloch, M., Khaskheli, A., Shaikh, W., 2016. Determination of total protein contents from medicinal plants (zygophyllaceae) family found in Pakistan. *Sindh University Research Journal-SURJ (Science Series)*, **47** (1): 41-44.
- Kadioğlu, A., 2011. *Bitki Fizyolojisi*. 5.Baskı. Gündüz Ofset Matbacılık, Yay. No: 9, Trabzon, 418.
- Kolancılar, H., 2010. Klasik çözücülere bir alternatif; iyonik sıvılar. *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, **11** (2): 90-100.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47** (10): 3954-3962.
- Kang, D. G., Yun, C. K., Lee, H. S., 2003. Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea. *J Ethnopharmacol*, **87**: 231-236.
- Karakurt, H., Aslantaş, R., Eşitken, A., 2010. Tohum çimlenmesi ve bitki büyümesi üzerinde etkili olan çevresel faktörler ve bazı ön uygulamalar. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **24** (2): 115-128.

- Katalinić, V., Milos, M., Modun, D., Musić, I., Boban, M., 2004. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+) - catechin. **Food Chemistry**, **86** (4): 593-600.
- Kefeli, V. I., Kalevitch, M. V., Borsari, B., 2003. Phenolic cycle in plants and environment. **J. Cell Mol. Biol**, **2** (1): 13-18.
- Keskin, N., Kunter, B., 2008. Production of trans-resveratrol in 'Cabernet Sauvignon' (*Vitis vinifera* L.) callus culture in response to ultraviolet-C irradiation. **Vitis, Journal of Grapevine Research**, **47**(4): 193-196.
- Kızıllı, S., Hasimi, N., Tolan, V., Kilinc, E., Yuksel, U., 2010. Mineral content, essential oil components and biological activity of two mentha species (*M. piperita* L., *M. spicata* L.). **Turkish Journal of Field Crops**, **15** (2): 148-153.
- Konczak, I., Zabarás, D., Dunstan, M., Aguas, P., 2010. Antioxidant capacity and phenolic compounds in commercially grown native Australian herbs and spices. **Food Chemistry**, **122** (1): 260-266.
- Kono, Y., Shibata, H., Kodama, Y., Sawa, Y., 1995. The suppression of the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid. **Biochemical Journal**, **312** (3): 947-953.
- Korkmaz, K., Kara, S. M., Ozkutlu, F., Gul, V., 2010. Monitoring of heavy metals and selected micronutrients in hempseeds from North-western Turkey. **African Journal of Agricultural Research**, **5** (6): 463-467
- Kozłowski, J., Szczygłowska, D., Formanowiczowa, H., 1989. Biology of germination of medicinal plants seeds. Pt. 14. Seeds of species from *Malvaceae* family: marsh mallow (*Althea officinalis* L.) and mallow (*Malva silvestris* L.). **Herba Polonica**, **2** (3): 99-107
- Kramer, U., Clemens, S., 2005. Function and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. **Topics Curr Genet**, **14**: 215- 271.
- Kwak, S. S., Kim, S.K., Park, I.J., Lui, J. R., 1996. Enhancement of peroxidase activity by stress related chemicals in sweet potato. **Phytochemistry**, **43**: 565-568
- Lapornik, B., Prosek, M., Wondra, A. G., 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **J Food Eng.**, **71**: 214-222.
- Li, H. A., Wong, C-C, Cheng, K-W, Chen F., 2008. Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT Food Sci Technol**. **41**: 385-90
- Lichtenthaler, H. K., 1995. Vegetation Stress: an Introduction to the stress concepts in plants. **Journal of Plant Physiology**, **148**: 4-14.
- Lima, C. F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Fernandes- Ferreira, M. Pereira- Walson, C., 2005. The drinking of *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. **J. of Ethno.**, **97**: 383-389.
- Liu, C.Z., Cheng. X.Y., 2008. Enhancement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in cell cultures of *Cistanche deserticola* by osmotic stress. **Plant Cell Reports**, **27**: 357-362.
- Liu, H., Qiu, N., Ding, H., Yao, R., 2008. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. **Food Research International**, **41** (4): 363-370.
- Lorenzo, J.C., Blanco, M.D., Pelaez, O., Gonzalez, A., Cid, M., Iglesias, A., Gonzalez, B., Escalona, M., Espinosa, P., Borroto, C., 2001. Sugarcane microporopogation and phenolic excretion. **Plant Cell, Tissue Organ Cult.** **65**: 1-8.



- Luo, J., Gould, J. H., 2000. *In vitro* shoot tip grafting improves recovery of cotton plants from culture. ***Plant Cell Tissue Organ Culture***, **57**: 211-213
- Lux-Endrich, A., Treutter, D., Feucht, W., 2000. Influence of nutrients and carbohydrate supply on the phenol composition of apple shoot cultures. ***Plant Cell, Tissue Organ Culture***, **60**: 15-21
- Madhavi, D. L., Bomser, J., Smith, M. A. L., Singletary, K., 1998. Isolation of bioactive constituents from *Vaccinium myrtillus* (bilberry) fruits and cell cultures. ***Plant Science***, **131** (1): 95-103
- Magder, S., 2006. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark life? ***Critical Care***, **10** (1): 1-8.
- Mammadov, R., 2014. ***Tohumlu Bitkilerde Sekonder Metabolitler***. Nobel Yayınları, yay. No: 841, Ankara. 412.
- Mansuroğlu, S., Gürel, E., 2002. Mikroçoğaltım, bölüm: 8. ( Editörler: M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan). ***Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kültürü ve Uygulamaları***. Selçuk Üniversitesi Yayınları. Konya. 374.
- Mati, E., Boer, H., 2011. Ethnobotany and trade of medicinal plants in the qaysari market, Iraq. ***Journal of Ethnopharmacology***, **133** (2): 490-510.
- Matlawska, I., 1992. Flavonoids in the flowers of *A. rosea* var. *niger* (Malvaceae). ***Herba Polon***, **38** (4): 163-72.
- Michel, Z., Hilaire, K. T., Mongomaké, K., Georges, A. N., Justin, K. Y., 2008. Effect of genotype, explants, growth regulators and sugars on callus induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). ***Aust J Crop Sci***, **2** (1): 1-9.
- Morgil İ., 2007. Çözücüler ve özellikleri. Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği [http://www.kimyaegitimi.org/sites/default/files/kimya\\_egitimi\\_ogrenci\\_deneyleri/cozuculer\\_ve\\_ozellikleri.pdf](http://www.kimyaegitimi.org/sites/default/files/kimya_egitimi_ogrenci_deneyleri/cozuculer_ve_ozellikleri.pdf). Erişim tarihi 29.05.2019.
- Munir, M., Athar H., İkrām, U., Rahmatullah, Q., Mehmooda, M., Muhammad, A., Muhammad, K., 2012. Callogenesis potential of cotyledonary explants of *Althaea rosea* from Pakistan. ***Pak. J. Bot.***, **44**: 271-275.
- Mujeera, F., Arunachalam, B., 2006. Effect of plant growth regulators on the yield and quality of bast fibres in *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima* Wester. ***International Journal of Botany***, **2** (1): 48-55.
- Murch, S. J., S. KrishnaRaj, P. K. Saxena, 2000. Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in *in vitro* regenerated St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. *Anthos*) plants. ***Plant Cell Reports*** **19**. (7): 698-704.
- Musa, K. H., Abdullah, A., Jusoh, K., Subramaniam, V., 2011. Antioxidant activity of pink-flesh guava (*Psidium guajava* L.): effect of extraction techniques and solvents. ***Food Anal Methods***, **4**: 100- 107.
- Nagai, T., Inoue, R., Inoue, H., Suzuki, N., 2003. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. ***Food chemistry***, **80** (1): 29-33.
- Nair, B. R., 2013. Biochemical changes associated with fruit development in *Abelmoschus esculentus* cv. arka anamika. ***Journal of Agricultural Technology***, **9** (2): 373-382.
- Naczek, M., Shahidi, F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, **41**: 1523-1542.

- Namlı, S., Toker, Z., Işıkalın, Ç., Özen, H. C., 2009. Effect of UV-C on production of hypericin in *Hypericum triquetrifolium Turra* grown under in-vitro conditions. *Fresenius Environmental Bulletin*, **18** (1): 123-128.
- Naz, R., Anis M., Alatar A. A., 2017. Embling production in *Althaea officinalis* L., through somatic embryogenesis and their appraisal via histological and scanning electron microscopical studies. *Applied biochemistry and biotechnology*, **182** (3): 1182-1197.
- Neve, J., 1991. Physiological and nutritional importance of selenium. *Experimentia*, **47**: 187-193.
- Nimse, S. B., Pal, D., 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances*, **5** (35): 27986-28006.
- North, J. J., Ndakidemi, P. A., Laubscher, C. P., 2012. Effects of antioxidants, plant growth regulators and wounding on phenolic compound excretion during micropropagation of *Strelitzia reginae*. *International Journal of Physical Sciences*, **7** (4): 638-646.
- Nunes, X. P., Silva, F. S., Almeida, J. R. G. D. S., de Lima, J. T., de Araújo Ribeiro, L. A., Júnior, L. J. Q., Barbosa Filho, J. M., 2012. Biological oxidations and antioxidant activity of natural products. Chap. 1. *Phytochemicals as nutraceuticals* ( Editor: Venketeshwer Rao) IntechOpen press. Londra. 278.
- Obiajunwa, E. I., Adebajo, A. C., Omobuwajo, O. R., 2002. Essential and trace element contents of some Nigerian medicinal plants. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **252** (3): 473-476.
- Okan, O. T., Varlibaş, H., Öz, M., Deniz, İ., 2013. Antioksidan analiz yöntemleri ve doğu karadeniz bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilir olacak odun dışı bazı bitkisel ürünler. *Kastamonu Univ., Journal of Forestry Faculty*, **13** (1): 48–59.
- Olukayode, A. A. M, Ajasa, A. M., Bello, M. O, Ibrahim, A. O., Ogunwande, I. A., Olawore, N. O., 2003. Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants of Nigeria. *Food Chemistry*, **85**: 67-71
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K., 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J. Agric. Food Chem*, **50**: 3122-3128.
- Özcan, M., 2004. Mineral contents of some plants used as condiments in Turkey. *Food chemistry*, **84** (3): 437-440.
- Özkan, G., Baydar, H., Erbas, S., 2010. The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90** (2): 205-209.
- Özkaynak, E., Samancı, B., 2005. Mikroçoğaltımda alıştırma. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, **19** (36): 28-36.
- Özyiğit, I. I., Kahraman, M. V., Ercan, O., 2007. Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology*, **6** (1), 003-008.
- Özyiğit, I. I., 2008. Phenolic changes during *in vitro* organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips. *African Journal of Biotechnology*, **7** (8): 1145-1150.

- Pakravan, M., Ghahreman, A., 2002. Some new combinations and synonyms in *Alcea* (Malvaceae) from Iran. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B für Botanik und Zoologie*, **104**: 713-716.
- Pakseresht, G., Kahrizi, D., Mansouri, M., Ghorbani, T., Kazemi, N., 2016. Study of callus induction and cell culture to secondary metabolite production in *Hyssopus officinalis* L. *J Rep Pharma Sci*, **5**: 104-111.
- Pela, Z., Gerasopoulos D., Maloupa E., 2000. The effects of heat pre-treatments and incubation temperature on germination of *Cistus creticus creticus* Seeds. *Acta Hort.*, **541**: 365-372
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *J Nutr*, **133**: 2812-2819.
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., Andrade, P. B., 2009. Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules*, **14**: 2202-2211.
- Petersen, M., Szabo, E., Meinhard, J., 1995. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, **43**: 89. <https://doi.org/10.1007/BF00052161>
- Pisoschi, A. M., Negulescu, G. P., 2012. Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, **01** (01): 1-10.
- Prior, R. L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R., 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 3273–3279.
- Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F., 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 3396-3402.
- Pytlakowska, K., Kita, A., Janoska, P., Połowniak, M., Kozik, V., 2012. Multi-element analysis of mineral and trace elements in medicinal herbs and their infusions. *Food Chemistry*, **135** (2): 494-501.
- Queralt, I., Ovejero, M., Carvalho, M. L., Marques, A. F., Llabres, J. M., 2005. Quantitative determination of essential and trace element content of medicinal plants and their infusions by XRF and ICP techniques. *X-Ray Spectrometry: An International Journal*, **34** (3): 213-217.
- Ramakrishna, N., Lacey J., Smith J. E., 1991. Effect of surface sterilization, fumigation and gamma irradiation on the microlora and germination of barley seeds. *International J Food Microbiology*. **13** (1): 47-54.
- Rami, M. M., Oyekanmi, A. M., Adegoke, B. M., 2014. Proximate, phytochemical and micronutrient composition of *Sida acuta*. *J. Appl. Chem*, **7** (2): 93-98.
- Rao, K. S., Lakshminarayana, G., 1984. Characteristics and composition of six Malvaceae seeds and the oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **61** (8): 1345-1346.
- Raoul, S. S., Gilbert, C., Hamidou, S., Yannick, F. T., Yao, Abdourahamane, D. S., Michle, B., 2010. Protocol for callus and somatic embryogenesis initiation for *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): Influence of explant type, sugar and plant growth regulator. *Australian J. Crop Sci.*, **4** (2): 98-106.
- Razavi, S. M., Zarrini G., Molavi G., Ghasemi G., 2011. Bioactivity of malva sylvestris L., a medicinal plant from Iran. *Iran J Basic Med Sci*, **14** (6): 574-9.

- Rice E., C. A., Miller N. J., Bolwell P. G., Bramley P. M., Pridham J. B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res.* **23**: 375- 383.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, **20** (7): 933-956.
- Robbins, R., 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 2866-2887.
- Ruiz, J. M., Rivero, R. M., Lopez-Cantarero, I., Romero, L., 2003. Role of Ca<sup>2+</sup> in the metabolism of phenolic compounds in tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Growth Regulation*, **41** (2): 173-177.
- Ryan, D., Robards, K., Lavee, S., 1999. Changes in phenolic content of olive during maturation. *International journal of food science & technology*, **34** (3): 265-274.
- Sağlam, N. G., 2015. Yaprak senesensi: fizyolojik ve moleküler düzenlenmesine bakış. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, **27** (3): 83-92.
- Samanthi, A., Mohd Puad, N., Suhaimi, S. Kumara, M., Nor Aini, A. S., 2013. In vitro shoot regeneration from leaf explants of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Sains Malaysiana*, **42** (10): 1505-1510.
- Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J. F., 1999. Communicating with calcium. *Plant Cell*, **11**: 691-706.
- Sarmadi, M., Karimi, N., Palazón, J., Ghassempour, A., Mirjalili, M. H., 2018. The effects of salicylic acid and glucose on biochemical traits and taxane production in a *Taxus baccata* callus culture. *Plant Physiology and Biochemistry*, **132**: 271-280.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Iseki, K., 2011. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International journal of pharmaceutics*, **403** (1-2): 136-138.
- Sauer A, Walther F, Preil W., 1985. Different suitability for *in vitro* propagation of rose cultivars. *Gartenbauwiss*; **3**: 133-8.
- Schwob I, Bessiere J. M., Masotti V., Viano J., 2004. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. *Biochem Syst Ecol.*, **32**: 735-745.
- Shirin, K., Imad, S., Shafiq, S., Fatima, K., 2010. Determination of major and trace elements in the indigenous medicinal plant *Withania somnifera* and their possible correlation with therapeutic activity. *Journal of Saudi Chemical Society*, **14** (1): 97-100.
- Shome, U., Mehrotra, S., Sharma, H. P., 1992. Comparative pharmacognosy of two *Althaea spp.* and "gulkhairo" samples. *Pharma Biol.*, **3** (1): 47-55.
- Shoostarian, S., Salehi, H., 2010. Enhancing *Alcea aucheri* (Boiss.) Alef. seed germination by application of some scarification treatments. *Advances in Environmental Biology*, **4** (2): 216-219.
- Shovan, M. H., 2017. **Project On Antioxidant Activity of Malva verticillata (Lafa Shak)** (Doktora tezi, basılmamış), Daffodil International University, Dhaka, Bangladeş.
- Sivacıoğlu, A., Ayan, S., Gülerol, B., 2007. Bazı bitki gelişim düzenleyicilerin *Pinus silvestris* L. fidecik morfolojik karakterlerine etkisi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, **7**(2): 155-168.

- Siah, C. L., Doran, P. M., 1991. Enhanced codeine and morphine production in suspended *Papaver somniferum* cultures after removal of exogenous hormones. *Plant Cell Rep.*, **10**: 349-353
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, **299**: 152-178.
- Sivanesan, I., Jeong, B. R., 2007. Direct shoot regeneration from nodal explants of *Sida cordifolia* Linn. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **43**(5): 436-441.
- Sökmen A., Gürel, E., 2002. Sekonder Metabolit Üretimi, bölüm 7. *Bitki Biyoteknolojisi I*, (Editörler: M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, Türkiye, 374.
- Sun, T., Ho, C. T., 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food chemistry*, **90** (4): 743-749
- Şavşatlı, Y., Özcan, A., Çatal, M. İ., Yurteri, E., Seyis, F., 2018. The effect of pruning age and diurnal variability on the antioxidant activity of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz) leaves in organic tea farming. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, **6** (2): 163-168.
- Şen, C., 2011. *Hibiscus sabdariffa L. Bitkisinin Antimikrobiyal Ve Antioksidan Aktivitesinin Araştırılması* (yüksek lisans tezi). Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2008. *Bitki Fizyolojisi*. Palme Yayıncılık, Ankara, 690.
- Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M., 2007. *Farmasötik Botanik*. No: 93. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, s. 250.
- Taylor G. T., Sullivan C. W., 2008. Vitamin B<sub>12</sub> and cobalt cycling among diatoms and bacteria in antarctic sea ice microbial communities. *Limnology and Oceanography*, **53** (5): 1862-1877.
- Teramoto, S., Komamine, A., 1988. L-DOPA production in plant cell cultures. *Medicinal and Aromatic Plants*, **I**: 209-224.
- Tetsumura T, Matsumoto Y, Sato M, 2008. Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Sci Hort*, **119**: 72-4.
- Thomas P., Ravindra M. B., 1999. Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. *J. Horticultural Sci.*, **72** (5): 713-722.
- Tiwari, R., Rana, C. S., 2015. Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, **3** (5): 661-670.
- Tůmová, L., Tůma, J., 2011. The effect of UV light on isoflavonoid production in *Genista tinctoria* culture *in vitro*. *Acta physiologiae plantarum*, **33** (2): 635-640.
- Uzunhisarcıklı, M. E., Vural, M., 2012. The taxonomic revision of *Alcea* and *Althaea* (Malvaceae) in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, **36** (6): 603-636.
- Valiei M., Shafaghat A., Salimi F., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the flower and root hexane extracts of *Althaea officinalis* in Northwest Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5** (32): 6972-6976.
- Vanisree, M., Lee, C., Lo, S., Nalawade, S. M., Lin, C. Y., 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures, *Bot Bull Acad Sin* **45**: 1-22.

- Velioğlu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B. D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of agricultural and food chemistry*, **46** (10): 4113-4117.
- Verma, S., Gupta, M. L., Dutta, A., Sankhwar, S., Shukla, S. K., Flora, S. J., 2010. Modulation of ionizing radiation induced oxidative imbalance by semi-fractionated extract of Piper betle: an *in vitro* and in vivo assessment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **3** (1): 44-52.
- Veshkurova, O., Golubenko, Z., Pshenichnov, E., Arzanova, I., Uzbekov, V., Sultanova, E., Stipanovic, R. D., 2006. Malvone A, a phytoalexin found in *Malva sylvestris* (family Malvaceae). *Phytochemistry*, **67** (21): 2376-2379.
- Wang J., Sun Y., Hu J., Cui G., 2004. Factors affecting the frequencies of callus induction and plantlet regeneration in maize immature embryo culture. *Acta Agron Sin*, **30**: 398-402.
- Wang, J., Li, J., Li, J., Li, J., Liu, S., Huang, L., Gao, W., 2017. Production of active compounds in medicinal plants: from plant tissue culture to biosynthesis. *Chinese Herbal Medicines*, **9** (2): 115-125.
- Wargovich, M., Woods, C., Hollis, D. M., Zander, M. E., 2001. Herbals, cancer prevention and health. *J. Nutr.*, **131**: 3034-3036.
- WHO, 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. Available at <http://whqlibdoc.who.int/publications/1998/9241545100.pdf>. Erişim tarihi: 01.04.2019
- Wu, J., C. Wang, and X. Mei. 2001. Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus* spp cell cultures by rare earth chemical lanthanum. *J. Biotechnol.*, **85**: 67-73.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Prior, R. L., 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States, *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 4026-4037.
- Xu, C., Zhang, Y., Zhu, L., Huang, Y., Lu, J., 2011. Influence of growing season on phenolic compounds and antioxidant properties of grape berries from vines grown in subtropical climate. *J Agric Food Chem*, **59**: 1078-1086
- Yamaner, Ö., 2011. *Hypericum Adenotrichum Spach'un Doku Kültürü Teknikleri İle Çoğaltılması Ve İn Vitro Koşullarda Sekonder Metabolit Değişiminin Araştırılması* (doktora tezi). Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Yang M., Cobine P. A., Molik S., Naranuntarat A., Lill R., Winge D. R., Culotta V. C., 2006. The effects of mitochondrial iron homeostasis on cofactor specificity of superoxide dismutase 2. *EMBO J*, **25**:1775-1783.
- Younesikelaki, F. S., Ebrahimzadeh, M. H., Desfardi, M. K., Banala, M., Marka, R., Nanna, R. S., 2016. Optimization of seed surface sterilization method and *in vitro* seed germination in *Althaea officinalis* (L.)-an important medicinal herb. *Indian J. Sci. Technol*, **9**: 1-6.
- Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y., Hara, Y., 1996. Methyljasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature Biotech*, **14**: 1129-1132.
- Zakizadeh M., Nabavi S. F., Nabavi S. M., 2011. *In vitro* antioxidant activity of flower, seed and leaves of *Alcea hyrcana* Grossh. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **15** (4): 406-412

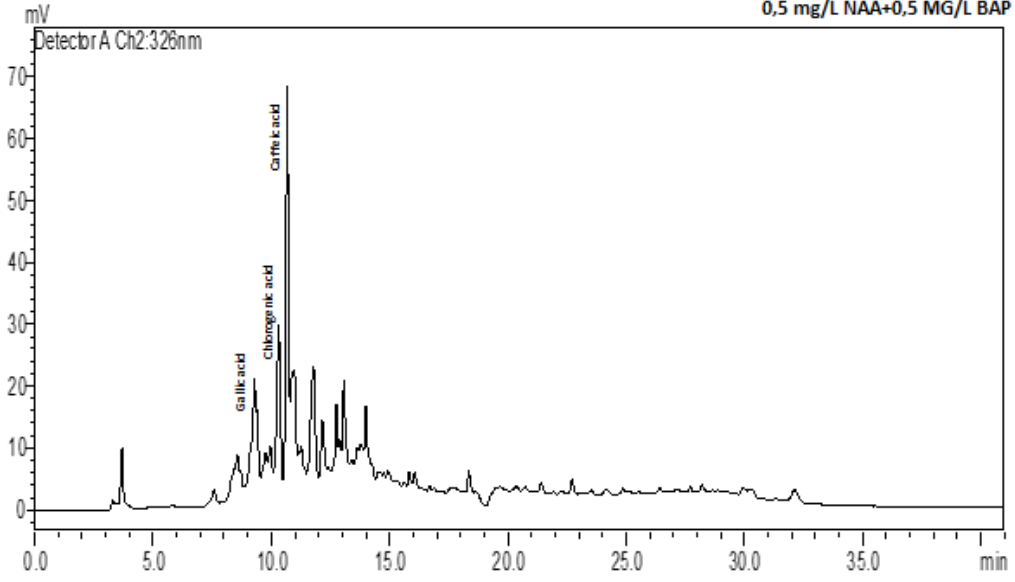
- Zhang B. H., 2000. Regulation of plant growth regulators on cotton somatic embryogenesis and plant regeneration. *Biochemistry*, **39**: 1567
- Zhon, J. J., 2001. Biochemical Engineering of the Production of Plant-Specific Secondary Metabolites by Cell Suspension Cultures. *Plant Cells. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (editör: Zhong J.J.) vol 72. Springer, Berlin, Heidelberg. 154.
- Zouari N., Fakhfakh N., Zouari S., Sellami M., Abid M., Ayadi M. A., Neffati M., 2011. Volatile and lipid analyses by gas chromatography/mass spectrometry and nutraceutical potential of edible wild *Malva aegyptiaca* L.(Malvaceae). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **62** (6): 600-608.
- Zouine, J., El Hadrami, I., 2004. Somatic embryogenesis in *Phoenix dactylifera* L. effect of exogenous supply of sucrose on proteins, sugars, phenolics and peroxidases activities during the embryogenic cell suspension culture. *Biotechnology*, **3** (2): 114-118.



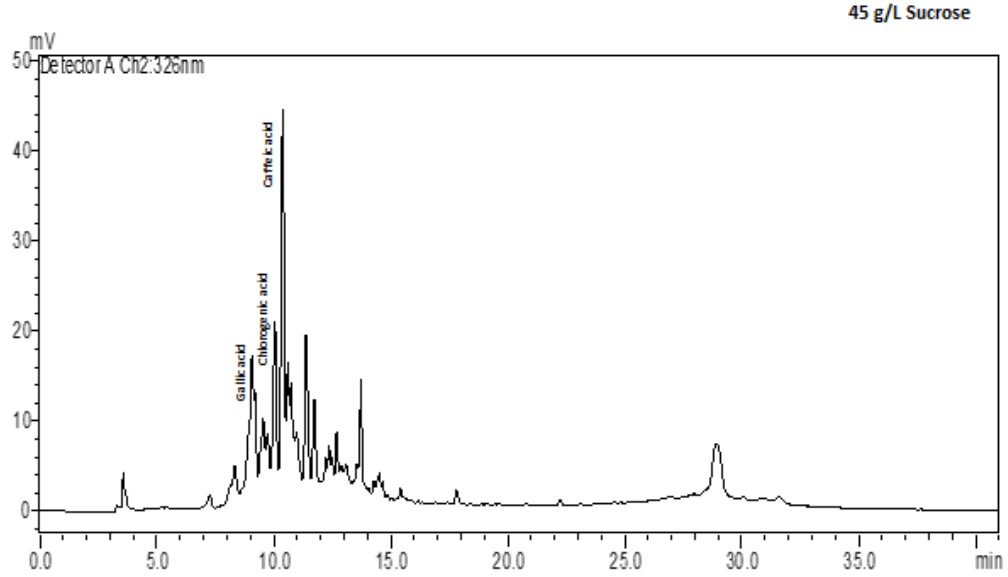


## EKLER

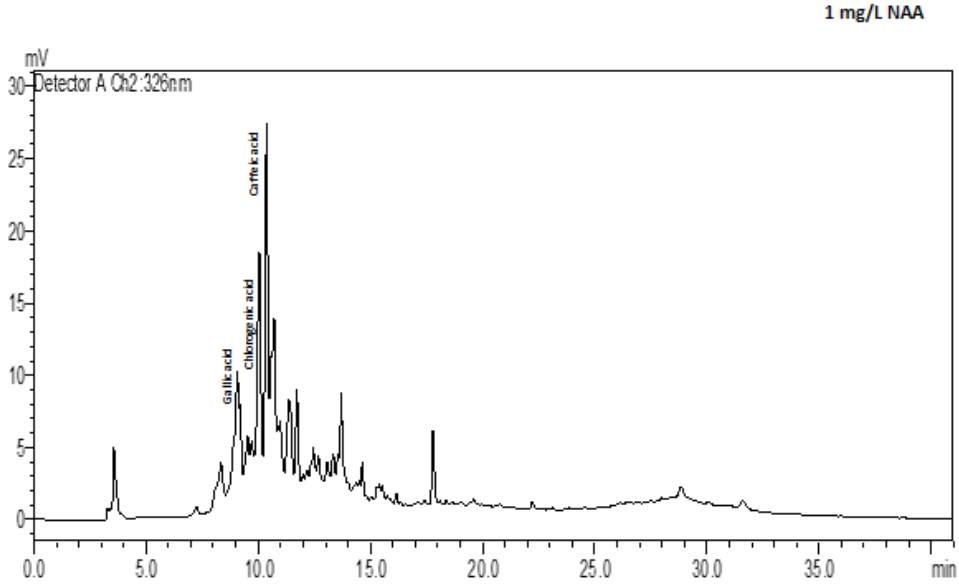
Ek 1. 0.5mg/l NAA+ 0.5 mg/l BAP uygulanmış örneğin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı



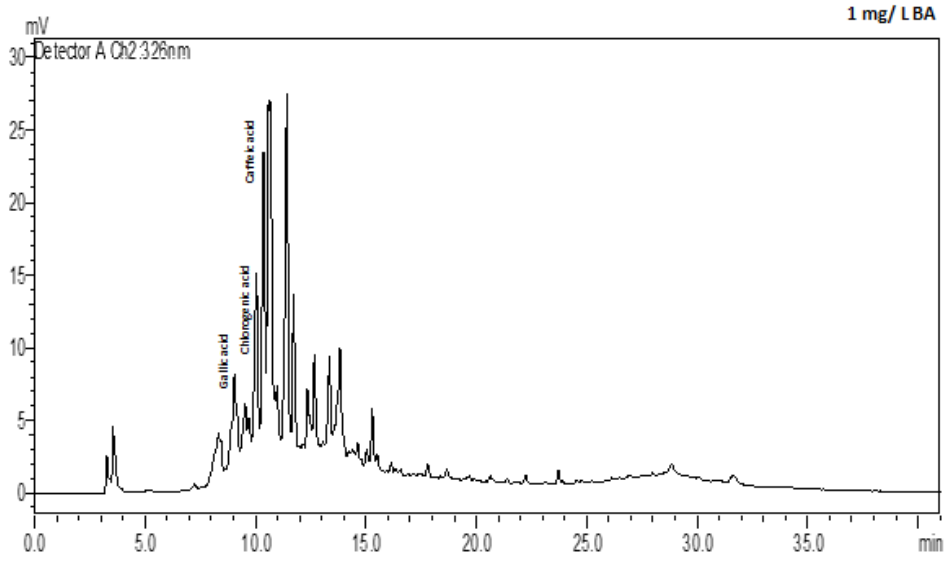
Ek 2. 45 mg/l Sakkaroz uygulanmış örneğin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı



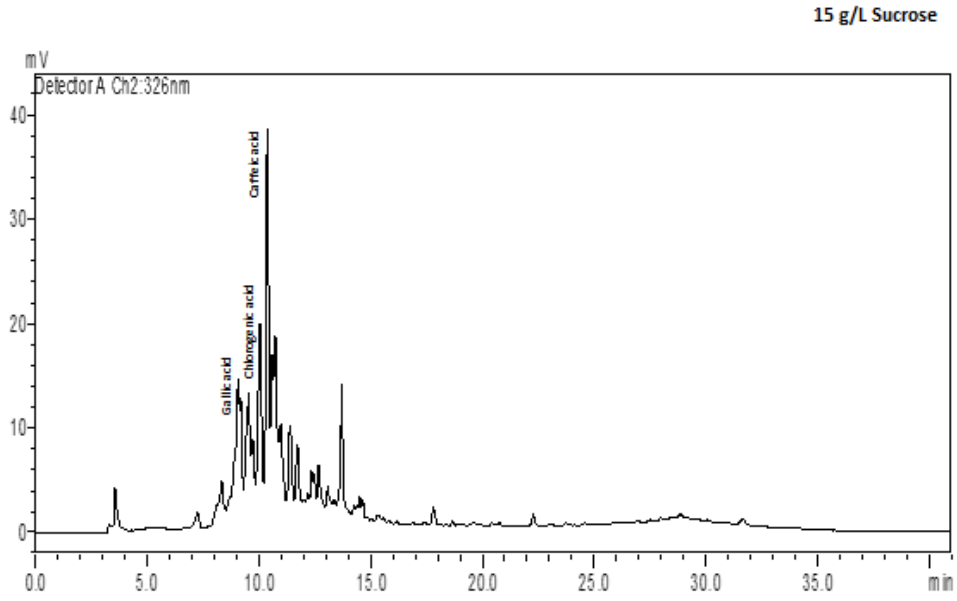
Ek 3. 1mg/l NAA uygulanmış örneğin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı



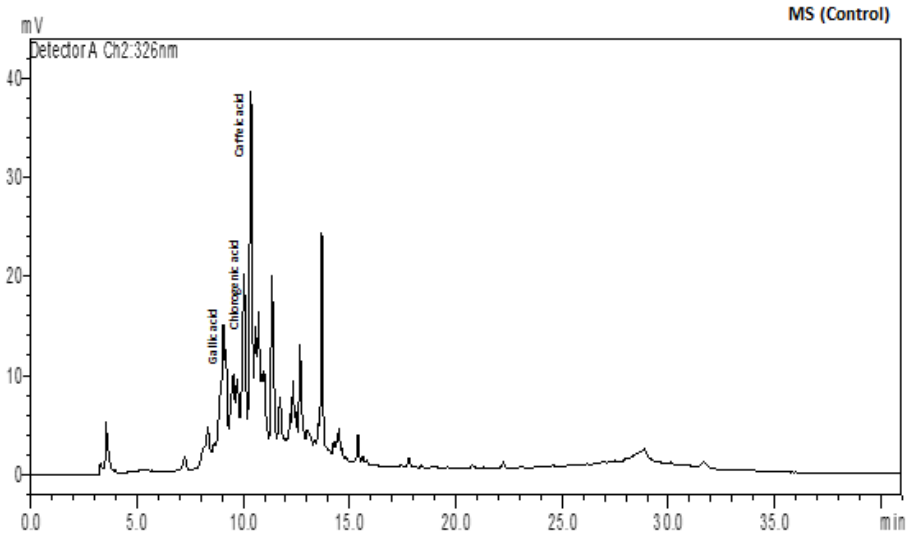
Ek 4. 1mg/l BAP uygulanmış örneğin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı



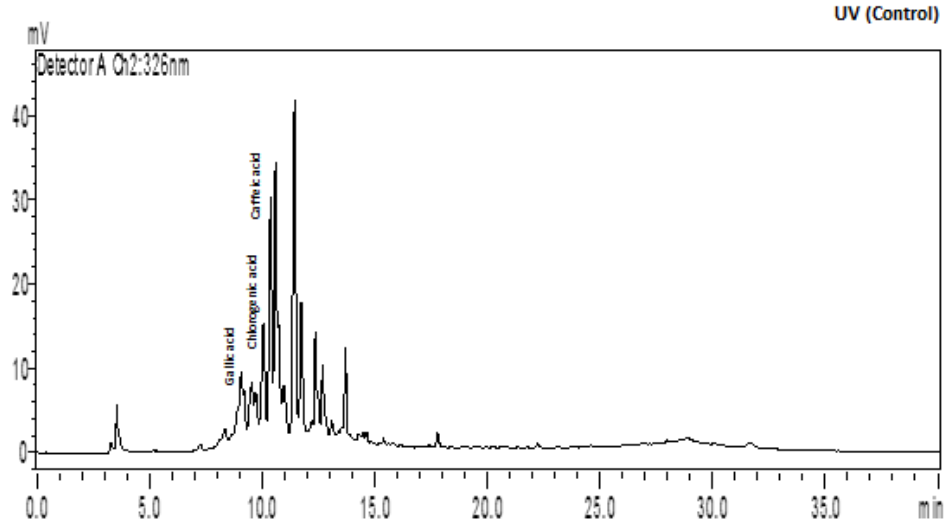
Ek 5. 15 mg/l Sakkaroz uygulanmış örneğin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı



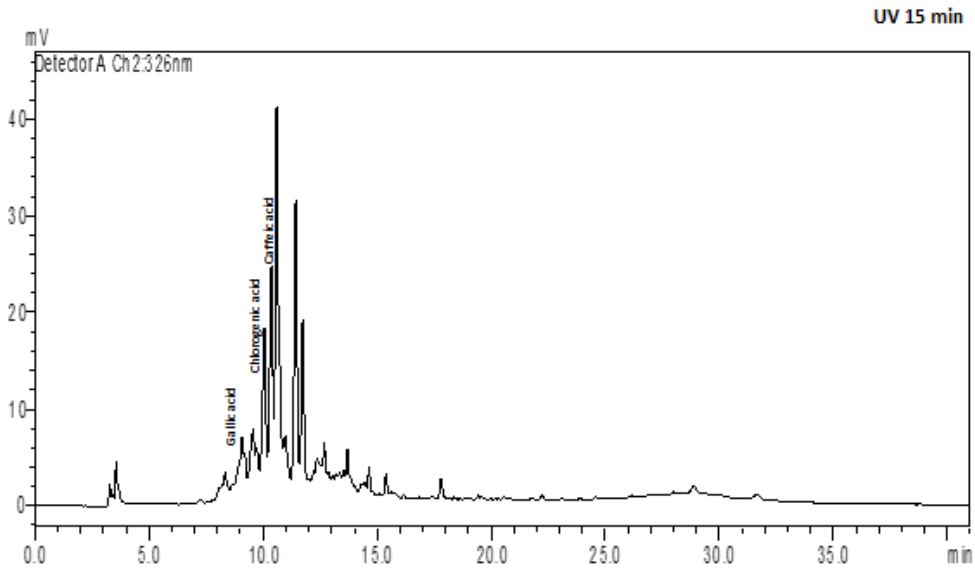
Ek 6. Sakkaroz uygulamaları için kontrol kabul edilen MS ortamındaki örneklerin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı



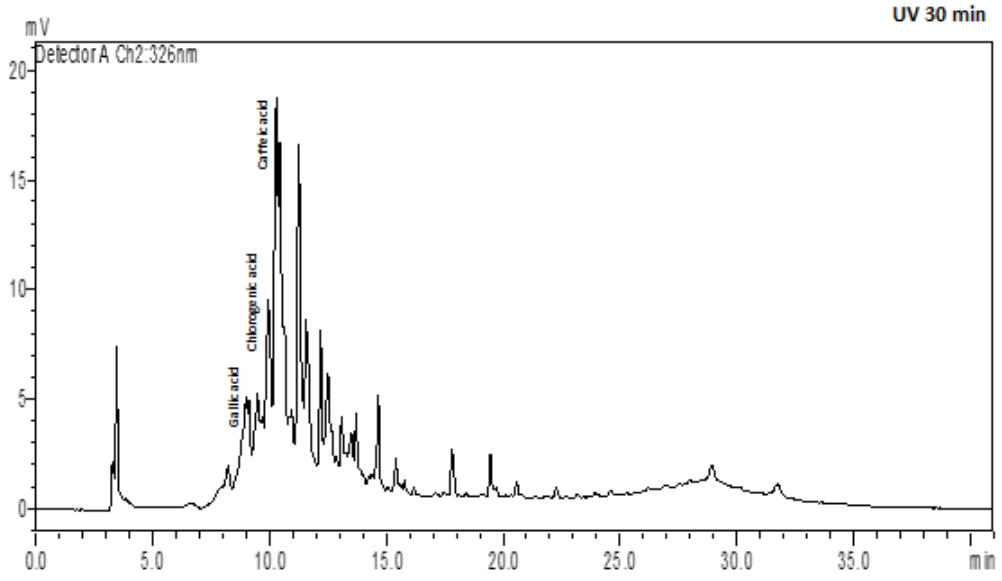
Ek 7. UV uygulamaları için kontrol kabul edilen MS ortamındaki örneklerin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı



Ek 8. 15 dak. UV uygulanan örneklerin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı



Ek 9. 30 dak. UV uygulanan örneklerin HPLC ile elde edilmiş kromatogramı





## ÖZ GEÇMİŞ

Lisans eğitimini Hacettepe Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği bölümünde 1997 yılında tamamladı. Yüksek lisans eğitimini 2006 yılında Van YYÜ Fen Fakültesi, Biyoloji bölümünde, doktora çalışmalarını ise 2019 yılında Van YYÜ Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde tamamladı. 2013 yılından bu güne Van YYÜ Bilim Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde öğretim görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve üç çocuk annesidir.



T.C  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 22/05/2019

Tez Başlığı / Konusu:

**Tıbbi Bitki Olan *Alcea kurdica* 'nın Mikroçoğaltım ile *in vitro* Rejenerasyonu ve Bitki Sekonder Metabolitlerinin Tayini**

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 25 sayfalık kısmına ilişkin, 15/05/2019 tarihinde şahsım tarafından Turniten-login intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %4 ( yüzde 4) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Gül Görmez



Tarih ve İmza  
22/05/2019

Adı Soyadı: Gül Görmez

Öğrenci No: 139102001

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı:

Statüsü: Y. Lisans

Doktora

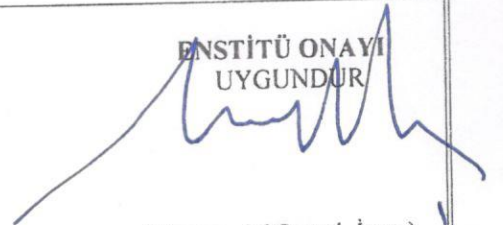
**DANIŞMAN ONAYI  
UYGUNDUR**

Prof. Dr. Musa Türker



(Unvan, Ad Soyad, İmza)

**ENSTİTÜ ONAYI  
UYGUNDUR**



(Unvan, Ad Soyad, İmza)